



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA

Avaliação comparativa entre o efeito anticoagulante de Fosfolipases A₂ isoladas de
peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* e fármacos
anticoagulantes

JOÃO PESSOA – PB

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA

**Avaliação comparativa entre o efeito anticoagulante de Fosfolipases A₂ isoladas de
peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* e fármacos
anticoagulantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Orientadora: Prof. Dr^a. Daniela Priscila Marchi Salvador

JOÃO PESSOA – PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48a Oliveira, Pierri Emanuel de Abreu.

Avaliação comparativa entre o efeito anticoagulante de Fosfolipases A2 isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus e fármacos anticoagulantes / Pierri Emanuel de Abreu Oliveira. - João Pessoa, 2022.

92 f. : il.

Orientação: Daniela Priscila Marchi Salvador.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biologia celular e molecular. 2. Estudos in sílico. 3. Hemostasia. 4. Inibidor do Fator IXa. 5. Inibidor do Fator Xa. 6. Proteínas ofídicas. I. Salvador, Daniela Priscila Marchi. II. Título.

UFPB/BC

CDU 576+577.2(043)

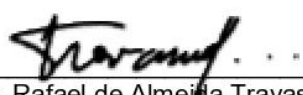
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Ata da Sessão Pública para avaliar o Trabalho de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Mestrando **PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA**, submetido para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

Aos vinte e cinco dias do mês fevereiro do ano de dois mil e vinte e dois, às dezesseis horas, em ambiente virtual, reuniram-se em cerimônia pública, os membros da banca examinadora, composta pelos Professores Doutores: **Daniela Priscila Marchi Salvador – UFPB (Orientadora/Presidente)**, **Rafael de Almeida Travassos – UFPB (Examinador interno)** e **Ilka Biondi – UEFS (Examinador Externo)** a fim de examinarem o candidato **PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA** para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. Em seguida com a palavra a Professora Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador, Presidente da banca, comunicou, aos presentes qual era o propósito da reunião e os procedimentos de encaminhamentos da mesma. A seguir, concedeu à palavra ao candidato para que o mesmo fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado: "**Avaliação comparativa entre o efeito anticoagulante de Fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* e fármacos anticoagulantes**". Concluída a exposição, a Senhora Presidente solicitou que fosse feita a arguição por cada um dos examinadores. Após o candidato ser arguido por cada membro examinador, lhe foi concedida a palavra para que respondesse e esclarecesse as questões levantadas. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora passou a proceder à avaliação e julgamento do mestrando. Em seguida, a Senhora Presidente declarou que a Banca Examinadora considerou, segundo o artigo 65 do Regulamento Geral dos Programas de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Federal da Paraíba, **APROVADA** a dissertação apresentada e defendida pelo mestrando **PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA** concedendo-lhe, assim, o grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. Logo após a avaliação da comissão julgadora, a orientadora preencherá um formulário, juntamente com o relatório final de dissertação de mestrado, a fim de que o mesmo seja homologado pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. E, para constar, eu, Augusto César Vasconcelos Freitas Júnior, secretário da reunião, lavrei a presente ata, que assino juntocom os membros da banca examinadora. João Pessoa, 25 de fevereiro de 2022.


Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior
Secretário


Prof. Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador
Orientador/Presidente


Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos
Examinador interno


Prof.^a Dr.^a Ilka Biondi
Coordenadora
Laboratório de Análise Toxicológica e Farmacológica
Laboratório de Imunologia Experimental
Universidade Estadual de Feira de Santana
Prof. Dra. Ilka Biondi
Examinador Externo

Assinatura do Mestrando: 

Dedico este trabalho a todos aqueles que eu amo e guardo em meu coração, pois, foram com estas pessoas que pude contar em todas as horas da minha vida. São aqueles que me fazem feliz e me apoiam, seja qual for a trajetória que eu escolha.

“Vede que ninguém dê a outrem mal por mal, mas segui sempre o bem, tanto uns para com os outros, como para com todos. Regozijai-vos sempre. Orai sem cessar. Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco.”

(1 Ts 5:15-18)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as circunstâncias vivenciadas, pelas dificuldades que me trouxeram tantos ensinamentos, pelas portas abertas que foram motivo de renovação da vontade de continuar, enfim, pela vida, por tudo.

À minha mãe (Tânia) e ao meu pai (Pedro), por não medirem esforços para que eu continuasse no caminho do estudo e do crescimento pessoal, por acreditarem que eu conseguiria.

Ao meu irmão (João Pedro), pelo apoio dado durante esta caminhada.

Ao meu companheiro (Patrick), por ser ombro amigo, compreensivo e incentivador no andamento deste projeto e na vida.

À minha Tia-mãe (Eclivaneide), por todo o apoio e incentivo nas mais diversas fases da minha vida.

À minha família, que sempre foi apoiadora e a minha base na realização dos meus projetos.

À minha orientadora, professora Dra. Daniela Priscila Marchi-Salvador, por ser uma verdadeira mãe acadêmica: amiga, incentivadora, companheira de bancada, proativa, paciente, e principalmente, a pessoa com quem eu aprendi a fazer ciência corretamente.

À minha amiga Erica por compartilhar de cada momento da realização desta pesquisa, sendo também amiga, companheira de bancada e uma das pessoas mais disponíveis que eu já conheci.

Aos meus amigos Layssa, Micaela, Pedro, Carol e Anna por toda a ajuda prestada durante o desenvolvimento deste projeto, vocês foram fundamentais.

Às Dirigentes da Faculdade Santa Maria (Ana Goldfarb e Sheylla Lacerda), pela compreensão e flexibilização no expediente de trabalho para realização do Mestrado.

Aos meus amigos de vida, por terem entendido os momentos de ausência e, ainda assim, desejarem o meu sucesso nesta jornada.

A todos os meus professores que serviram de inspiração e incentivo para continuar na área acadêmica.

Aos brasileiros que, por meio de seus impostos, financiaram a oferta do curso de Pós-Graduação stricto sensu em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a construção desta pesquisa.

AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE O EFEITO ANTICOAGULANTE DE FOSFOLIPASES A₂ ISOLADAS DE PEÇONHAS DE SERPENTES DOS GÊNEROS *Bothrops* E *Crotalus* E FÁRMACOS ANTICOAGULANTES

Resumo

A prevalência de acidentes ofídicos é um problema de saúde pública que causa significativo impacto econômico e social. O Brasil é o país da América do Sul com maior índice de emponhamento registrado, com aproximadamente 29 mil casos anuais. Dentre os componentes que exercem papel central na sintomatologia do emponhamento, as Fosfolipases A₂ (PLA₂s) atuam sobre substratos hidrolisando fosfolipídios de biomembranas. A coagulação sanguínea ocorre pela ativação de fatores de coagulação, juntamente com cálcio e plaquetas, e esses fatores são possíveis alvos para a atuação das PLA₂s. No presente estudo foram avaliados os efeitos farmacológicos de PLA₂s ofídicas, dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, na hemostasia secundária e proposto um mecanismo provável de ação anticoagulante dessas proteínas. Foram avaliados, *in vitro*, o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) de amostras de plasma humano citratado na presença de quantidades distintas de cinco fármacos anticoagulantes ou das PLA₂s. Nenhuma das PLA₂s avaliadas causou significativo prolongamento do TP, enquanto o TTPa apresentou alterações significativas para todas as PLA₂s. As Asp49-PLA₂s básicas botrópicas foram classificadas como fortemente anticoagulantes; as Asp49-PLA₂s ácida botrópica e básica crotálica foram fracamente anticoagulantes, enquanto todas as Lys49-PLA₂s foram moderadamente anticoagulantes. Foram realizados estudos, *in silico*, alinhamento múltiplo, filogenia e interação entre as PLA₂s e os Fatores IXa e Xa. Em conclusão, as PLA₂s podem interferir na cascata de coagulação por três mecanismos independentes ou pela combinação deles: i) inibição da formação do complexo tenase observado nas Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s básicas botrópicas que interagem com a subunidade B dos fatores IXa ou Xa, podendo causar um impedimento estérico; ii) modulação alostérica dos Fatores IXa e Xa induzida pela interação das Lys49-PLA₂s através da região de C-terminal, iii) hidrólise de fosfolipídios e/ou competição das PLA₂s cataliticamente ativas com os fatores de coagulação pela superfície lipídica.

Palavras-chave: Estudos *in silico*. Hemostasia. Inibidor do Fator IXa. Inibidor do Fator Xa. Proteínas ofídicas.

COMPARATIVE EVALUATION BETWEEN THE ANTICOAGULANT EFFECTS OF ISOLATED PROTEINS FROM SNAKE VENOM OF THE GENRES *Bothrops* AND *Crotalus* AND COMMERCIAL ANTICOAGULANT DRUGS

Abstract

The prevalence of snakebites is a public health problem that causes significant impact economically and socially. In South America, Brazil has the highest recorded rate of snakebites, with approximately 29,000 cases per year. Of the components that play a central role in the symptomatology of snakebites, phospholipases A₂ (PLA₂s) acts on substrates by hydrolyzing biomembranes phospholipids. Coagulation occurs by the activation of clotting factors together with calcium and platelets, and these factors are possible targets for PLA₂s to act. In the present study, the pharmacological effects of PLA₂s from *Bothrops* and *Crotalus* snake venom on secondary hemostasis were evaluated and a probable mechanism of the anticoagulant action of these proteins was proposed. In vitro, Prothrombin Time (PT) and Partial Thromboplastin Time (PTT) of citrated human plasma samples were evaluated in the presence of different quantities of the five anticoagulant drugs or the PLA₂s. None of the evaluated PLA₂s caused significant PT prolongation, while the aPTT demonstrated significant changes caused for all PLA₂s. Asp49-PLA₂s basic (bothropic) were classified as strong anticoagulant; Asp49-PLA₂s acidic (bothropic) and basic (crotalic) were weak anticoagulant; while all Lys49-PLA₂s were moderate anticoagulant. In silico studies, multiple alignment, phylogeny and interaction between PLA₂s and Factors IXa and Xa were performed. In conclusion, PLA₂s can interfere in the coagulation cascade by three independent mechanisms, or a combination of them: i) inhibition of the tenase complex formation observed in Asp49-PLA₂s basic (bothropic) and Lys49-PLA₂s. These PLA₂s interact with the B subunit of factors IXa or Xa, which may cause a steric hindrance; ii) allosteric modulation of Factors IXa and Xa induced by the interaction of Lys49-PLA₂s through the C-terminal region, iii) phospholipids hydrolysis and/or competition of catalytically active PLA₂s with the clotting factors for the lipid surface.

Keywords: Factor IXa inhibitor. Factor Xa inhibitor. *In silico* studies. Haemostasis. Ophidian proteins.

Lista de Abreviaturas e Siglas

Asp49-PLA ₂	Fosfolipase A ₂ que possui um resíduo de ácido aspártico na posição 49
LTCs	Lectinas Tipo-C
Lys49-PLA ₂	Fosfolipase A ₂ que possui um resíduo de lisina na posição 49.
PBS	Solução Salina Tamponada, do inglês Phosphate Buffered Saline.
PLA ₂	Fosfolipase A ₂ do inglês Phospholipase A ₂
svLAAOs	L-Aminoácido Oxidases
svMPs	Metaloproteinases de veneno de serpentes
svSPs	Serinoproteinases de veneno de serpentes

As abreviaturas, siglas e símbolos que foram utilizados nesta pesquisa e que não constam na lista acima encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura terciária da PLA ₂ s de monômero de PrTX-III de <i>Bothrops pirajai</i> (PDB id: 1GMZ).....	22
Figura 2 - Cascata da Coagulação e respectivos inibidores da coagulação	25
Figura 3 - Estrutura Molecular de anticoagulantes. Inibidores diretos do Fator Xa: A Apixabana., B. Rivaroxabana. C. Dabigatana, D. Heparina sódica e E. Enoxaparina sódica.....	31
Figura 4 - Avaliação da atividade anticoagulante da Lys49-PLA ₂ s em cinco diferentes quantidades (1,25; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0µg). TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de p>0,05. Valores de p <0,05 foram consideram significativo (*: valor de p<0,01; **: valor de p<0,001; ***: valor de p<0,0001 e ****: valor de p<0,00001).....	42
Figura 5 - Avaliação da atividade anticoagulante da Asp49-PLA ₂ s (básicas e ácida) em cinco diferentes quantidades (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0µg). TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de p>0,05. Valores de p <0,05 foram consideram significativo (*: valor de p<0,01; **: valor de p<0,001; ***: valor de p<0,0001 e ****: valor de p<0,00001).....	44
Figura 6 - Avaliação do efeito anticoagulante de fármacos em cinco diferentes quantidades. TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de p>0,05. Valores de p <0,05 foram consideram significativo (*: valor de p<0,01; **: valor de p<0,001; ***: valor de p<0,0001 e ****: valor de p<0,00001).	45
Figura 7 - Árvore filogenética das PLA ₂ s em estudo. Lys49-PLA ₂ s básicas botrópicas estão na cor verde, Asp49-PLA ₂ s botrópicas estão em azul, Asp49-PLA ₂ s básicas botrópicas estão na cor amarela e Asp49-PLA ₂ s ácida botrópicas está na cor vermelha.	47
Figura 8 – interação Fator Xa com os fármacos apixabana (PDB id. 2P16) e rivaroxabana (PDB id. 2w26).	48

Figura 9 - Complexo Protrombinase obtido da *Pseudonaja textilis* (PDB id. 4BXS) com o Fator Xa substituído pelo Fator Xa humano (PDB id. 2W26). O Fator Va está colorido em cinza o Fator de coagulação Xa está com a subunidade A colorida em verde e a subunidade B colorida em rosa), ambos os fatores estão desenhados em superfície. A região do sítio ativo do Fator Xa está colorida em verde oliva e a região denominada sítio de ligação à heparina está colorida em azul marinho.49

Figura 10 - O Fator de coagulação Xa está com a subunidade A colorida em verde claro e a subunidade B colorida em rosa, ambos desenhados em superfície. As Asp49-PLA₂s básicas botrópicas estão representadas na cor azul, a Asp49-PLA₂ ácida está representada na cor vermelha e as Asp49-PLA₂ básicas crotálicas estão representadas na cor amarela.51

Figura 11 - O Fator de coagulação Xa está com a subunidade A colorida em verde claro e a subunidade B colorida em rosa, ambos desenhados em superfície. As Lys49-PLA₂s básicas botrópicas estão representadas na cor verde.....52

Figura 12 - Resultado do experimento *in silico* (ancoragem molecular) de Asp49-PLA₂s ligadas ao Fator IXa da coagulação. O Fator de coagulação IXa (PDB id: 1RFN) está desenhado em superfície e colorido na cor cinza, a subunidade B está representada em magenta e a região de ligação ao Fator VIII foi destacada em laranja.54

Figura 13- Resultado do experimento *in silico* (ancoragem molecular) de Asp49-PLA₂s ligadas ao Fator IXa da coagulação. O Fator de coagulação IXa (PDB id: 1RFN) está desenhado em superfície e colorido na cor cinza, a subunidade B está representada em magenta e a região de ligação ao Fator VIII foi destacada em laranja.55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos principais fármacos anticoagulantes orais inibidores diretos do Fator IIa ou do Fator Xa.....	29
Tabela 2 – Distribuição das PLA ₂ s quanto à espécie da serpente, da classe (Lys49 ou Asp49) e ao caráter ácido ou básico da PLA ₂	35
Tabela 3 – Descrição do nome comercial das características e das quantidades de fármacos anticoagulantes utilizadas nos experimentos in vitro.....	36
Tabela 4 – Caracterização da ancoragem das PLA ₂ s ao Fator Xa.....	50
Tabela 5 - Classificação das PLA ₂ s dentro do modelo eletrostático Fator IXa	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. ACIDENTES OFÍDICOS.....	16
1.2. SERPENTES DA FAMÍLIA VIPERIDAE	17
1.2.1 Gênero <i>Bothrops</i>	18
1.2.2 Gênero <i>Crotalus</i>	18
1.3. COMPOSIÇÃO DE PEÇONHAS OFÍDICAS	18
1.4. FOSFOLIPASES A ₂ : ATIVIDADES E TOXICIDADE.....	21
1.5. HEMOSTASIA E A CASCATA DA COAGULAÇÃO.....	24
1.6.1 Via <i>intrínseca</i>	26
1.6.2 Via <i>extrínseca</i>	27
1.6.3 Via <i>comum</i>	27
1.6. ATUAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTICOAGULANTES.....	28
1.6.1 <i>Apixabana</i>	29
1.6.2 <i>Rivaroxabana</i>.....	30
1.6.3 <i>Heparina sódica e enoxaparina sódica</i>.....	30
1.6.4 <i>Dabigratana</i>	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.2. OBJETIVO GERAL	32
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. LOCAL DA REALIZAÇÃO DO ESTUDO	33
3.2. POPULAÇÃO E AMOSTRA	33
3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO	33
3.4. INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS DA COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO.....	33
3.5. DESCARTE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	34
3.6. OBTENÇÃO DAS PLA ₂ S, DOS FÁRMACOS E DOS KITS DE COAGULAÇÃO ..	34
3.7. AVALIAÇÃO DE EFEITO COAGULANTE E/OU ANTICOAGULANTE	37
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS.....	38
3.9. <i>DOCKING</i> MOLECULAR E ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	38
3.10. ALINHAMENTO MÚLTIPLO E FILOGENIA.....	39
3.11. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	40
3.12. RISCOS E BENEFÍCIOS DA PESQUISA.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	41

4.1.1	Atividade coagulante ou atividade anticoagulante de Fosfolipases A ₂ ..	41
4.1.2	Fármacos anticoagulantes	44
4.2	EXPERIMENTOS <i>IN SILICO</i>	46
4.2.1	Alinhamento múltiplo de sequências das PLA ₂ s	46
4.3	ANCORAGEM MOLECULAR	47
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICES	77
	APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO PRODUZIDO DURANTE O PERÍODO MAIS RESTRITIVO DA PANDEMIA DE COVID-19 EM PARALELO AO DESENVOLVIMENTO DA DISSERTAÇÃO	78
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	88
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. ACIDENTES OFÍDICOS

As serpentes são animais bem adaptados aos mais diversos ambientes, exercendo um papel importante na relação entre os seres vivos e no equilíbrio da teia alimentar de diversos animais (CARDOSO et al., 2003). A maior biodiversidade de serpentes é encontrada nas regiões tropicais. O Brasil possui 470 espécies de serpentes descritas, das quais 65 são consideradas peçonhentas e pertencentes às famílias Viperidae e Elapidae (THE REPTILE DATABASE, 2021). A família Viperidae tem por representantes os gêneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus*, enquanto que a família Elapidae é dividida em 34 espécies classificadas em um único gênero, *Micrurus*, presente em todo território nacional (SILVA; BERNARDE; ABREU, 2015; UETZ, 2021).

Acidentes ofídicos constituem um importante problema de saúde pública no Brasil; eles são agravos de notificação compulsória desde o ano de 1986 e, conforme define a portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016, do Ministério da Saúde, a Secretaria Municipal de Saúde tem por obrigação informar o acidente ofídico às demais esferas de gestão em saúde em até 24 horas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

No Brasil, estudos epidemiológicos registraram 57.699 notificações de ofidismo entre os anos de 2000 e 2009. Desses casos, 35.112 ocorreram em população não agropecuária, indicando que este é um problema que não se reserva somente às populações provenientes da zona rural e/ou do trabalho no campo (MISE, 2014). Corroborando com o referido dado, (FEITOSA; MISE; MOTA, 2020) relataram que apenas 31% dos casos de ofidismo ocorridos entre 2007 e 2015 em população agropecuária.

Martis e colaboradores (2012) relataram que, mesmo tendo grande incidência e grande impacto econômico e social, os acidentes ofídicos ainda não recebem a devida atenção, não figurando como prioridade pelos governantes e agentes responsáveis pela gestão de saúde de países em desenvolvimento, como o Brasil, esses dados são corroborados pelo estudo de Feitosa et al., (2020) que acrescentam que o ofidismo é um evento complexo por envolver fatores socioeconômicos e ambientais como fatores de risco.

O Brasil é o país da América do Sul com maior índice de envenenamento registrado, com aproximadamente 29 mil casos anuais (BERNARDONI et al., 2014; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2018). Segundo dados registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificações – SINAN, somente no estado da Paraíba ocorreram, entre 2005 e 2010, mais de 3.000 acidentes ofídicos envolvendo *i.* majoritariamente homens; *ii.* faixa

etária entre 20 e 39 anos, *iii.* predominância de casos na região do Cariri e *iv.* serpentes do gênero *Bothrops* (SARAIVA *et al.*, 2012).

Em 2019, as serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias*, popularmente conhecidas como jararacas, foram responsáveis por 77,97% dos acidentes ofídicos identificados, com letalidade de 0,35%. As serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis) apresentaram incidência de 9,74% nos casos registrados e letalidade de 0,11%, enquanto que as do gênero *Lachesis* (surucucus) foram responsáveis por 2,31% dos acidentes ofídicos, com letalidade de 0,01%. O gênero *Micrurus* (corais verdadeiras) esteve envolvido em menos de 1,22% dos casos de ofidismo e as serpentes não peçonhentas foram responsáveis por 8,76% (com letalidade de 0,01%) dos casos registrados (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Os acidentes ofídicos ocorrem com maior frequência nos períodos de intensa atividade humana no campo e nas estações quentes e úmidas, as quais coincidem, na maioria dos estados, com o período mais chuvoso (LEMOS *et al.*, 2009). Os acidentes ofídicos foram classificados como a segunda causa de envenenamento humano, ficando atrás apenas da intoxicação por medicamentos em 2016 (LEOBAS; SEIBERT; FEITOSA, 2016). Porém, no ano de 2018, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX classificou o acidente ofídico como a sexta causa em número de intoxicações, no entanto, o ofidismo figurou em quarto lugar entre a causa de óbitos por intoxicações (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

1.2 SERPENTES DA FAMÍLIA VIPERIDAE

A família Viperidae compreende um grupo de serpentes que possuem um aparato bucal altamente especializado para a injeção de peçonha em suas presas/vítimas, sendo, portanto, um importante grupo causador de acidentes ofídicos, as serpentes dos gêneros pertencentes a esta família apresentam como característica a sinamorfia da presença de fosseta loreal (CARRASCO *et al.*, 2012). Conforme consta no Banco de Dados The Reptile Database, a Família Viperidae compreende três subfamílias: Azemiopinae (contendo 2 espécies), Crotalinae (contendo 271 espécies) e Viperinae (contendo 101 espécies), totalizando 374 espécies relatadas até o presente momento (UETZ, 2021).

1.2.1 Gênero *Bothrops*

As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam hábitos noturnos e habitam zonas rurais e locais urbanos que facilitam seus hábitos predatórios (PINHO; PEREIRA, 2001). As espécies desse gênero possuem adaptações anatômicas como presas para inoculação da peçonha e a presença de fosseta loreal, que funciona como termoreceptor (SILVA; BOCHNER; GIMÉNEZ, 2011). Este gênero é constituído por uma diversidade de serpentes totalizando 46 espécies, sendo a *Bothrops atrox* a primeira espécie relatada em 1758 e, no ano de 2021, a *Bothrops oligobalius* foi a última espécie relatada (UETZ, 2021).

1.2.2 Gênero *Crotalus*

As serpentes do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, foram responsáveis por quase 10% dos acidentes ofídicos no ano de 2017. As serpentes desse gênero não possuem hábito de atacar, no entanto quando se sentem ameaçadas emitem um ruído proveniente da presença de um guiso em sua calda (PINHO; PEREIRA, 2001). O gênero *Crotalus* é composto por muitas espécies, com ocorrência desde o sul do Canadá ao norte da Argentina. No Brasil, as serpentes deste gênero pertencem a uma única espécie, a *Crotalus durissus* encontradas principalmente em regiões semiáridas, com predominância na caatinga nordestina. Esta espécie está dividida em sete subespécies *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *Crotalus d. terrificus* e *Crotalus d. trigonicus* (RODRIGUES *et al.*, 2016; UETZ, 2021).

1.3 COMPOSIÇÃO DE PEÇONHAS OFÍDICAS

Peçonhas ofídicas são compostas por uma combinação complexa de substâncias farmacológicas e bioquimicamente ativas, sintetizadas e armazenadas em glândulas especializadas que se ligam às presas através de dutos (ALAPE-GIRÓN *et al.*, 2008; CALVETE *et al.*, 2009; ZAQUEO, 2011). Cerca de 90 a 95% do peso seco de peçonhas ofídicas é composto por proteínas, as quais são as maiores responsáveis pelos efeitos tóxicos e farmacológicos desencadeados pelo ofidismo (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; NUNES; NASCIMENTO; GOMES, 2021).

A diversidade de componentes proteicos e as atividades biológicas desempenhadas pelas proteínas que compõem as peçonhas ofídicas podem variar a depender do tamanho, do sexo, idade, hábito alimentar e comportamental, mudanças sazonais e climáticas e

ontogenia da serpente (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Contudo, o alto grau de variabilidade da peçonha pode gerar mudanças significativas na fisiopatologia do envenenamento ofídico.

Dentre os componentes que exercem papel central na sintomatologia dos acidentes ofídicos, podem ser citadas proteínas das classes das metaloproteases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, hialuronidases, acetilcolinesterases, aminotransferases, ativadores de fator X da coagulação, serinoproteases, nucleotidases e fosfodiesterases. Os compostos não-enzimáticos englobam as miotoxinas sem atividade de fosfolipases A₂, lectinas tipo C, fatores de crescimento, desintegrinas, e proteínas secretórias ricas em cisteínas. Também fazem parte da composição da peçonha de serpentes peptídeos, aminoácidos, aminas biogênicas, carboidratos, citrato e nucleotídeos, íons cálcio, cobalto, magnésio, manganês, ferro, zinco, sódio e fosforo (CALKOSINSKI *et al.*, 2010; CALVETE, 2013; NUNES; NASCIMENTO; GOMES, 2021; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004).

As serinoproteases, metaloproteases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, 5-nucleotidases, desintegrinas e lectinas do tipo C ofídicas podem afetar a hemostasia em diferentes pontos, atuando direta ou indiretamente nos fatores da cascata de coagulação e/ou na integridade vascular ou agregação plaquetária (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Efeitos sobre os tecidos do sistema cardiovascular e renal também podem ser induzidos por componentes das peçonhas ofídicas exercendo amplos efeitos fisiológicos e fisiopatológicos (ALVES *et al.*, 2018; HUTTON; WARRELL, 1993).

Uma das frações proteicas mais estudadas das peçonhas ofídicas são as Fosfolipases A₂ (PLA₂s). Estudos homeostáticos envolvendo svPLA₂s básicas indicaram que essas enzimas apresentam considerável atividade anticoagulante por inibir a coagulação através de vários mecanismos: *i.* hidrólise e destruição de fosfolipídios pró-coagulantes; *ii.* competição, por meio de antagonismo com proteínas coagulantes para ligação à superfície lipídica; e *iii.* interação com o Fator Xa, impedindo a formação do complexo protrombinase (FXa/FVa) e retardando a formação de trombina (FAURE; GOWDA; MAROUN, 2007). Além disso, Kini (2005) classificou a potência anticoagulante exercida pelas PLA₂ como forte, fraca ou ausente e propôs um mecanismo molecular (sítio anticoagulante específico) de interação entre as PLA₂s de peçonhas ofídicas e os componentes plasmáticos.

As L-Aminoácido Oxidases (svLAAOs, E.C. 1.4.3.2) são flavoenzimas que realizam a desaminação oxidativa de L-aminoácido em α -cetoácido gerando como produtos secundários amônia e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Algumas LAAOs apresentam atividades diretas, tais como a agregação plaquetária, citotoxicidade, indução de edema e atividade bactericida, enquanto que seus metabólitos secundários podem induzir a apoptose

e outros efeitos biológicos (ABDELKAFI-KOUBAA *et al.*, 2014; ANDE *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2012; DU; CLEMETSON, 2002; LAZO *et al.*, 2017; LEWIS; GARCIA, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2009; TAN; FUNG, 2008; ULLAH, 2020). Em adição, Lazo *et al.* (2017) relataram que o peróxido de hidrogênio produzido nas reações catalisadas pelas LAAOs de *Bothrops atrox* promoveram, *in vitro*, a inibição da ativação e da agregação plaquetária interferindo diretamente na ligação entre as integrinas GPbII/aIII e o fibrinogênio o que impede a formação do tampão plaquetário.

As Metaloproteínases (svMPs, E.C. 3.4.24) são proteínas do tipo endopeptidases que necessitam de cálcio ou zinco ligados ao seu sítio ativo para realizar sua atividade enzimática. Atualmente as svMPs estão subdivididas em três classes *i.* svMP-I composta apenas pelo sítio metaloproteínase; *ii.* svMP-II composta por um sítio metaloproteínases e um sítio desintegrina; *iii.* svMP-III composta pelos domínios metaloproteínases, desintegrinas e um domínio rico em cisteínas (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

As metaloproteases pertencentes ao grupo svMP-III são as que apresentam um maior potencial hemorrágico, especialmente quando comparadas ao grupo svMP-I (BAILON CALDERON *et al.*, 2020; TERRA *et al.*, 2009). As svMPs são responsáveis pela ação hemorrágica e causam os efeitos mais drásticos do empeçonhamento, pois promovem proteólise de componentes da matriz celular (colágeno tipo IV, laminina e fibronectina), de proteínas plasmáticas (fibrinogênio, fator de von Willenbrand e protrombina) e de proteínas de superfície (integrinas e caderinas).

As svMPs também estão envolvidas no processo de inibição da agregação plaquetária, pois possuem a sequência de aminoácido RGD (Arginina-Glicina-Aspartato) a qual interage diretamente com integrinas e impede a ligação do fibrinogênio às plaquetas. Complementarmente, essas enzimas causam mionecrose, coagulopatias, equimose, formação edema e indução de resposta inflamatória (BERNARDONI *et al.*, 2014; CUNHA; MARTINS, 2012; PAULA *et al.*, 2014).

As Serinoproteases (svSPs, E.C. 3.4.21) são glicoproteínas monoméricas que possuem em seu sítio ativo resíduos de histidina (His57), ácido aspártico (Asp102) e serina (Ser195). Estão associadas a desordens hemostáticas por possuírem ação nos componentes da cascata da coagulação e do sistema fibrinogenolítico. Algumas dessas serinoproteases são Thrombin-Like (svTLE), ou seja, simulam a atividade da trombina catalisando a conversão de fibrinogênio em fibrina sem a participação direta da trombina endógena. Outras svSPs atuam bloqueando a ativação do fator XIII (fator responsável por realizar as ligações cruzadas dos monômeros de fibrina, dando resistência ao coágulo)

causando a formação de microcoágulos mais sensíveis a ação da plasmina levando a um estado de “desfibrinogenação” (MONTEIRO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2010).

Em 2006, Kini descreveu três diferentes tipos de svSPs: *i.* ativadores de proteína C que atuam na ativação da proteína C com consequente inativação dos fatores FVa e FVIIIa da coagulação; *ii.* svTLEs que degradam o fibrinogênio por meio da clivagem e liberação dos fibrinopeptídeos A e B; e *iii.* as fibrinogenases que causam destruição do fibrinogênio por um mecanismo ainda não revelado. Há também svSPs que participam da ativação do fator V, da fibrinogenólise, da ativação do plasminogênio e da indução da agregação plaquetária. Algumas dessas enzimas têm sido usadas como anticoagulantes em testes clínicos e cirúrgicos, bem como reagentes em testes de coagulação (MARSH; VAUGHAN, 2005; SERRANO; MAROUN, 2005; ZAQUEO, 2011).

As Lectinas Tipo-C (LTCs) presentes nas peçonhas das famílias Viperidae, Elapidae e Crotalidae apresentam um domínio de reconhecimento a carboidratos (monossacarídeos ou oligossacarídeos). Esse reconhecimento ocorre por meio de uma associação dependente de íons cálcio. As proteínas atuam nos receptores de membrana das hemácias induzindo a aglutinação eritrocitária, além disso, podem participar de uma grande variedade de atividades biológicas, tais como adesão celular, endocitose e neutralização de agentes patogênicos (WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992). Algumas LTCs, denominadas Lectinas do tipo-C-like, apresentam um domínio de reconhecimento de carboidrato incompleto, o que leva a perda da capacidade hemaglutinante (ARAGÓN-ORTIZ; MENTELE; AUERSWALD, 1996; MORITA, 2004; OGAWA *et al.*, 2005; WEIS; DRICKAMER; HENDRICKSON, 1992).

1.4 FOSFOLIPASES A₂: ATIVIDADES E TOXICIDADE

As Fosfolipases A₂(svPLA₂s, E.C. 3.1.1.4) são proteínas que atuam sobre substratos lipídicos catalisando a hidrólise da ligação éster *sn*-2 (*sequentially numbered*) dos fosfolipídios de biomembranas. Como produto dessa reação liberam quantidades equimolares de ácidos graxos, entre eles o ácido oleico, que pode servir de reserva energética; o ácido araquidônico, que é precursor de eicosanoides mediadores do processo inflamatório) e lisofosfolipídeos que atuam na sinalização celular e perturbação de membranas) (ARNI; WARD, 1996; BURKE; DENNIS, 2009).

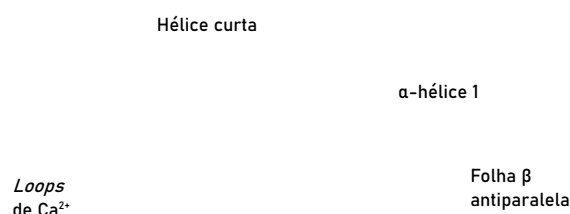
As Fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas ubíquas na natureza, sendo especialmente encontradas em secreções pancreáticas e em peçonhas animais (KINI; EVANS, 1989).

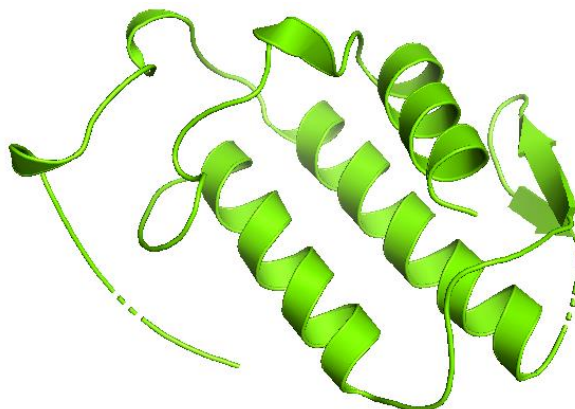
Essas enzimas possuem massa molecular entre 12-14kDa e ótima atividade em pH 7,0 (ARNI; WARD, 1996). O mecanismo de ação das PLA₂s é bem conservado consistindo em uma díade His-Asp tendo o cálcio (Ca²⁺) como cofator essencial (TEIXEIRA *et al.*, 2020). As enzimas da superfamília de fosfolipases A₂ podem ser agrupadas em 6 grandes grupos: fosfolipases secretadas; fosfolipases citosólicas; fosfolipases independentes de cálcio; fator de ativação plaquetária acetil-hidrolase; Fosfolipase adiposo específico, fosfolipases lisossomais; e são divididas em 17 subgrupos (IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII e XIV) (BURKE; DENNIS, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2020).

As PLA₂s ofídicas apresentam conservação e semelhança estrutural entre as enzimas das classes I (gêneros *Elapidae* e *Hydrophidae*) e da classe II (gêneros *Crotalidae* e *Viperidae*). A estrutura tridimensional é constituída por duas longas α-hélices ligadas por pontes dissulfeto, um loop de ligação do Ca²⁺ (hélices 2 e 3; resíduos 37-54 e 90-109; respectivamente). As cadeias laterais dos aminoácidos hidrofílicos estão voltadas para o interior da proteína, salvo os resíduos que compõem o sítio catalítico (His48, Asp49, Tyr52 e Asp99). Nas PLA₂s do grupo IA, há uma região adicional nomeada de “loop elapídico” (dois a três aminoácidos inseridos na região 52-65). Diferenças marcantes entre o grupo IA e IIA são: presença da ponte dissulfeto Cys11-Cys77 no grupo IA em substituição à ponte dissulfeto no Cys51-Cys133 do grupo IIA, essa ponte dissulfeto a mais é permitida graças a adição de 5 a 7 da região de C terminal de PLA₂s IIA (ARNI; WARD, 1996).

As PLA₂s ofídicas do grupo IIA apresentam em sua estrutura primária de 120 a 123 resíduos de aminoácidos que seguem o modelo de numeração da PLA₂ de pâncreas bovino proposto por Renetseder *et al.* (1985). A estrutura tridimensional destas PLA₂s é iniciada por uma região N-terminal (resíduos 1 a 12) representada pela α-hélice 1, a região está envolvida na ligação e orientação de substratos à proteína. A α-hélice 1 é seguida por uma α-hélice curta constituída pelos resíduos 18 a 23. O *loop* de ligação do íon Ca²⁺ é formado pelos resíduos 25 a 34, o qual é seguido pela α-hélice 2 composta pelos resíduos 40 a 55. Essa região se liga a uma folha β antiparalela que compreende os resíduos 75-77 e 82-84. Na sequência tem-se a α-hélice 3 formada pelos resíduos 90 a 107 e o *loop* de C-terminal (108 a 133), o qual consiste em uma região bastante flexível da proteína. Os resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 formam o sítio catalítico dessas enzimas (ARNI; WARD, 1996; DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; DE AZEVEDO JR *et al.*, 1999).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura terciária da PLA₂s de monômero de PrTX-III de *Bothrops pirajai* (PDB id: 1GMZ).





Fonte: elaborado pelo autor

De uma forma geral, as PLA₂s apresentam uma gama de atividades biológicas como atividade neurotóxica, miotóxica, indução de edema, agregação plaquetária, anticoagulante, hipotensiva e inflamatória. Apesar de uma grande quantidade de atividades desenvolvidas, frequentemente as PLA₂s ofídicas apresentam maior especificidade para um desses efeitos biológicos e uma atividade reduzida ou ausente para os demais efeitos biológicos (CUNHA; MARTINS, 2012).

Entre as PLA₂s do Grupo II, são encontradas duas isoformas comumente relatadas como Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s, o primeiro grupo apresentando forte atividade catalítica e o segundo grupo apresenta baixa ou não apresenta atividade catalítica (MARCUSSEI *et al.*, 2007); outras variações na posição 49 da estrutura primária destas proteínas já foram relatadas, tais como: Ser49, Asn49 e Arg49 (GALLACCI; CAVALCANTE, 2010).

A primeira vez em que PLA₂-Lys49 foi relatada foi na pesquisa de Maraganore e colaboradores (MARAGANORE *et al.*, 1984) no qual relatam que a substituição do resíduo de aminoácido Asp-49 por uma Lys-49 (anteriormente a este estudo as PLA₂s eram sempre relatadas como tendo um ácido aspartico invariável na posição 49) promove alterações funcionais na alça de ligação ao cálcio e na forma de ligação e/ou na preferência pelo tipo de substrato.

No entanto, mesmo na ausência da atividade catalítica as PLA₂-Lys49 continuam a apresentar toxicidade, em especial, miotoxicidade, e isto pode acontecer, pois, apesar de perder a capacidade de ligar Ca²⁺ sua atividade toxica se desenvolve por meio de grupos de resíduos catiônicos/hidrofóbicos/aromáticos presentes entre os aminoácidos 115 a 129 de C-terminal dessas proteínas (NÚÑEZ; ANGULO; LOMONTE, 2001). Dessa forma, a toxicidade ou as atividades farmacológicas produzidas por PLA₂s podem ser dependentes ou independentes de catálise (KINI; EVANS, 1989).

Outra importante característica de PLA₂S-Lys49, além de possuírem alta concentração de aminoácidos carregados positivamente na região de C-Terminal, é a presença de grande número de lisinas conservadas em sua estrutura (aproximadamente 15% do total de aminoácidos), em conjunto, essas características dão origem a uma superfície de contato que é altamente positiva quando comparado com lado oposto da molécula (OWNBY *et al.*, 1999).

Aparentemente, as PLA₂-Lys49 apresentam um maior nível de conservação de suas sequências alcançando níveis entre 70 a 95% de similaridade, diferentemente de PLA₂-Asp49 que podem exibir baixos níveis de similaridade com porcentagem de conservação partindo de 49% (OWNBY *et al.*, 1999).

1.5 HEMOSTASIA E A CASCATA DA COAGULAÇÃO

A hemostasia consiste em um processo fisiológico que busca manter o sangue dentro dos vasos sanguíneos, garantindo a integridade dos vasos, bem como mantendo o sangue em forma fluida e não coagulada. Quando houver extravasamento de sangue ou início da coagulação, o sistema hemostático será responsável pelo controle da hemorragia e pelo limite da formação de coágulos (HOFFBRAND; MOSS, 2013). O endotélio vascular, as plaquetas, os fatores de coagulação, o íon cálcio e o sistema fibrinolítico são componentes do sistema hemostático. De modo didático, a hemostasia pode ser dividida em hemostasia primária, hemostasia secundária e hemostasia terciária (FRANCO, 2001).

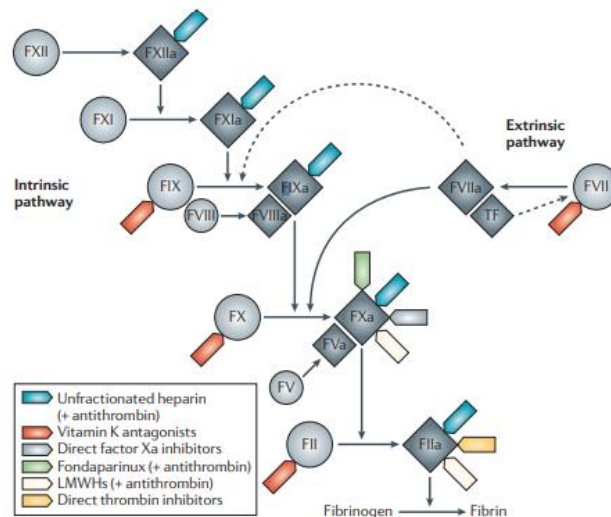
A hemostasia primária é a fase da formação do trombo não envolvendo os fatores de coagulação. Considerando que houve uma lesão vascular, as plaquetas são ativadas, haverá liberação de substâncias sinalizadoras e quimiotáticas, e consequentemente agregação plaquetária impedindo o extravasamento de sangue (GALE, 2011). A hemostasia secundária é a fase na qual os fatores de coagulação são ativados levando a produção de fibrina por meio da clivagem de fibrinogênio, induzida por trombina. Por fim, a hemostasia terciária se encarregará de limitar a formação de trombos e de fibrina a partir da ativação do processo de fibrinólise desobstruindo o lúmen do vaso sanguíneo, reestabelecendo a hemostasia normal (RODRIGUES, 2012).

Dito de outra forma, a hemostasia se divide em 3 subsistemas: *i)* o sistema procoagulante produz uma rápida resposta localizada ao dano vascular, promovendo a formação de um tampão mecânico composto por plaquetas e fibrina; *ii)* o sistema anticoagulante atua inibindo componentes chaves, ou seja, fatores de coagulação fundamentais para o funcionamento do sistema procoagulante; *iii)* o sistema fibrinolítico atua

após a recuperação do tecido lesado e interrupção da hemorragia ao digerir proteoliticamente o tampão hemostático (BHAGAVAN, 2002).

A coagulação é vista classicamente como um processo no qual atuam os fatores de coagulação das vias intrínsecas, extrínseca e comum, sendo a via comum a convergência entre as vias intrínsecas e extrínsecas (figura 2). Na via comum ocorre a clivagem de trombina e produção de fibrina com objetivo final de formar um coágulo e manter a integridade da hemostasia. A via extrínseca da coagulação é ativada por meio da exposição do fator tecidual, enquanto a via intrínseca, também conhecida como via de contato, por ser ativada (*in vitro*) por contato com cargas negativas e/ou superfícies artificiais inicia-se com a ativação do fator XII (PUY; RIGG; MCCARTY, 2016).

Figura 2- Cascata da Coagulação e respectivos inibidores da coagulação



Fonte: Perzborn *et al.*, (2011)

A coagulação passa pelas etapas de iniciação, amplificação e propagação e nessas etapas estão envolvidos diversos componentes. Cabe ressaltar que os principais componentes são cálcio, fosfolípido, Fator XIII, Fator XII, Fator XI, Fator X, Fator IX, Fator VIII, Fator V, Fator II e Fator I. De forma complementar, atuam também na hemostasia as plaquetas e o Fator de Von Willenbrand e também as enzimas responsáveis pelo controle do crescimento do coágulo (BHAGAVAN, 2002).

1.6.1 Via intrínseca

A Via Intrínseca recebe esta denominação porque todos os fatores de coagulação desta via estão contidos na corrente sanguínea em sua forma inativa. A via intrínseca é composta pelos fatores XIII, XII, XI, IX, VIII (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

O Fator XIII é uma transaminase presente no plasma em sua forma inativa (zimogênio). Após a ativação do Fator XIII pela trombina (na presença de cálcio e fibrinogênio), a proteína passa a desempenhar sua função principal realizando ligações cruzadas entre monômeros de fibrina por meio de ligações covalentes, o que garantirá maior resistência física e resistência ao processo de fibrinólise (MOADDEL; FALLS; FARRELL, 2000; WILLIGE *et al.*, 2009).

O fator XII da coagulação é um zimogênio do Fator XIIa, o qual é uma serinoprotease que faz parte da via intrínseca da coagulação. O Fator XII é auto ativado quando entra em contato com moléculas ou superfícies carregadas negativamente que induzem uma modificação estrutural e o início da sua atividade proteolítica (WEIDMANN *et al.*, 2017).

Fator XI também é uma serinoprotease plasmática dependente de vitamina K encontrada na forma de zimogênio, sendo a única serinoprotease homodimérica envolvida na coagulação, uma vez que as demais são monoméricas. O Fator XI pode ser ativado por *feedback* positivo (pelos fatores XI e/ou VII ativados) (SMITH *et al.*, 2008) e pelo Fator XII por meio da “via de contato” (BANE; GAILANI, 2014). Níveis baixos de Fator XI causam sangramentos leves ou não implicam no risco de sangramento, porém, níveis aumentados estão correlacionados com ocorrência de doenças tromboembólicas (PINTO *et al.*, 2015). O fator XI ativado tem como função principal ativar o Fator IX dando seguimento a cascata da coagulação pela via intrínseca (EMSLEY; MCEWAN; GAILANI, 2010).

Fator IX também é dependente de vitamina K e está disponível na forma de zimogênio. Para desempenhar sua atividade como serinoprotease pode ser ativado tanto pela via intrínseca (Fator XI ativado e o íon cálcio), como na via extrínseca (Fator VII ativado, fator tecidual e íon cálcio). Após sua ativação, atua em associação com o cofator cálcio, fosfolípídios e o Fator VIIIa convertendo Fator X em Fator X ativado (SCHMIDT *et al.*, 2005). O Fator IX é fundamental na hemostasia e sua deficiência causa Hemofilia B, doença caracterizada por ocorrências de hemorragias graves (LAWSON; MANN, 1991).

Fator VIII da coagulação é um cofator necessário para a ação do fator IX. Na corrente sanguínea, circula complexado com o Fator de Von Willenbrand (FvW) o qual protege o Fator VIII da degradação pela Proteína C ativada (um fator anticoagulante). Ao chegar no

local da lesão vascular, o complexo Fator VIII/FvW é desfeito e libera o Fator VIII para associar-se aos fosfolípídios e ao Fator IX, formando o completo tenase intrínseco, o qual ativará o Fator X iniciando a via comum da coagulação. O Fator VIII possui uma concentração até 100 vezes menor do que os demais fatores da coagulação e é conhecido por ser o causador da Hemofilia A, quando é produzido de forma deficiente pelo organismo humano (LASSILA, 2019).

1.6.2 Via extrínseca

Fator tecidual é o componente fundamental do início da cascata da coagulação pela via extrínseca. Conforme seu nome sugere, é o único componente que não está circulando livremente no sangue. O Fator tecidual é expresso constitutivamente em células subendoteliais e, em níveis basais, em células do músculo liso vascular quando estimulados por mediadores como Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), trombina e histamina. O Fator tecidual desenvolve seu papel ao servir como receptor do Fator VII ativado, formando um complexo que ativará o fator X dando origem a via comum da coagulação. Indiretamente o Fator tecidual pode se associar ao Fator VII ainda inativo e este complexo pode ser ativado por Fator VII ativado ou pelo complexo Fator Tecidual/Fator VII ativado (DE MOERLOOSE; BOEHLEN, 2008).

O Fator VII é dependente de vitamina K, sendo o fator mais sensível à deficiência desta vitamina. Trata-se de uma serinoprotease que desempenha um papel central na cascata da coagulação atuando na ativação do Fator X pela via extrínseca, também pode ativar o Fator XI (via intrínseca). O Fator VII só passa a ser Fator VIIa após estar associado ao íon Ca^{2+} e ao Fator Tecidual (BJELKE *et al.*, 2007).

1.6.3 Via comum

Fator X, também conhecido como Fator de Stuart, é um fator de coagulação que circula na forma de zimogênio na corrente sanguínea e a sua conversão em Fator ativo demarca o início da via comum da coagulação. O Fator Xa caracteriza-se como uma serinoprotease, a qual compartilha alta similaridade com a tripsina e é convertida na sua forma ativa pelo complexo Fator IXa-Fator VIIIa ou pelo complexo Fator Tecidual-Fator VIIa. Após sua ativação o Fator X desempenha a atividade biológica de converter a protrombina em trombina por meio de proteólise, além disso, pode também levar a ativação de Fator VII,

Fator VIII e Fator V, iniciando um *loop* de retroalimentação da cascata (NEUENSCHWANDER, 2006).

Fator V é o precursor do Fator V ativado, e, juntamente com o Fator Xa, íon Ca^{2+} e fosfolipídios constituem o complexo protrombinase – responsável pela conversão de protrombina em trombina. O Fator V ativado é, na verdade, um cofator que possui alta capacidade de se ligar a fosfolipídios. Cerca de 80% do total do Fator V circula livremente no plasma e o restante está contido no granulo das plaquetas (RAND; KALAFATIS; MANN, 1994; SUN; EVATT; GRIFFIN, 1994).

Fator II, conhecido também como Trombina é uma proteína em sua forma ativa resultante da proteólise da protrombina. É essencial na manutenção da hemostasia secundária, desempenhando diversos papéis ao atuar desde a fase de iniciação até a fase de amplificação da cascata da coagulação (KRISHNASWAMY, 2013; NEGRIER; SHIMA; HOFFMAN, 2019). Como atividade principal, a trombina cliva o fibrinogênio para formar fibrina insolúvel impedindo a progressão da hemorragia. A trombina atua também na ativação de plaquetas, dos Fatores V, VIII, XI, da proteína C, do Inibidor da Fibrinólise Ativada pela Trombina – TAFI (HUNTINGTON, 2012).

O fibrinogênio é uma glicoproteína composta pelas cadeias polipeptídicas $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ e γ , encontrada no sangue de vertebrados. O fibrinogênio passa por uma clivagem proteolítica na qual peptídeos curtos das cadeias $\text{A}\alpha$ e $\text{B}\beta$ são clivados com consequente exposição dos seus sítios de polimerização, esse evento leva à formação de polímeros de fibrina (Fator I), a polimerização ocorre de forma espontânea e levam ao surgimento das fibras de fibrina (BUDZYNSKI; SHAINOFF, 1986).

1.6 ATUAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTICOAGULANTES

Atualmente é possível classificar os medicamentos anticoagulantes disponíveis em antagonistas da vitamina K e anticoagulantes orais diretos. Os antagonistas da vitamina K foram introduzidos no mercado a mais de 60 anos e contribuíram para um melhor manejo clínico de tromboembolismos, fibrilações atriais e em casos de substituição de valvas cardíacas. Apesar de tantas aplicações, essa classe cria grandes desafios em seu uso por apresentarem fácil interação medicamentosa e alimentar, estreita faixa terapêuticas e necessidade de monitoramento frequente de INR (razão normalizada internacional) a fim de evitar risco de sangramento grave mesmo em pacientes em ótimo controle da terapia (CHAN; SOBIERAJ-TEAGUE; EIKELBOOM, 2020). Os anticoagulantes orais diretos foram

projetados com objetivo de resolver os desafios enfrentados pelos antagonistas da vitamina K. Esses anticoagulantes orais diretos foram desenvolvidos especificamente para inibir um único fator da coagulação, além de possuírem menor interação medicamentosa e alimentar, serem administrados em doses fixas e não necessitarem de monitoramento regular (CHAN; SOBIERAJ-TEAGUE; EIKELBOOM, 2020).

O primeiro anticoagulante oral direto desenvolvido foi o Ximelagatran®. Foi introduzido após estudos clínicos de fase III com mais de 17 mil pacientes em todo o mundo. É um pro-fármaco que dá origem ao melagatran que, por sua vez, é um potente inibidor direto, competitivo, reversível do sítio ativo da trombina (FRANCIS, 2004). O Ximelagatran apresentou como efeito colateral uma alta hepatotoxicidade observada por meio do aumento das transaminases séricas em pacientes em uso prolongado do medicamento; embora não houvessem evidência de danos hepáticos permanentes, a Food and Drug Administration decidiu interromper sua licença em 2006 (CHAN; SOBIERAJ-TEAGUE; EIKELBOOM, 2020; FRANCIS, 2004).

Além do ximelagatran, outros anticoagulantes orais diretos foram desenvolvidos e, atualmente, estão licenciados como inibidores da trombina (dabigatran) e inibidores do Fator Xa (apixabana, betrixabana, edoxabana, rivaroxabana). No Brasil, rivaroxabana está registrado junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária desde 20 de julho de 2009, enquanto apixabana foi registrado na mesma agência em 04 de julho de 2011 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020).

Tabela 1 - Características dos principais fármacos anticoagulantes orais inibidores diretos do Fator IIa ou do Fator Xa.

	apixabana	dabigatran	rivaroxabana
Alvo	Fator Xa	Trombina	Fator Xa
Biodisponibilidade (%)	50	6–7	66
Ligação proteica (%)	87	35	92-95
T_{máx.} concentração (h)	1-3	2	2-4
Meia-vida (h)	8-15	12-14	9–13
Eliminação renal (%)	25	> 80	33
Metabolismo via citocromo P450(%)	<32	<2	57
Antídotos específicos	andexanet	idarucizumab	andexanet

Fonte: Adaptado de CHAN; SOBIERAJ-TEAGUE; EIKELBOOM (2020)

1.6.1 Apixabana

No Brasil, apixabana (figura 3A) recebe o nome comercial de Eliquis®; é um fármaco inibidor direto, oral, competitivo, reversível e altamente específico do Fator Xa (figura 2). Apresenta alta biodisponibilidade e tempo de meia vida de 8 a 15 horas, sua excreção

envolve metabolismo hepático por meio das enzimas CYP450 3A4 e por volta de 25% de excreção renal. Assim como rivaroxabana, apixabana não requer antitrombina III e inibe tanto o FXa livre quanto a forma ligado ao coágulo (AGUILAR; KUO; FREEMAN, 2013; BYON *et al.*, 2019). Apixabana prolonga o tempo de coagulação em testes laboratoriais usuais como Tempo de Protrombina, Razão Normalizada Internacional – INR e o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (BYON *et al.*, 2019).

1.6.2 Rivaroxabana

No Brasil, rivaroxabana (figura 3B) recebe o nome de Xarelto® e é um fármaco inibidor competitivo direto do Fator Xa por possuir alta afinidade tanto pelo Fator Xa (figura 1) livre como pelo Fator Xa ligado ao coágulo e não necessitar de antitrombina III para desempenhar seu papel. Possui ótima absorção quando ingerido junto a alimentos e um tempo de meia vida em torno de 5 a 9 horas; dois terços do medicamento são metabolizados por enzimas hepáticas CYP3A4/5 e CYP2J2 sendo o produto desta reação excretado por via renal, o terço restante é eliminado pela urina de forma inalterada (AGUILAR; KUO; FREEMAN, 2013).

1.6.3 Heparina sódica e enoxaparina sódica

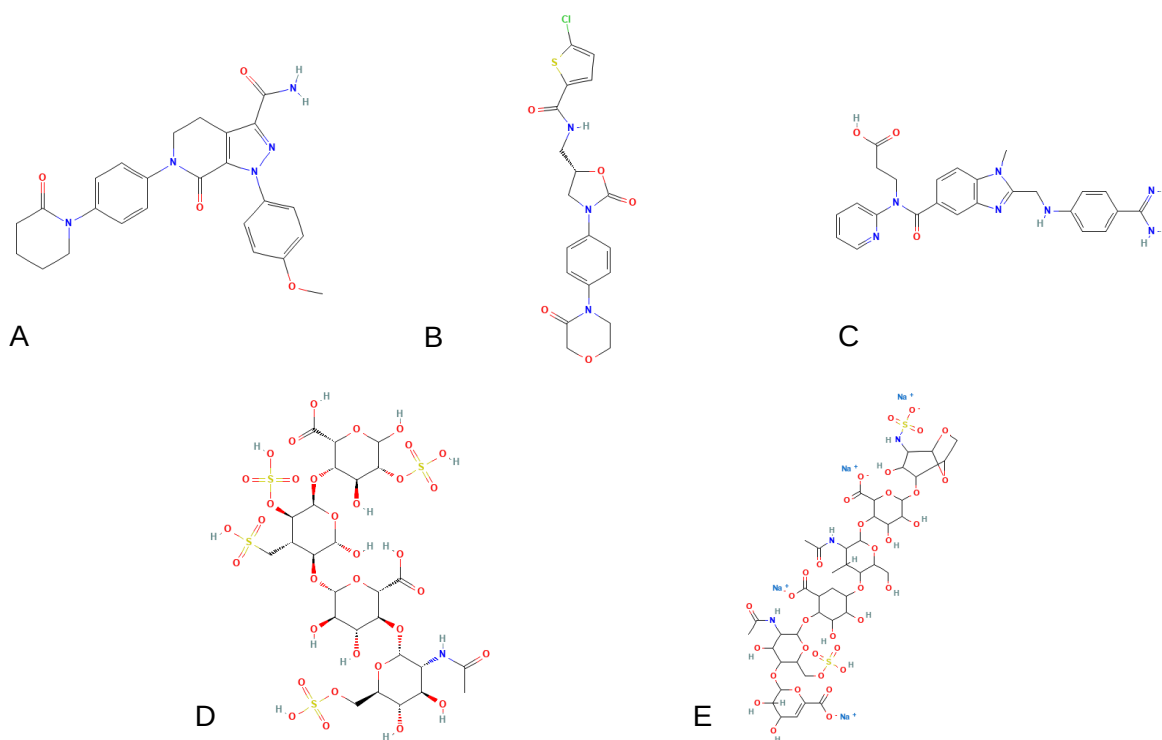
As heparinas não fracionadas são moléculas anticoagulantes amplamente utilizadas para as mais variadas manifestações cardiovasculares, possuem peso molecular entre 12 e 15 kDa e servem como matéria-prima para produção das heparinas de baixo peso molecular, que são produzidas a partir da despolimerização das heparinas não fracionadas (MADDINENI *et al.*, 2006). A heparina sódica (Hemofol® - figura D) é formada por 10 a 15 cadeias de polissacarídicas ligadas a uma proteína central que formam um proteinoglicano de alto peso molecular, enquanto a enoxaparina sódica (Versa® - figura E) é uma fração de heparina que possui peso molecular médio de 4,5 kDa obtida a partir da despolimerização do éster benzil heparina proveniente da mucosa intestinal suína.

1.6.4 Dabigratana

Dabigratana é um fármaco relativamente novo empregado para tratamento e prevenção de formação de trombos e na embolia pulmonar, reduzindo o risco de eventos vasculares encefálicos e embolis sistêmicas. Farmacologicamente, o Dabigratana atua

inibindo direta e competitivamente a trombina livre ou ligada ao coágulo. Dabigratana consiste em um pró-farmaco (etexilato de dabigatrana) que, antes de se tornar ativo, passa por duas etapas de ativação (KIM *et al.*, 2022).

Figura 3 - Estrutura Molecular de anticoagulantes. Inibidores diretos do Fator Xa: A Apixabana., B. Rivaroxabana. C. Dabigratana, D. Heparina sódica e E. Enoxaparina sódica.



Fonte: PubChem

2 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos farmacológicos de Fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de serpentes dos dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* na hemostasia secundária.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar, *in vitro*, atividade coagulante das fosfolipases A₂ (PLA₂s) isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*;
- ✓ Averiguar, *in vitro*, atividade anticoagulante das PLA₂ isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, a capacidade anticoagulante de fármacos comerciais de diferentes mecanismos de ação e atuação na hemostasia secundária;
- ✓ Comparar a capacidade anticoagulante de fármacos comerciais com diferentes mecanismos de ação na hemostasia secundária com a atividade anticoagulante de proteínas ofídicas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*;
- ✓ Identificar o sítio preferencial para ancoragem das proteínas ofídicas através de estudos *in silico* (ancoragem molecular PLA₂-Fator Xa e ancoragem molecular PLA₂-Fator IXa).
- ✓ Propor o mecanismo da ação anticoagulante das diferentes PLA₂s ofídicas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* frente às diferentes vias da hemostasia secundária.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Cristalografia de Proteínas Tóxicas (CPr-LabTox) e Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. As amostras sanguíneas foram coletadas no Laboratório de Cristalografia de Proteínas da UFPB (CPrLabTox), na cidade de João Pessoa – PB.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população foi constituída por estudantes universitários voluntários, matriculados nos diversos cursos de graduação e pós-graduação da Universidade Federal da Paraíba. A amostra foi composta por 60 doadores que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

Conforme descrito no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Médicas da UFPB, foram incluídos na pesquisa estudantes dos cursos de Graduação e Pós-Graduação da Universidade Federal da Paraíba, que não eram portadores de doenças crônicas e/ou infecciosas, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos. Foram excluídos da pesquisa voluntários que tinham feito uso de qualquer medicamento nos 10 dias anteriores a coleta e aqueles que, na triagem, apresentaram TP e TTPa fora dos valores de referência. Além disso, não participaram da pesquisa voluntários que declararam fazer uso contínuo de álcool e drogas ilícitas.

3.4 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS DA COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO

As amostras de plasma humano foram obtidas de doadores voluntários saudáveis, nos quais foi realizada punção venosa e não traumática de veia de antebraço por sistema à vácuo. Os tubos à vácuo continham anticoagulante citrato de sódio em concentração 0,109M, este, age como quelante de cálcio impedindo a coagulação do sangue (AMORIN et al, 2010).

Após as coletas, todas as amostras de sangue humano foram centrifugadas a 3.000 RPM durante 15 minutos, conforme recomendações do kit reagente utilizado. Para avaliação do TP o plasma foi distribuído em 3 cubetas (50µl em cada), e posteriormente foram adicionados o reagente de TP e o tempo de formação de coágulo foi obtido. Para avaliação do TTPa a mistura o plasma foi distribuído em 3 cubetas (50µl em cada), e posteriormente foram adicionados o reagente 1 e após 3 minutos foi adicionado o reagente 2, o tempo de formação de coágulo foi obtido.

Os plasmas dentro do tempo de referência para TP e TTPa formaram um *pool* de plasma, o qual foi novamente triado. Em seguida, o *pool* de plasma foi distribuído em tubos esterilizados por autoclavagem e posteriormente congelados em nitrogênio líquido, permitindo a conservação do plasma por até 12 meses, quando mantido em temperatura inferior a -20°C (BRASIL. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Durante a realização do experimento, o plasma permaneceu a 37 °C evitando a desnaturação das proteínas plasmáticas envolvidas no processo de coagulação.

3.5 DESCARTE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O descarte de resíduos e amostras biológicas seguiu as diretrizes de biossegurança adotadas pelo CPr-LabTox, onde os experimentos foram realizados. Sendo assim, os materiais perfuro-cortantes foram descartados em caixas de papelão rígida (descarpak) próprias para esse fim. Os materiais contendo resíduos biológicos, luvas descartáveis, máscaras e seringas foram descartados em saco de resíduos biológicos, com advertência de material infectante, em seguida encaminhados para coleta seletiva sendo a incineração o destino destes materiais.

3.6 OBTENÇÃO DAS PLA₂S, DOS FÁRMACOS E DOS KITS DE COAGULAÇÃO

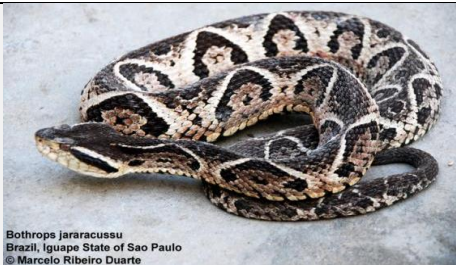
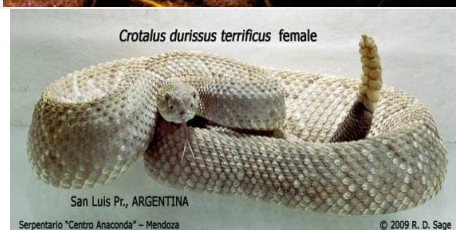
As PLA₂ (Asp49-PLA₂ ácidas, básicas e Lys49-PLA₂ básicas) isoladas das peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* foram purificadas, liofilizadas e gentilmente cedidas pelo professor pesquisador Dr. Andreimar Martins Soares da Fiocruz, vinculado à Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Rondônia (Tabela 2).

As PLA₂s isoladas foram mantidas acondicionadas a -20°C. Para realização dos experimentos as PLA₂s foram solubilizadas em Tampão Fosfato Salina (PBS - 10x, pH 7,4),

sendo utilizadas imediatamente e mantidas em banho de gelo, durante a realização do experimento, para evitar a desnaturação destas PLA₂.

A concentração teórica das proteínas foi aferida por espectrofotometria utilizando-se o NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) com absorbância (Abs) de 280 nm, na qual, 1 Abs correspondeu a 1,0 µg/µL. Concentração: PrTX-I: 40 µg/µL; PrTX-II: 20 µg/µL e PrTX-III: 30 µg/µL; BthA-I 15 µg/µL; – MjTX-I 6,5 µg/µL; MjTX-II 9,0 µg/µL; BthTX-I 10 µg/µL; BthTX-II 12,5 µg/µL e CB 5,5 µg/µL.

Tabela 2 – Distribuição das PLA₂s quanto à espécie da serpente, da classe (Lys49 ou Asp49) e ao caráter ácido ou básico da PLA₂.

Espécie	Lys49-PLA ₂	Asp49-PLA ₂ básicas	Asp49-PLA ₂ ácida
<i>Bothrops jararacussu</i> 	BthTX-I	BthTX-II	BthA-I
<i>Bothrops pirajai</i> 	PrTX-I PrTX-II	PrTX-III	
<i>Bothrops moojeni</i> 	MjTX-I MjTX-II		
<i>Crotalus durissus terrificus</i> 		Crotoxina B - CB	

Fonte: elaborada pelo autor, imagens obtidas em The Reptile Database (2022)

Para definir as diferentes quantidades das PLA₂s utilizadas nos experimentos de anticoagulação, foram avaliadas a menor e a maior quantidade de PLA₂s capazes de

causarem, respectivamente, os menores e os maiores prolongamento no tempo de formação do coágulo (TP e TTPa).

Para Lys49-PLA₂, as quantidades avaliadas foram 1,25µg, 2,50µg, 5,00µg, 10,0µg, 20,0µg e, para Asp49-PLA₂, foram 0,25µg, 0,50µg, 1,00µg, 2,00µg, 4,00µg.

Todos os fármacos anticoagulantes foram adquiridos comercialmente (Tabela 3). Os medicamentos Xarelto®, Eliquis® e Pradaxa® foram solubilizados em água injetável nas concentrações de 2, 4 e 5 mg/mL, respectivamente. Os medicamentos Hemofol® e Versa® foram diluídos em água injetável nas concentrações de 4 e 10 mg/mL. Foram avaliadas as menores e a maiores quantidades de cada fármaco (tabela 3) capazes de causarem, respectivamente, os menores e o maiores prolongamento no TP e no TTPa para definir as quantidades de cada fármaco utilizado nos experimentos *in vitro*.

Tabela 3 – Descrição do nome comercial das características e das quantidade de fármacos anticoagulantes utilizadas nos experimentos *in vitro*

Fármaco	Laboratório	Princípio Ativo	Alvo	Via de administração	Quantidade avaliada (µg)				
Hemofol®	Cristália	heparina	Atividade anti-FXa e baixa atividade anti FIIa ou trombina Inativa os	Intravenoso	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Versa®	Eurofarma	enoxaparina sódica	fatores XIIa, XIa, Xa, IXa e trombina II	Subcutânea ou intravenoso	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1
Pradaxa®	Boehringer Ingelheim	etexilato de dabigratana	inibidor direto da trombina	Oral	1,0	10	20	40	80
Eliquis®	Bristol-Myers Squibb	apixabana	Inibidor diretos do FXa	Oral	1,0	10	20	40	80
Xarelto®	Bayer	rivaroxabana	Inibidor diretos do FXa	Oral	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40

Fonte: elaborada pelo autor

Foram adquiridos comercialmente os kits de coagulação: Coagulação Tempo de Protrombina (TP) Ref. 730100-1-C (lote 17A130) e Coagulação Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) Ref. 731200-C (lote 17C171) da Wama Diagnóstica®.

Amostras de plasma humano citratado contendo quantidades distintas de cada um dos cinco fármacos anticoagulantes ou PLA₂s foram encubados por cinco minutos a 37 °C e posteriormente obtidos.

3.7 AVALIAÇÃO DE EFEITO COAGULANTE E/OU ANTICOAGULANTE

A avaliação da atividade coagulante foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita por Alvarado & Gutiérrez (1988) com modificações, utilizando plasma humano citratado e metodologia semi-automatizada (Coagumaster 2.0 Wama®, o qual mede a variação no movimento de esferas metálicas permitindo calcular o tempo de coagulação do plasma).

Para avaliar a atividade anticoagulante tubos contendo plasma humano citratado e tampão PBS (controle) ou PLA₂ ou fármacos anticoagulantes foram incubados por 5 minutos.

Para definir as diferentes quantidades de fármaco ou PLA₂s utilizadas nos experimentos de anticoagulação, previamente foram avaliadas a menor e a maior quantidade de fármaco ou PLA₂s capazes de causarem, respectivamente, os menores e os maiores prolongamento no tempo de formação do coágulo (TP e TTPa).

Em seguida, alíquotas de plasma e PBS/proteínas/fármacos foram transferidos para cubeta contendo uma esfera metálica. Todos os experimentos foram realizados em temperatura constante de 37 °C, seguindo a metodologia proposta pelo fabricante dos kits de coagulação Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa).

Para avaliação do Tempo de Protrombina – TP e do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada – TTPa, amostras de plasma humano citratado contendo quantidades distintas de cada um dos cinco fármacos anticoagulantes ou de PLA₂ foram encubados por cinco minutos a 37 °C. Para avaliação do TP a mistura de plasma com fármaco ou PLA₂s foi distribuída em 3 cubetas (50µl em cada), e posteriormente foram adicionados o reagente de TP e o tempo de formação de coágulo foi obtidos. Para avaliação do TTPa a mistura de plasma com fármaco ou PLA₂s foi distribuída em 3 cubetas (50µl em cada), e posteriormente foram adicionados o reagente 1 e após 3 minutos foi adicionado o reagente 2 de TTPa e o tempo de formação de coágulo foram obtidos.

De acordo com o manual do usuário do Coagmaster 2.0®, não havendo formação de coágulo após 300 segundos da adição do Cloreto de Cálcio ao plasma humano citratado, o plasma foi considerado incoagulável

Quando a PLA₂ apresentou atividade anticoagulante, foi observada o prolongamento do tempo causado pela maior quantidade de avaliada e esta PLA₂s será classificada da seguinte forma:

- i) fracamente anticoagulante quando o tempo de coagulação do TP e/ou TTPa prolongou em até 2 vezes em relação ao controle;
- ii) moderadamente anticoagulante quando o tempo de coagulação do TP e/ou TTPa prolongou entre 2 e 4 vezes em relação ao controle;
- iii) iii) fortemente anticoagulante quando o tempo de coagulação do TP e/ou TTPa prolongou em mais de 4 vezes em relação ao controle.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS

Todos os experimentos para avaliar a anticoagulação do plasma humano citratado na presença das proteínas ofídicas ou fármacos anticoagulantes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente utilizando o teste One-way ANOVA, seguido pelo *Dunnetts multiple comparisons test*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (*: $p < 0,01$; **: $p < 0,001$; ***: $p < 0,0001$ e ****: $p < 0,0001$). Todos os resultados foram avaliados usando o software GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3.9 DOCKING MOLECULAR E ESTUDOS *IN SILICO*

As estruturas tridimensionais das PLA₂s, do Fator Xa associado aos fármacos anticoagulantes e e do Fator IXa que foram utilizadas para os experimentos de ancoragem molecular foram obtidas no Protein Data Bank – PDB (<https://www.rcsb.org>). As estruturas tridimensionais do Fator Xa estão disponíveis sob código 2P16 (modelo cristalográfico do Fator Xa em associação com o fármaco anticoagulante apixabana) e 2W26 (modelo cristalográfico do Fator Xa em associação com o fármaco anticoagulante rivaroxabana), enquanto o Fator IXa está disponível sob código 1FRN. As estruturas tridimensionais das proteínas ofídicas estão disponíveis sob os códigos 2Q2J (PrTX-I), 1QLL (PrTX-II), 1GMZ (PrTX-III), 3I3H (BthTX-I), 2OQD (BthTX-II), 1Z76 (BthA-I), 6CE2 (MjTX-I), 6PWH (MjTX-II) e 2QOG (Crotoxina B). Como a Crotoxina B é uma proteína heterodimérica, nos estudos *in silico* foram utilizadas as isoformas A e B da Crotoxina B.

Os experimentos, *in silico*, de ancoragem e interação de PLA₂s (ligantes) como alvo farmacológico pré-definido – Fator Xa ou Fator IXa (receptores) foram realizados no servidor

online ClusPro 2.0 (<https://www.cluspro.bu.edu>) utilizando as configurações padrão do servidor. O servidor ClusPro 2.0 gera modelos agrupados em quatro coeficientes: (1) balanceado entre interações eletrostáticas e hidrofóbicas, (2) favorecido eletrostaticamente, (3) favorecido hidrofobicamente e (4) interações ou forças de van der Waals (VdW) e interações eletrostáticas (KOZAKOV *et al.*, 2017). Todos os modelos gerados no ClusPro 2.0 são classificados, pelo servidor, considerando a quantidade de representantes do cluster (tamanho do cluster), a energia do centro do cluster (ou seja, a estrutura que tem o maior número de estruturas vizinhas no cluster) e a energia da molécula que apresenta menor energia estrutural no cluster (KOZAKOV *et al.*, 2017).

Kini e colaboradores (2005) relataram que a potência das proteínas anticoagulantes depende principalmente da localização de cargas positivas na estrutura tridimensional da proteína. Dentre todos os modelos estruturais gerados (agrupados em quatro coeficientes) para cada ancoragem proteína-ligante foi selecionado o melhor modelo estrutural atendendo a dois critérios 1) pertencer ao grupo eletrostático (considerando Kini *et al.*, 2005) e 2) obter o maior número de interações entre proteínas-ligante e a menor energia de ligação (calculado pelo servidor ClusPro 2.0).

As avaliações das interações moleculares e atômicas (proteína e ligante) foram realizadas utilizando o programa computacional LigPlot+ v.2.2.4 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995). As imagens geradas pelo LigPlot+ sinalizam as distâncias das interações de hidrogênio e das pontes salinas, e indicam as interações hidrofóbicas por representações raiadas em torno dos átomos envolvidos.

3.10 ALINHAMENTO MÚLTIPLO E FILOGENIA

As sequências, no formato FASTA, foram obtidas no Protein Data Bank (os identificadores das sequências utilizadas estão descritos no item 3.10). O alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das PLA₂s foi realizado no servidor online BLAST-COBALT (Edgar, 2004), utilizando as configurações padrões do servidor. Foram realizados ajustes manuais no programa computacional Bioedit v.7.2 (HALL, 2011) para adequar a numeração dos resíduos de aminoácidos de acordo com a numeração proposta por Renetseder *et al.* (1985).

A análise filogenética foi realizada utilizando no programa computacional Jalview v.2.11.1.7 (WATERHOUSE *et al.*, 2009) utilizando os parâmetros padrões. A árvore filogenética foi gerada empregando o método “Neighbor-Joining”, matriz BLOSUM62 e

utilizou-se a PLA₂ isolada da peçonha de *Ophiophagus hannah* (grupo IA, família Elapidae) como grupo externo.

3.11 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo está de acordo com a Resolução 466/12, que rege a pesquisa em seres humanos e assegura a garantia de que a privacidade do sujeito da pesquisa será preservada. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo – A) foi impresso em duas vias, sendo uma via entregue para o doador voluntário e outra via mantida nos arquivos do pesquisador.

Todos os experimentos e coleta de material biológico (sangue) utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB sob o número de protocolo 4.003.352 (CAAE 30822720.3.0000.8069), de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional nº 001/2013 - Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução nº 466/12 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde (CONEP) do Ministério da Saúde. O armazenamento e a utilização do plasma humano citratado foi realizado de acordo com Resolução Nº 441, de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde.

3.12 RISCOS E BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Embora a realização de punção venosa periférica pudesse causar desconforto, dor durante e/ou após a coleta, todos os procedimentos foram cuidadosamente executados, uma vez que a obtenção das amostras de sangue humano foi realizada por profissionais Biomédicos habilitados, obedecendo todas as normas de biossegurança em vigência.

Este estudo trouxe como benefício a identificação de potenciais moléculas anticoagulantes isoladas de peçonhas ofídicas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, além de descrever alterações de características hemostáticas.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

O efeito de cada PLA₂ ou fármaco foi aferido em cinco quantidades distintas através da avaliação do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) para determinar se as PLA₂ eram capazes de prolongar o tempo padrão de coagulação do plasma saudável e para determinar experimentalmente o TP e o TTPa específico para cada fármaco.

4.1.1 Atividade coagulante ou atividade anticoagulante de Fosfolipases A₂

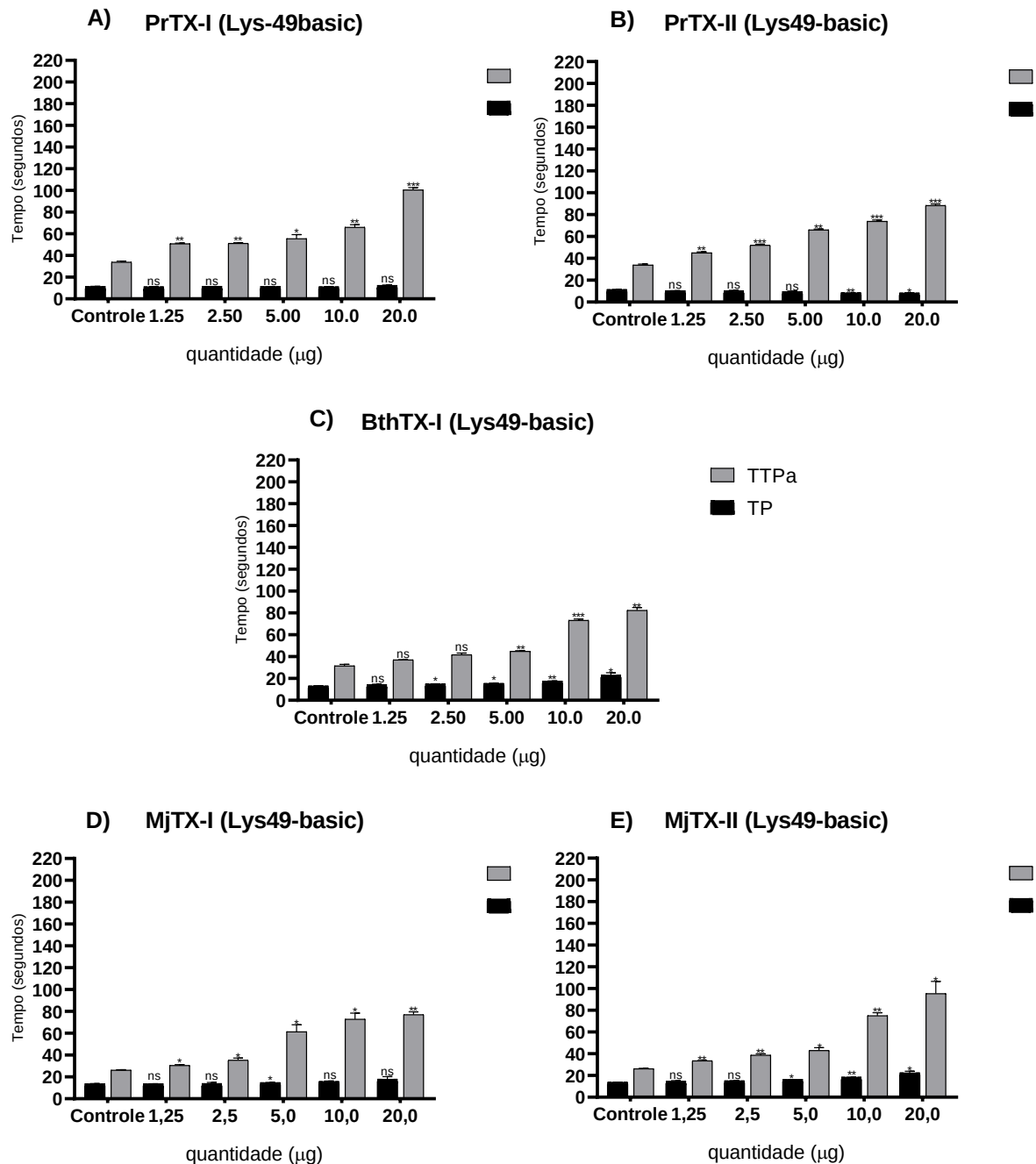
Todas as Fosfolipases A₂ (PLA₂s) foram avaliadas em cinco diferentes quantidades (Lys49-PLA₂ – 1,25µg, 2,50µg, 5,00µg, 10,0µg, 20,0µg; Asp49-PLA₂ – 0,25µg, 0,50µg, 1,00µg, 2,00µg, 4,00µg) e não apresentaram atividade coagulante sobre o plasma humano citratado mesmo após duas horas de incubação a 37°C.

O plasma humano citratado, na presença das proteínas PrTX-I (*Bothrops pirajai*) não apresentou alteração significativa do Tempo de Protrombina (TP) quando comparado ao controle (plasma + PBS) em nenhuma quantidade avaliada, enquanto que na presença da MjTX-I (*Bothrops moojeni*) somente apresentou alteração significativa do Tempo de Protrombina (TP) na quantidade de 5,0µg.

Para a MjTX-II (*Bothrops moojeni*) foi observado alterações significativas do TP nas quantidades 5, 10 e 20µg. Já para BthTX-I (*Bothrops jararacussu*) quantidades acima de 2,5µg foram necessárias para causar prolongamento do TP. Em contrapartida, o TP do plasma na presença da PrTX-II (*Bothrops pirajai*), apresentou decréscimo nas quantidades de 5, 10 e 20µg.

O plasma humano citratado, na presença de todas as Lys49-PLA₂s avaliadas (PrTX-I, PrTX-II, MjTX-I e MjTX-II) apresentou significativo prolongamento do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) em todas as quantidades avaliadas, com exceção da BthTX-I em que só houve prolongamento na quantidade de 5µg, permitindo que essas PLA₂ fossem classificadas como fortemente anticoagulante (figuras 4a-e).

Figura 4 - Avaliação da atividade anticoagulante da Lys49-PLA₂s em cinco diferentes quantidades (1,25; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 µg). TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de p>0,05. Valores de p <0,05 foram considerados significativos (*: valor de p<0,01; **: valor de p<0,001; ***: valor de p<0,0001 e ****: valor de p<0,00001).



Fonte: o autor

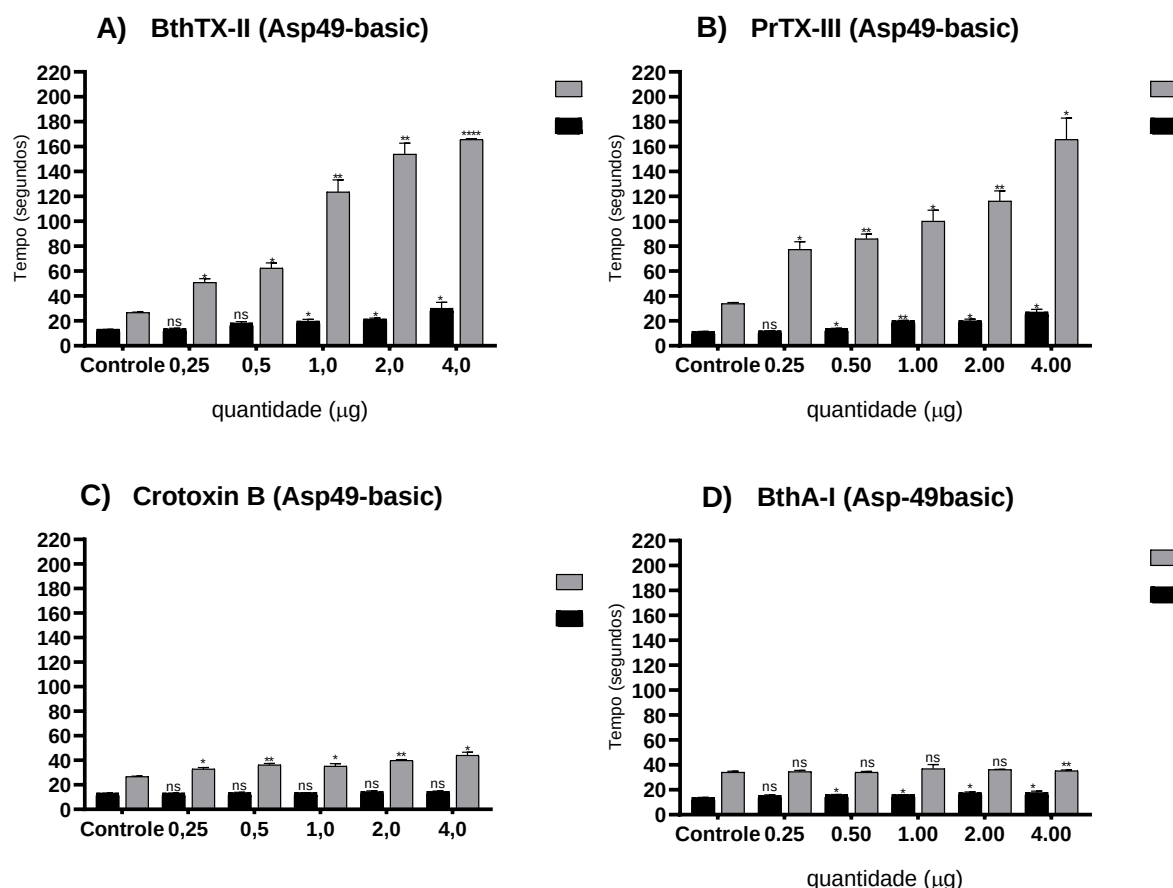
O plasma humano citratado, na presença da proteína PrTX-III (*Bothrops pirajai*) somente apresentou aumento significativo do Tempo de Protrombina (TP) nas quantidades de 0,5, 1, 2 e 4 µg. Enquanto que o plasma na presença de BthTX-II (*Bothrops jararacussu*) mostrou aumento do TP nas quantidades de 1, 2 e 4 µg proteína.

A avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) do plasma humano citratado na presença da PrTX-III e da BthTX-II indicou aumento significativo a partir da quantidade de 0,25µg. Ambas as Asp49-PLA₂s básicas isoladas de peçonhas do gênero *Bothrops* foram classificadas como fortemente anticoagulante (figura 5a, b).

A presença da Crotoxina B (CB) no plasma humano citratado não causou aumento significativo do TP em nenhuma quantidade avaliada. Em relação ao TTPa, a presença da Crotoxina B ocasionou prolongamento do tempo nas quantidades de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0µg. Essa Asp49-PLA₂ básica isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* também foi classificada como fracamente anticoagulante (figura 6c).

A presença da BthA-I, uma Asp49-PLA₂ ácida, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, causou aumento do Tempo de Protrombina do plasma humano citratado nas quantidades de 0,5, 1, 2 e 4 µg. Em relação a avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada do plasma na presença de BthA-I, houve prolongamento do tempo de coagulação somente na quantidade de 4µg. Excepcionalmente, esta PLA₂ ácida foi classificada como fracamente anticoagulante por apresentar prolongamento de tempo de coagulação inferior a duas vezes em relação ao controle (figura 5d).

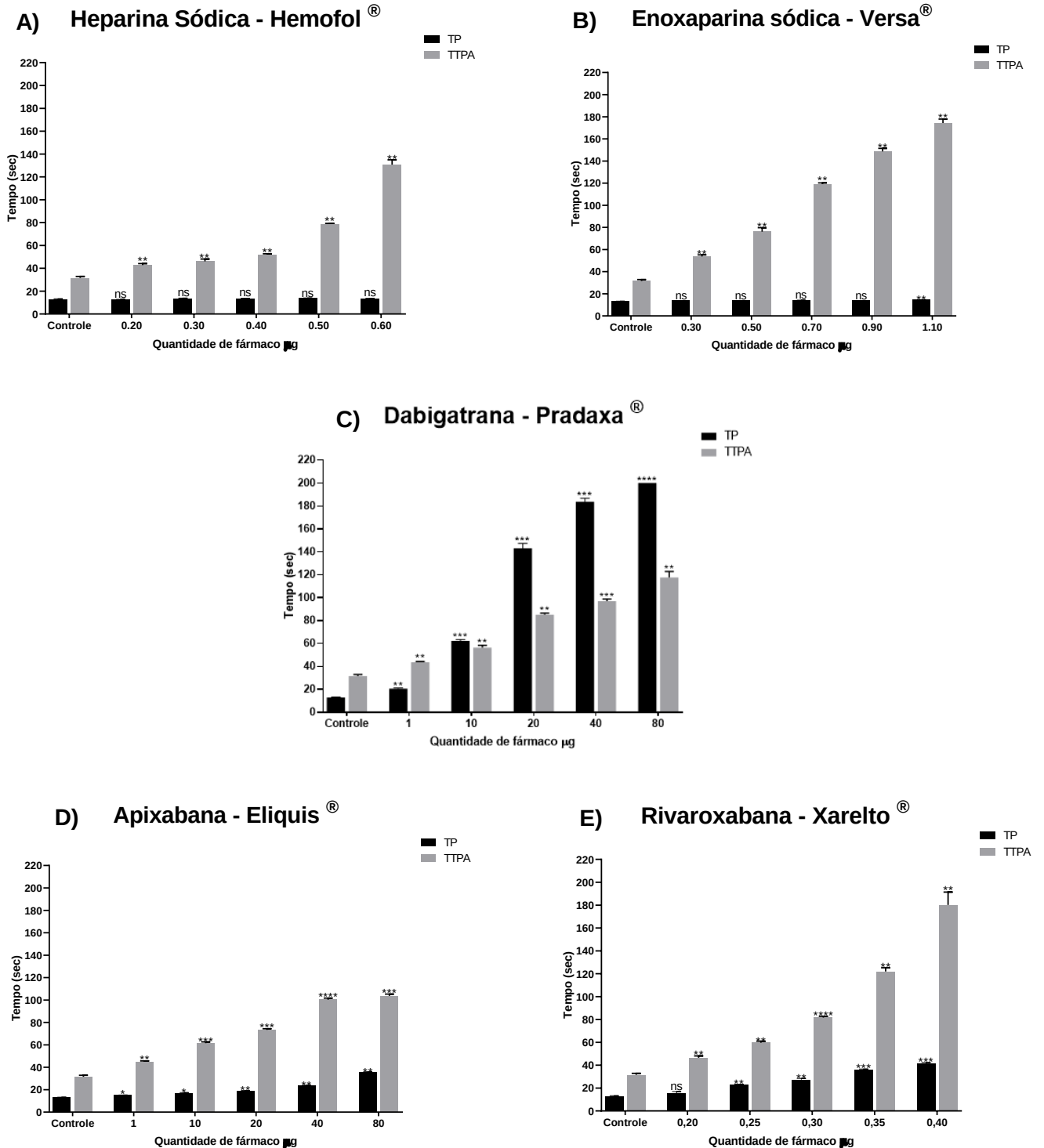
Figura 5 - Avaliação da atividade anticoagulante da Asp49-PLA₂s (básicas e ácida) em cinco diferentes quantidades (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μ g). TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de $p > 0,05$. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (*: valor de $p < 0,01$; **: valor de $p < 0,001$; ***: valor de $p < 0,0001$ e ****: valor de $p < 0,00001$).



4.1.2 Fármacos anticoagulantes

O Tempo de Protrombina – TP do plasma humano citratado na presença de heparina sódica não apresentou prolongamento de TP em nenhuma das quantidades avaliadas, enquanto que a presença de enoxaparina sódica somente causou prolongamento do TP na maior quantidade avaliada (1,1 μ g). O plasma na presença do rivaroxabana apresentou prolongamento do TP a nas qsuantidades 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 μ g; já, etexilato de dabigatрана e apixabana, causaram prolongamento de TP em todas as quantidades avaliadas (1; 10; 20; 40 e 80 μ g). O de Tempo de Tromboplastina Parcial ativada – TTPa do plasma humano citratado na presença de cada um dos fármacos avaliados apresentou prolongamento em todas as quantidades avaliadas (figura 6a-e).

Figura 6 - Avaliação do efeito anticoagulante de fármacos em cinco diferentes quantidades. TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de $p > 0,05$. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos (*: valor de $p < 0,01$; **: valor de $p < 0,001$; ***: valor de $p < 0,0001$ e ****: valor de $p < 0,00001$).



Fonte: o autor

4.2 EXPERIMENTOS *IN SILICO*

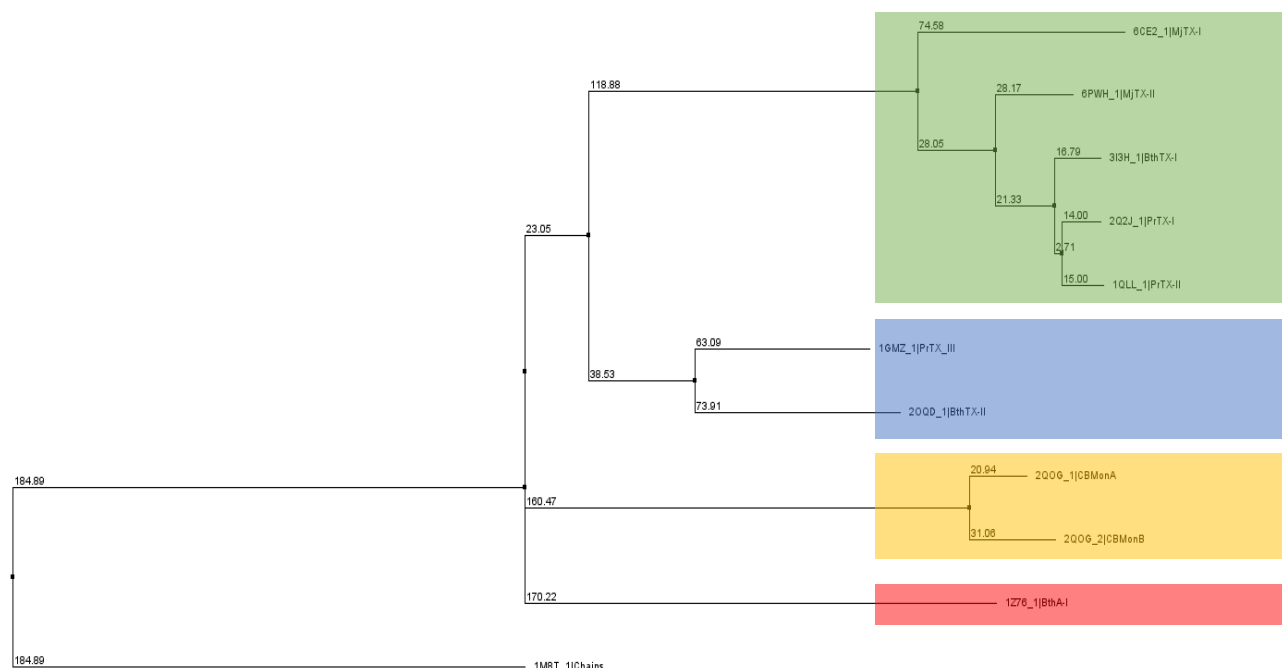
4.2.1 Alinhamento múltiplo de sequências das PLA₂s

No alinhamento múltiplo da sequência das Fosfolipases A₂, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo foram destacados em azul; o resíduo na posição 49 foi destacado em vermelho; as cisteínas que formam as ligações dissulfeto foram indicadas e destacadas em preto. A sequência de resíduos de aminoácidos de 54 a 77 (destacada em amarelo) foi definida, segundo Kini et al. (2005), como uma região fundamental para a atividade anticoagulante desempenhada por essas proteínas (figura 6). O alinhamento das sequências de aminoácidos das PLA₂s isoladas da peçonha de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* foi utilizado na análise filogenética.

	1	11	21	31	41	51	61	71
BtxTX-I	SLFELGKMIL	QETG-KNPAK	SYGAYG-CNCG	VLGRG-KPKDA	TDRCCYVHC	CYKKLT-G	DPKK	DRYS--YSWKDK
PrTX-I	SLFELGKMIL	QETG-KNPAK	SYGAYG-CNCG	VLGRG-KPKDA	TDRCCYVHC	CYKKLT-G	DPKK	DRYS--YSWKDK
PrTX-II	SLFELGKMIL	QETG-KNPAK	SYGAYG-CNCG	VLGRG-KPKDA	TDRCCYVHC	CYKKLT-G	DPKK	DRYS--YSWKDK
MjTX-I	SLFELGKMIL	QETG-KNPAK	SYGAYG-CNCG	VLGRG-KPKDA	TDRCCYVHC	CYKKLT-N	DPKK	DRYS--YDWKNK
MjTX-II	SLFELGKMIL	QETG-KNPAK	SYGVYG-CNCG	VGGRG-KPKDA	TDRCCYVHC	CYKKLT-G	DPKK	DRYS--YSWKDK
BthTX-II	DLWQFGQMIL	KETG-KLPFP	YYTTYG-CYCG	WGGQG-QPKDA	TDRCCFVHC	CYKKLT--N	KPKT	DRYS--YSRENG
PrTX-III	DLWQFGQMIL	KETG-KLPFP	YY-TYGGCYCG	VGGRR-GLGTK	DDRCCYVHC	CYKKLT--G	PKTD	DRYS--YSWLDL
CBIsOB	HLLQFNKMIK	FETR-KNAIP	FYAFYG-CYCG	WGGRG-RPKDA	TDRCCFVHC	CYKKLA--K	NTKW	DIYP--YSLKSG
CBIsOA	SLLQFNKMIK	FETR-KNAVP	FYAFYG-CYCG	WGGQG-RPKDA	TDRCCFVHC	CYKKLA--K	NTKW	DIYP--YSLKSG
BthA-I	DLWQFGQMMN	DVMR-EYVVF	NYLYYG-CYCG	WGGIG-KPRDA	TDRCCFVHC	CYKKVT--G	NPKT	DSYTTYSEENG
			1 2		32	4 5	6	
	81	91	101	111	121	131		
BtxTX-I	TIVCGE-NNP	CLKELCECDK	AVAICLRENL	GTYNKKYRY-H	LK-PFCKKAD	--PC		
PrTX-I	TIVCGE-NNP	CLKELCECDK	AVAICLRENL	GTYNKKYRY-H	LK-PFCKKAD	--DC		
PrTX-II	TIVCGE-NNP	CLKELCECDK	AVAICLRENL	GTYNKKYRY-H	LK-PFCKKAD	--DC		
MjTX-I	TIVCGE-ENP	CLKQICECDK	AVAICLRENK	GTYNKK-RDVI	LK-PFCKKGR	--DC		
MjTX-II	TIVCGE-NNS	CLKELCECDK	AVAICLRENL	DTYNKKYRYNY	LK-PFCKKAD	--PC		
BthTX-II	VIIICGE-GTP	CEKQICECDK	AAAVCFRENL	RTYNKKRYMA-Y	PD-VLCKKPA	E-KC		
PrTX-III	TIVCGE-DDP	CK-ELCECDK	AIAVCFRENL	GTYNKKYRY-H	LK--PCKKAD	K-PC		
CBIsOB	YITCGK-GTW	CEEQICECDR	VAAECLRRSL	STYKGYMF-Y	PD-SRCRGPS	E-TC		
CBIsOA	YITCGK-GTW	CEEQICECDR	VAAECLRRSL	STYKNEYMF-Y	PD-SRCREPS	E-TC		
BthA-I	DVVCQG-DDL	CKKQICECDR	VAAECLRRDNK	DTYDTRYWL-Y	GA-KNQEES	E-PC		
	7	6	7 5	5	4	1		

A análise filogenética foi realizada para investigar as relações evolutivas entre as PLA₂s da família Viperidae do grupo IIA dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. A árvore filogenética, com exceção do *outgroup*, apresentou três ramos principais: i) PLA₂s básicas do gênero *Bothrops* (subdivididas em Lys49-PLA₂s e Asp49-PLA₂); ii) PLA₂s básicas do gênero *Crotalus* (Asp49-PLA₂) e iii) PLA₂ ácida do gênero *Bothrops* (figura 7).

Figura 7 - Árvore filogenética das PLA₂s em estudo. Lys49-PLA₂s básicas botrópicas estão na cor verde, Asp49-PLA₂s botrópicas estão em azul, Asp49-PLA₂s básicas botrópicas estão na cor amarela e Asp49-PLA₂s ácida botrópicas está na cor vermelha.



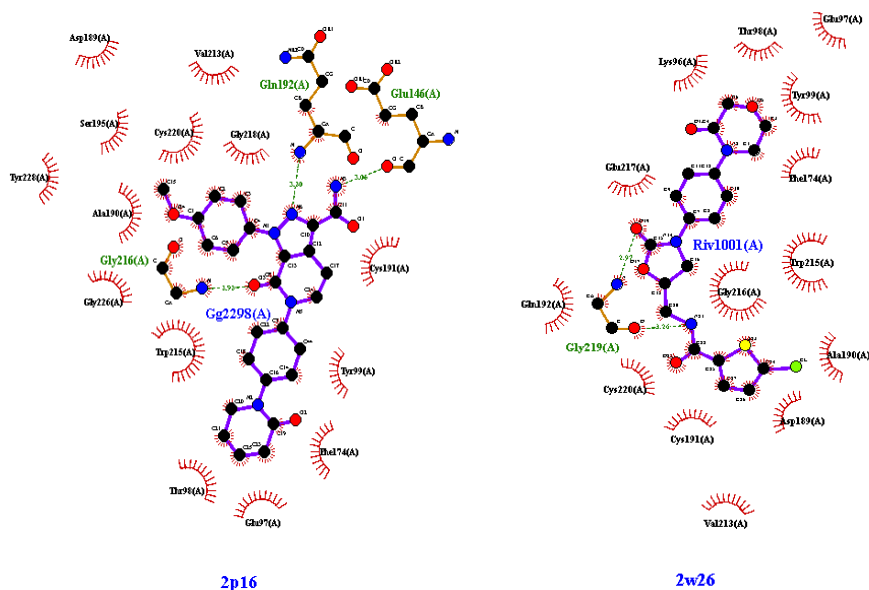
Fonte: o autor

4.3 ANCORAGEM MOLECULAR

Inicialmente, as estruturas tridimensionais do Fator Xa da coagulação em associação com os fármacos Eliquis® (apixabana – 2P16) e Xarelto® (rivaroxabana – 2W26) foram superpostas no programa computacional PyMol v.2.5.2 e o Desvio Quadrático Médio das Posições Atômicas (*Root Mean Square Deviation* – RMSD) foi de 0,190Å.

Foi avaliada o sítio de ligação dos fármacos apixabana e rivaroxabana ao Fator Xa no programa computacional LigPlot+ v.2.2.4 (figura 8). Os resíduos de aminoácidos participantes dessa interação em ambos os fármacos e o Fator Xa foram Glu97; Thr98, Tyr99, Phe174, Asp189, Ala190, Cys191, Gln192, Trp215 e Cys220 e apresentaram RMSD de 0,227 Å.

Figura 8 – interação Fator Xa com os fármacos apixabana (PDB id. 2P16) e rivaroxabana (PDB id. 2W26).



Fonte: o autor

Sendo assim, o PDB 2W26 foi selecionado para os estudos *in silico*, pois, quando os átomos de carbono α das estruturas tridimensionais dos FXa em associação com os fármacos apixabana e rivaroxabana foram superpostos, apresentaram localização semelhantes e, ainda, a estrutura cristalográfica do complexo Xa/rivaroxabana apresenta melhor resolução estrutural. Complementarmente, o fármaco rivaroxabana apresentou melhores resultados nos experimentos *in vitro*.

Kini e colaboradores (2005) relataram que a potência de proteínas anticoagulantes está relacionada, principalmente, à localização das cargas positivas na estrutura tridimensional da proteína. O servidor *online* ClusPro gerou e separou os modelos estruturais em quatro grupos (balanceado eletrostático-hidrofóbico, eletrostático favorecido, hidrofóbico favorecido e balanceado Van der Waals-Eletrostático). Todos os modelos gerados dos coeficientes foram avaliados. Considerando Kini et al. (2005), foi selecionado o modelo pertencente ao grupo eletrostático que obteve o maior número de interações entre proteínas-ligante e a menor energia de ligação (calculado pelo ClusPro 2.0).

A avaliação dos resultados de ancoragem dos ligantes (PLA₂s) ao receptor (Fator Xa da coagulação), permitiu inferir regiões preferenciais de interação (figura 9): Região 1 – subunidade B do Fator Xa; Região 2 – sítio de interação com o fármaco; Região 3 – sítio de interação com o Ca²⁺; Região 4 – C terminal de FVa e Região 5 – hélice curta do sítio de interação do Fator Xa com Fator Va (tabela 1).

Figura 9 - Complexo Protrombinase obtido da *Pseudonaja textilis* (PDB id. 4BXS) com o Fator Xa substituído pelo Fator Xa humano (PDB id. 2W26). O Fator Va está colorido em cinza o Fator de coagulação Xa está com a subunidade A colorida em verde e a subunidade B colorida em rosa), ambos os fatores estão desenhados em superfície. A região do sítio ativo do Fator Xa está colorida em verde oliva e a região denominada sítio de ligação à heparina está colorida em azul marinho.

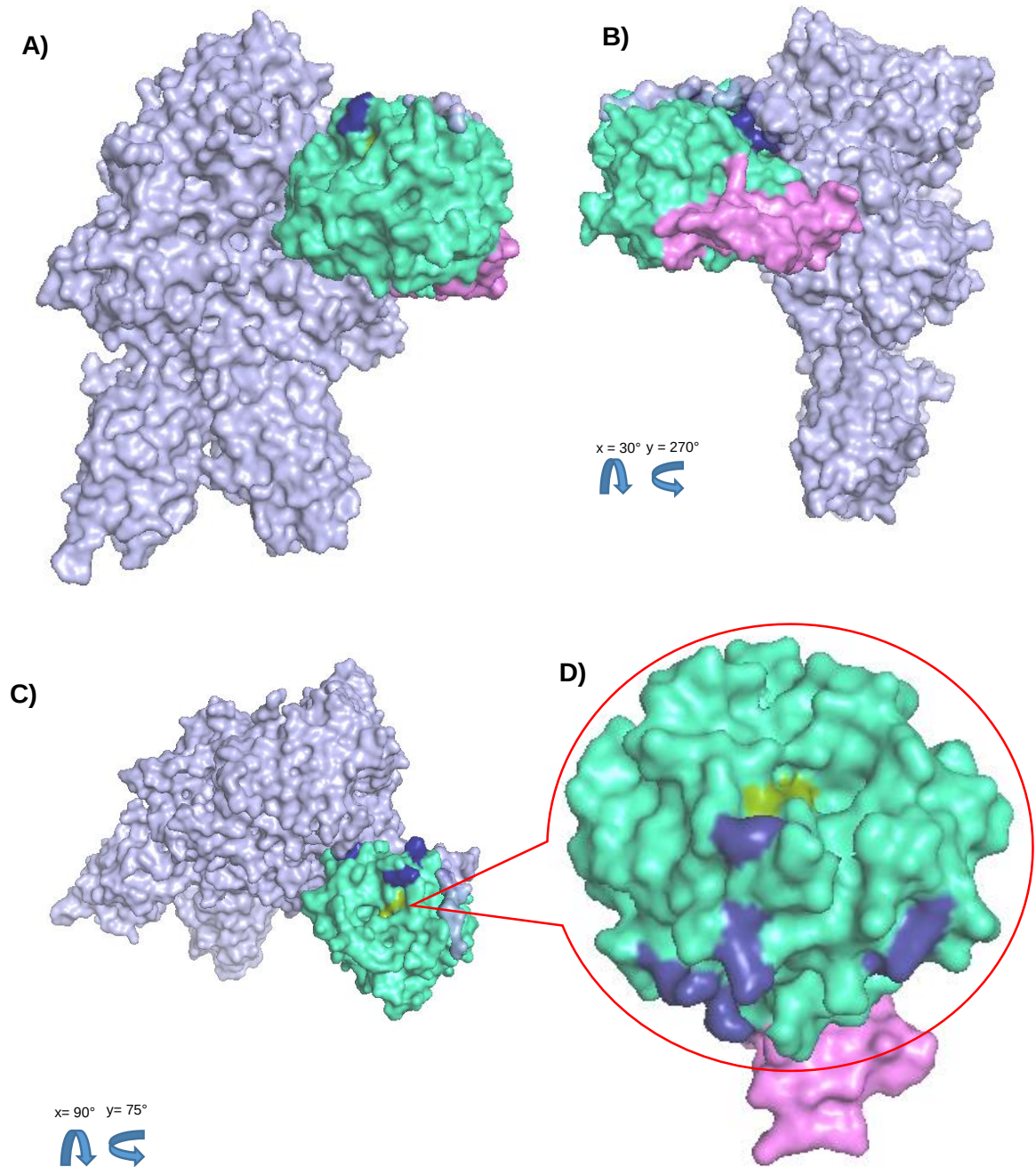


Tabela 4 – Caracterização da ancoragem das PLA₂s ao Fator Xa

PLA ₂ s	PLA ₂	LOCALIZAÇÃO	Nº Membros	Energia Centro	Menor Energia
Asp49-PLA₂s	BthTX-II	Região 1	139	-716.2	-716.2
	PrTX-III	Região 1	162	-686.6	-794.6
	CB-MonA	Região 1	105	-723.7	-876.4
	CB-MonB	Região 5	124	-811.8	-900.7
Asp49-PLA₂ ácida	BthA-I	Região 5	116	-691.4	-862.8
Lys49-PLA₂s	BthTX-I	Região 1	102	-706.5	-891.1
	MjTX-I	Região 1	233	-617.5	-794.1
	MjTX-II	Região 1	134	-673.3	-865.5
	PrTX-I	Região 1	128	-827.5	-849.1
	PrTX-II	Região 1	260	-678.6	-821.7

Fonte: o autor

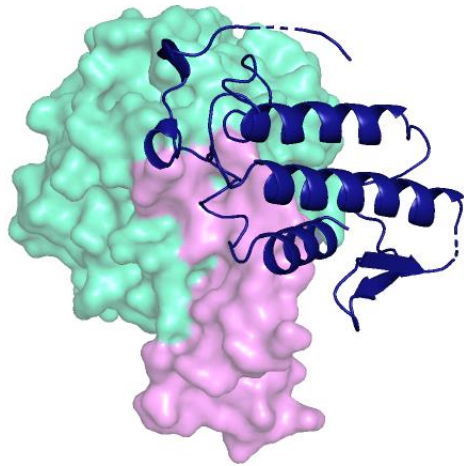
As Asp49-PLA₂s básicas (PrTX-III e BthTX-II) interagiram em ambas as subunidades do Fator Xa. A PrTX-III ancorou na subunidade B do Fator Xa por interações de hidrogênio entre os resíduos Lys7-Asp31, Val22-Tyr42 e Cys28-Tyr42. Enquanto a BthTX-II ancorou na subunidade B do Fator Xa por interações de hidrogênio entre os resíduos Gln7-Asp31, Lys11-Asp31 e Gly30-Tyr42 (figura 10a, b).

A Asp49-PLA₂ ácida (BthA-I) interagiu com a subunidade A do Fator Xa por interações de hidrogênio entre os resíduos Leu31-Gln178, Ser24-Asn166, Phe119-Asn166, Ser24-Lys169 e Leu23-Lys169 (figura 10c). A isoforma B da Crotoxina B (Asp49-PLA₂ básica) interagiu com a subunidade A do Fator Xa por interações de hidrogênio entre os resíduos Ser124-Asn166, Asp122-Lys169, Gly30-Lys169, Trp31-Lys169, Trp31-Gln178 (figura 10d).

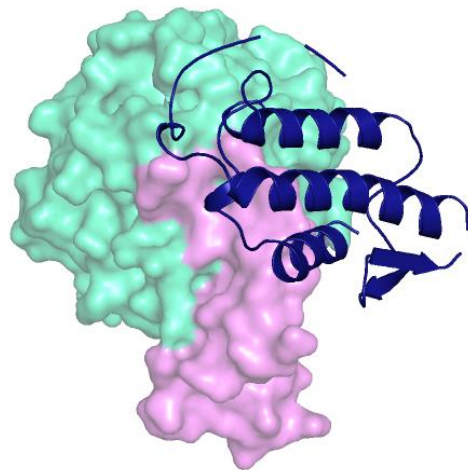
As Lys49-PLA₂ básicas botrópicas interagiram com o resíduo de aminoácido ácido aspartico na posição 31 da subunidade B do Fator Xa. Os resíduos de aminoácidos Val131, Leu32 e Lys122 estabilizaram a ancoragem da PrTX-I (figura 11a) e a Asn16 e Lys19 participaram da ancoragem da PrTX-II (figura 11b). A BthTX-I interagiu com o FXa através dos resíduos de aminoácido Lys49, Tyr119 e Lys122 (figura 11c). O resíduo de aminoácido Lys69 da MjTX-I interagiu com o FXa através de uma ligação salina (figura 11d). No entanto, embora a MjTX-II tenha interagido com a subunidade B de FXa, esta interação ocorreu entre os resíduos de aminoácidos Lys116, Arg118 e Tyr121 com Gln16, Gln115 e Ser18, respectivamente (figura 11e).

Figura 10 - O Fator de coagulação Xa está com a subunidade A colorida em verde claro e a subunidade B colorida em rosa, ambos desenhados em superfície. As Asp49-PLA₂s básicas botrópicas estão representadas na cor azul, a Asp49-PLA₂ ácida está representada na cor vermelha e as Asp49-PLA₂ básicas crotálicas estão representadas na cor amarela.

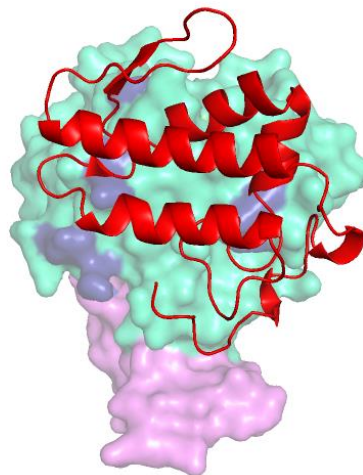
A) PrTX-III



B) BthTX-II



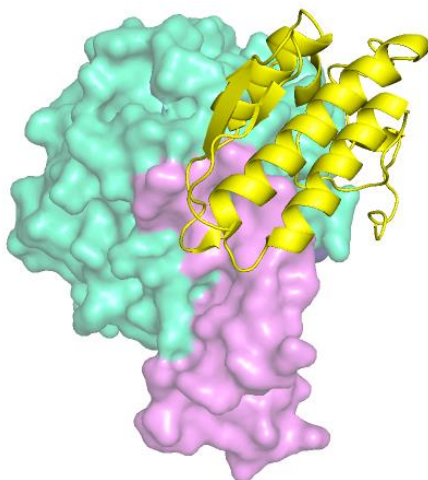
C) BthA-I



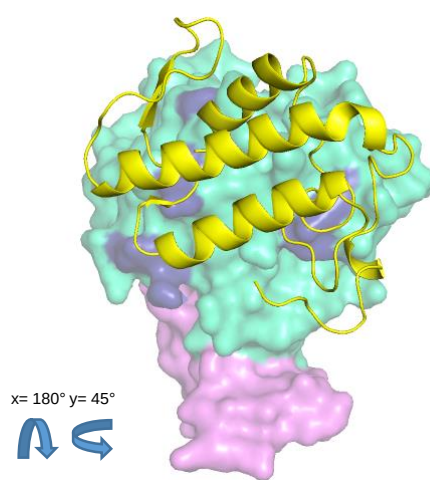
x= 180° y= 45°



D) CB isoforma A



E) CB isoforma B



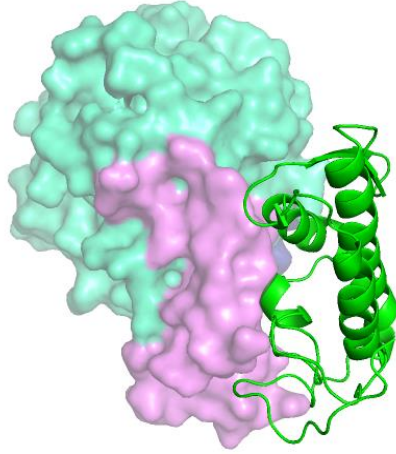
x= 180° y= 45°



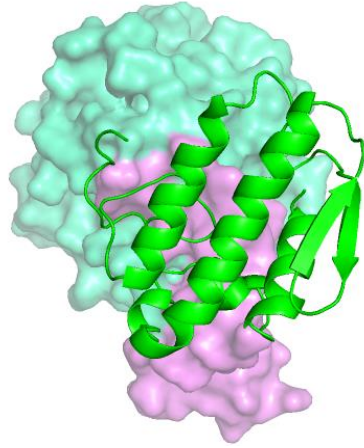
Fonte: o autor

Figura 11 - O Fator de coagulação Xa está com a subunidade A colorida em verde claro e a subunidade B colorida em rosa, ambos desenhados em superfície. As Lys49-PLA₂s básicas botrópicas estão representadas na cor verde.

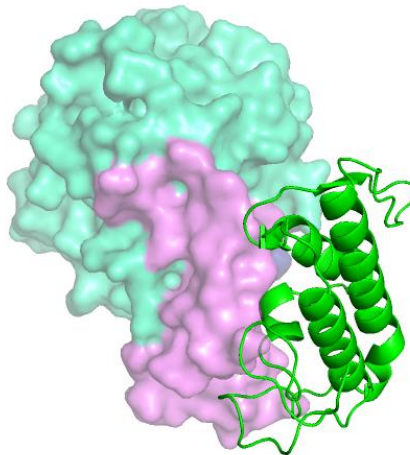
A) PrTX-I



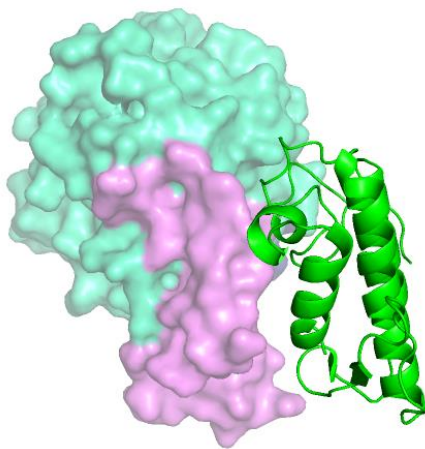
B) PrTX-II



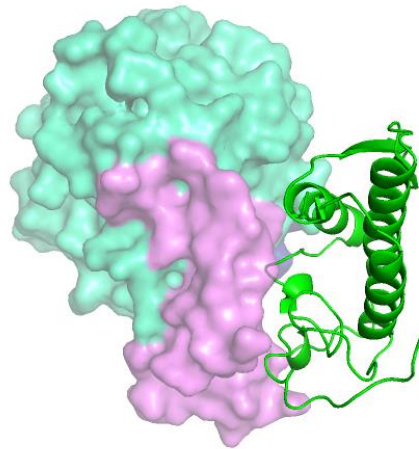
C) BthTX-I



D) MjTX-I



E) MjTX-I



Fonte: o autor

Para definir as regiões preferenciais de ancoragem dos ligantes (PLA₂s) ao receptor (Fator IXa da coagulação) foi empregada a mesma metodologia do Fator Xa: Região 1 – região do sítio de interação do Fator IXa com o Fator VIIIa; Região 2 – região do domínio serino protease do Fator IXa (tabela 5).

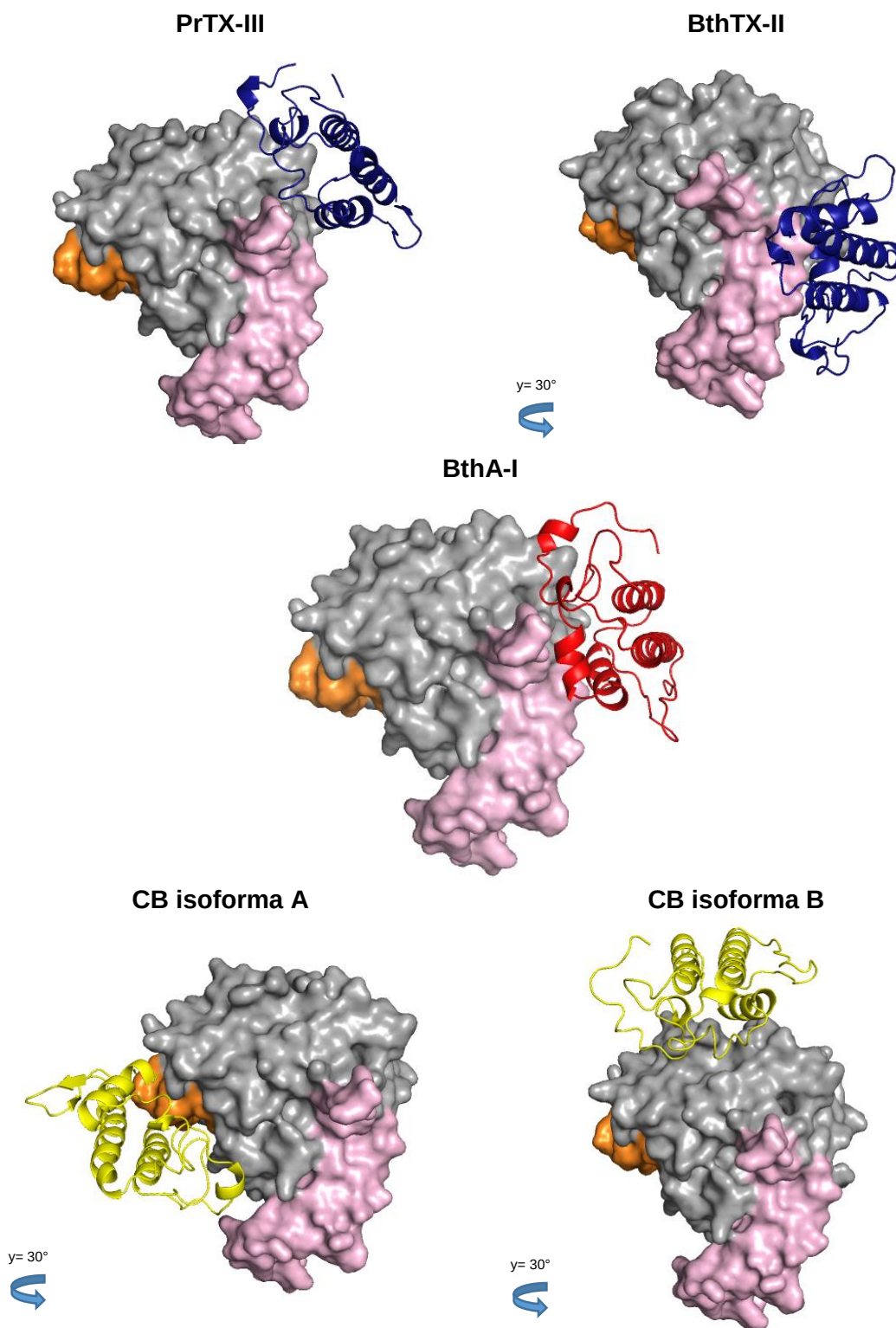
Tabela 5 - Classificação das pla₂s dentro do modelo eletrostático Fator IXa

PLA ₂	PLA ₂	LOCALIZAÇÃO	Nº do cluster	Nº Membros	Energia Centro	Menor Energia
básicas Asp49-PLA ₂ s	BthTX-II	Região 2	002.00	73	-626.7	-758.7
	CB-MonA	Região 1	002.00	100	-862.9	-946,6
	CB-MonB	Região 2	002.00	142	-841.9	-951.2
	PrTX-III	Região 2	002.00	177	-813.8	-898.3
Asp49-PLA ₂ ácida	BthA-I	Região 2	002.00	42	-729.3	-847.1
Lys49-PLA ₂ s básicas	BthTX-I	Região 2	002.00	86	-705.4	-806.6
	MjTX-I	Região 2	002.00	243	-881.8	-909.2
	MjTX-II	Região 2	002.00	127	-874.3	-904.3
	PrTX-I	Região 2	002.00	145	-711.4	-831.6
	PrTX-II	Região 2	002.00	277	-859.3	-948.2

Fonte: o autor

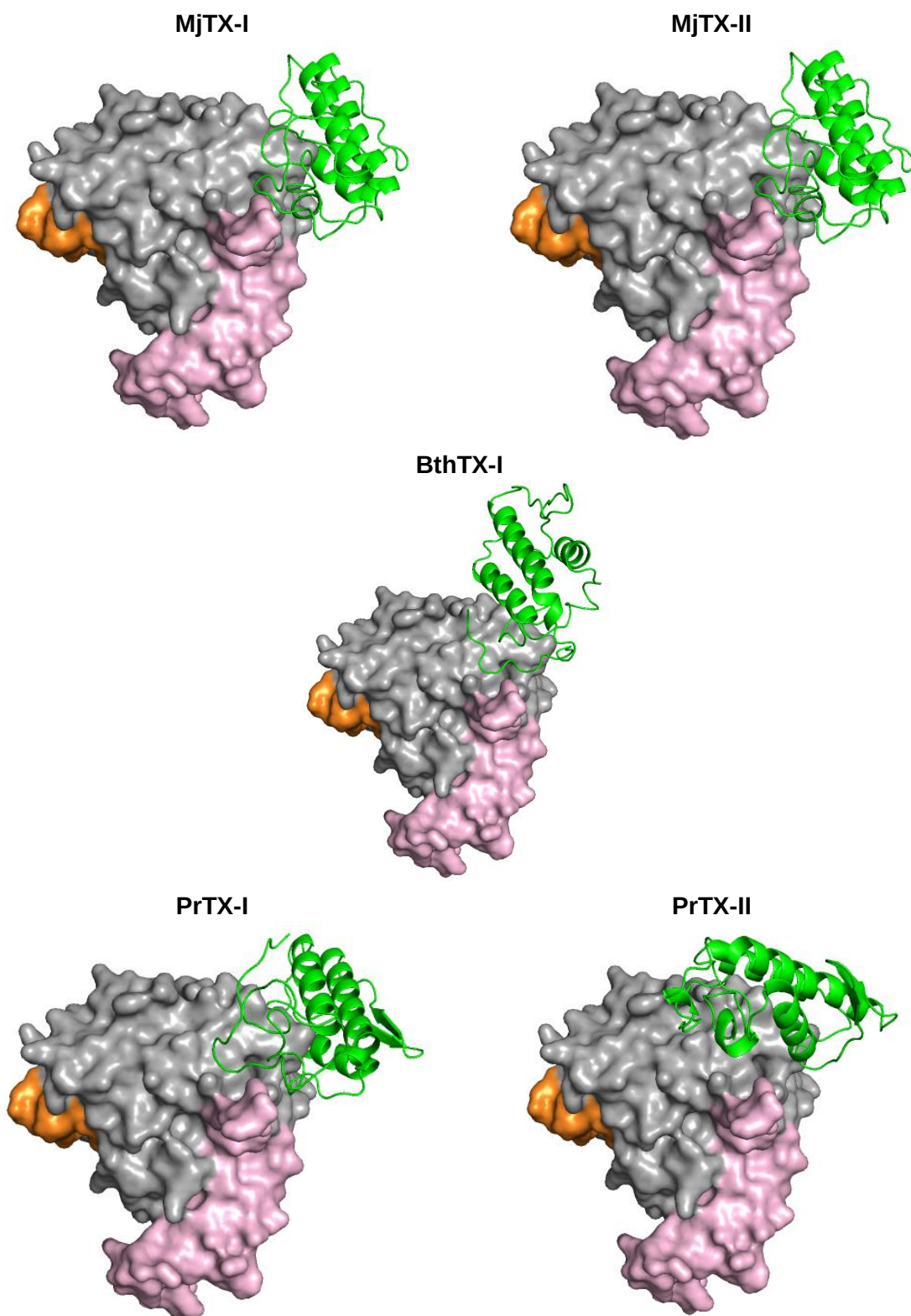
Os resultados dos experimentos *in silico* de ancoragem molecular entre as PLA₂s e o Fator IXa mostraram que, além de alguns resíduos já descritos, uma maior quantidade de resíduos de aminoácidos participou da interação quando comparados com os dados obtidos para o Fator Xa. De todas as PLA₂s, somente a Crotoxina B isoforma A ancorou na região do sítio de interação do FIXa com o FVIIIa (figura 12d), enquanto que as demais ancoraram na região oposta ao sítio de interação do FIXa com o FVIIIa (figuras 12 e 13). A região oposta ao sítio de interação do FIXa com o FVIIIa corresponde ao domínio serino protease do Fator IXa.

Figura 12 - Resultado do experimento in silico (ancoragem molecular) de Asp49-PLA₂s ligadas ao Fator IXa da coagulação. O Fator de coagulação IXa (PDB id: 1RFN) está desenhado em superfície e colorido na cor cinza, a subunidade B está representada em magenta e a região de ligação ao Fator VIII foi destacada em laranja.



Fonte: o autor

Figura 13- Resultado do experimento *in silico* (ancoragem molecular) de Asp49-PLA₂s ligadas ao Fator IXa da coagulação. O Fator de coagulação IXa (PDB id: 1RFN) está desenhado em superfície e colorido na cor cinza, a subunidade B está representada em magenta e a região de ligação ao Fator VIII foi destacada em laranja.



Fonte: o autor

5 DISCUSSÃO

O Tempo de Protrombina – TP e o Tempo de Tromboplastina Parcial ativada – TTPa do plasma humano citratado na presença de fármacos anticoagulantes ou de PLA₂s ofídicas, foram mensurados para avaliar o efeito anticoagulante. A análise do TP plasmático permite avaliar as vias extrínseca e comum da cascata de coagulação através da ativação ou inativação dos fatores I, II, V, VII e X (LOPES et al., 2005; WEITZ, 2011; ARMSTRONG & GOLAN, 2016). Complementarmente, a avaliação do TTPa é utilizada para detectar as deficiências dos fatores de coagulação associadas às vias intrínsecas (VIII, IX, XI e XII) e comuns (I, II, V e X) da cascata de coagulação (LOPES et al., 2005; WEITZ, 2011; ARMSTRONG & GOLAN, 2016).

O plasma humano citratado na presença do Dabigatrana (Pradaxa[®]) apresentou expressivo prolongamento tanto do TP como do TTPa. Como este fármaco é inibidor direto da Trombina, pôde-se inferir que nenhuma das PLA₂s estudadas atuaram diretamente sobre a Trombina, uma vez que nenhuma das PLA₂s causaram expressivo prolongamento do TP. O plasma humano citratado na presença do fármaco Rivaroxabana, apresentou TP e TTPa com maior prolongamento quando comparado ao fármaco apixabana (mesmo quando o Rivaroxabana foi avaliado em quantidades até 100 vezes menores). Park e colaboradores (2019), em um estudo clínico com pacientes em uso do rivaroxabana ou do apixabana verificaram que o TTPa dos pacientes em uso do Rivaroxabana, apresentou um maior prolongamento quando comparado ao TTPa dos pacientes em uso do apixabana. Embora os experimentos realizados em nossos estudos tenham sido *in vitro*, os nossos resultados estão de acordo com os observados *in vivo* (PARK et al., 2019).

Na avaliação dos experimentos *in vitro*, o plasma humano citratado na presença de todas as PLA₂s praticamente não apresentou prolongamento significativo do TP. Enquanto que o TTPa do plasma humano citratado na presença de todas as PLA₂s apresentaram alterações quando comparados ao controle. A presença das Asp49-PLA₂s básicas foi capaz de induzir um prolongamento maior do tempo para a formação do coágulo plasmático, após a adição dos reagentes de TP ou TTPa, quando comparado com os resultados obtidos para as Lys49-PLA₂s.

Verheij et al.(1980), ao estudarem PLA₂s isoladas de peçonhas de serpentes das famílias Viperidae, Crotalidae e Elapidae, relataram que a maioria das fosfolipases A₂ que apresentaram considerável atividade anticoagulante eram proteínas básicas, com pontos isoelétricos superiores a 9,0. Adicionalmente, os autores apontaram que nem todas as PLA₂s fortemente básicas apresentavam efeito anticoagulante. Ainda, Verheij e colaboradores

(1980) relacionaram o efeito anticoagulante das PLA₂s com a sua capacidade de hidrolisar camadas monomoleculares altamente compactas de fosfolipídios. Em contrapartida, as PLA₂s que não exibiram efeito anticoagulante apresentaram baixo poder de penetração e de hidrólise destas monocamadas (VERHEIJ *et al.*, 1980).

Assim como Verheij *et al.*, (1980), Diaz *et al.* (1991; 1992) descreveram que variantes enzimaticamente ativas de miotoxinas apresentavam efeito anticoagulante e prolongavam, *in vitro*, o tempo de recalcificação do plasma pobre em plaquetas. Considerando que apenas variantes enzimaticamente ativas induziam a anticoagulação, Diaz *et al.* (1991, 1992) sugeriram que a hidrólise de fosfolipídios era necessária para este efeito, o que corrobora com os dados obtidos no presente estudo, no qual as Asp49-PLA₂s foram mais anticoagulantes do que Lys49-PLA₂s (DÍAZ *et al.*, 1991; DÍAZ; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1992).

Alvarado e Gutiérrez (1988) relataram que uma PLA₂ miotóxica de *B. asper* prolongou os tempos de recalcificação no plasma de diversas espécies de mamíferos (humano, cavalo, ovelha, cabra e coelho) e esta foi classificada como fortemente anticoagulante, uma vez que esta enzima causou prolongamento do tempo de recalcificação do plasma mesmo na concentração de 0,2 µg/mL. Dessa forma, os autores propuseram que esta PLA₂ afetava a homeostasia por interagir e clivar os fosfolipídios plasmáticos necessários para a ativação dos fatores de coagulação.

Em nossos experimentos, a presença de 4µg da BthTX-II e da PrTX-III (Asp49-PLA₂s básicas isoladas das peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *B. pirajai*, respectivamente) prolongaram o TTPa plasmático em até 6,2 vezes e o TP em até 2 vezes quando comparados ao controle, recebendo a classificação de fortemente anticoagulantes. Andrião-Escarso *et al.* (2000a) ao avaliarem o tempo de recalcificação do plasma na presença da BthTX-II, verificaram que a atividade anticoagulante dessa proteína era dependente de sua atividade catalítica (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000). Toyama e colaboradores (1999) descreveram que a PrTX-III, em quantidades entre 2,5 a 3,5µg, causava prolongamento do tempo de recalcificação do plasma em até 45 minutos e, assim como Soares *et al.* (2001), classificaram esta PLA₂ como moderadamente anticoagulante (SOARES *et al.*, 2001; TOYAMA *et al.*, 1999).

Em contrapartida, o TTPa plasmático na presença de 4µg da Crotoxina B (Asp49-PLA₂ básica isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*) e de 4µg da BthA-I (Asp49-PLA₂ ácida isolada da peçonha de *B. jararacussu*) apresentou prolongamento inferior a duas vezes quando comparado ao controle, enquanto que o TP não apresentou alteração significativa. Dentre todas as PLA₂s avaliadas, estas foram as que apresentaram menor

efeito anticoagulante e foram classificadas como fracamente anticoagulantes. No entanto, Soares et al. (2001) classificaram a Crotoxina B como fortemente anticoagulante e relataram que a PLA₂ causou prolongamento no tempo de recalcificação do plasma de forma dependente da atividade catalítica. A alquilação do resíduo de histidina na posição 48 da Crotoxina B causou a perda das atividades catalítica e anticoagulante, evidenciando que a atividade catalítica é necessária para a anticoagulação (Soares et al., 2001).

Em 2002, Andrião-Escarso e colaboradores descreveram que a BthA-I apresentou baixa atividade anticoagulante na avaliação do tempo de recalcificação do plasma pobre em plaquetas. Adicionalmente, Magro et al. (2005) sugeriram que a alquilação do resíduo de histidina na posição 48 pelo brometo de *p*-bromofenacila poderia inibir indiretamente a atividade anticoagulante e outros efeitos farmacológicos (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002) (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002; MAGRO *et al.*, 2005).

Todas as Lys49-PLA₂s básicas botrópicas avaliadas foram classificadas como moderadamente anticoagulantes, pois, quando comprado ao controle, o TTPa plasmático apresentou prolongamento inferior a quatro vezes.

Soares e colaboradores (1998) avaliaram o tempo de recalcificação do plasma na presença da miotoxina II, uma Lys49-PLA₂ de *Bothrops moojeni* (MjTX-II) e relataram que esta proteína não apresentou atividade coagulante ou anticoagulante. Posteriormente, em 2000, Soares et al. analisaram a capacidade anticoagulante da MjTX-I (miotoxina I isolada da peçonha de *B. moojeni*) e constataram que a presença dessa Lys49-PLA₂ não provocou aumento do tempo de recalcificação do plasma mesmo na quantidade de 100µg.

Mancuso et al. (1995) ao avaliar o tempo de recalcificação plasmático da PrTX-I (uma Lys49-PLA₂ da peçonha de *B. pirajai*), constataram que essa proteína apresenta uma atividade anticoagulante muito baixa. Segundo Lomonte et al. (1994), os últimos 20 resíduos de aminoácidos do C-terminal das PLA₂s estão relacionados ao efeito anticoagulante, uma vez que esta região é atribuída ao sítio de ligação à heparina e é rica em resíduos catiônicos. Em (1998), Toyama et al. compararam a sequência de aminoácidos da PrTX-I com a BthTX-I (Lys49-PLA₂ da peçonha de *B. jararacussu*) e atribuíram que a baixa atividade anticoagulante poderia estar relacionada à substituição de um resíduo de lisina na posição 116 por uma leucina e a substituição de uma prolina na posição 132 por um ácido aspártico, o que contribuiria para a perda da atividade anticoagulante devido a uma diminuição adicional do caráter catiônico da região C-terminal.

Quando foi avaliado o tempo de recalcificação, outras Lys49-PLA₂s foram relatadas, tanto como enzimas fracamente anticoagulantes (miotoxina IV, isolada da peçonha de *Bothrops asper* (DIAZ *et al.*, 1995) e miotoxina I, purificada da peçonha de *B. Schlegelii*

(ANGULO *et al.*, 1997), como fortemente anticoagulantes (BP-III, isolada da peçonha de *Protophthrops flavoviridis* (MURAKAMI *et al.*, 2009) ou mesmo desprovida de atividade anticoagulante (BnSP-7, isolada da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* (SOARES *et al.*, 2000), BmooMtx, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* (QUEIROZ *et al.*, 2011) e miotoxina I, isolada da peçonha de *Bothrops asper* (NÚÑEZ *et al.*, 2004).

Dhillon (1987) compararam o efeito anticoagulante de diferentes PLA₂s isoladas da peçonha de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* em plasma de coelho e concluíram a Lys49-PLA₂ apresentou apenas 4% da potência anticoagulante em relação a Asp49-PLA₂, pois foi necessária uma quantidade 24 vezes maior de Lys49-PLA₂ (Asp49-PLA₂ = 2,5µg) para produzir um tempo de recalcificação superior a 30 minutos. Dessa mesma forma, observamos que para causar o mesmo efeito anticoagulante, as Lys49-PLA₂s necessitaram de quantidades até cinco vezes superiores do que as Asp49-PLA₂s.

Cabe ressaltar que todos os experimentos de coagulação *in vitro*, foram executados seguindo rigorosamente os procedimentos pré-analíticos e analíticos determinados nas bulas dos kits de coagulação TP e TTPa, portanto, até mesmo os fatores labéis (como o Fator VIII) e outros fatores sensíveis à degradação pelo tempo e/ou temperatura foram preservados. Os nossos experimentos de atividade anticoagulante consideraram os componentes das vias extrínseca, intrínseca e comum da coagulação usando kits reagentes específicos para avaliar as vias da coagulação de forma distinta, pois como reagentes de TP têm-se o Fator Tecidual (tromboplastina) e o Cálcio e como reagentes de TTPa têm-se o Fator Tecidual (cefalina), o ativador de contato (ácido elágico) e o Cálcio, os quais permitem iniciar a coagulação em diferentes salvas da cascata.

A toxina Daboxin P é uma Asp49-PLA₂ isolada da peçonha de *Daboia russeli* e apresentou forte atividade anticoagulante, *in vitro*, atrasando o tempo de forma dose dependente nos testes de recalcificação e no TTPa, porém, causou pequeno prolongamento no TP, sugerindo sua atuação em fatores que antecedem a via comum (SHARMA *et al.*, 2016). Sharma e colaboradores (2016) descreveram que esta PLA₂ inibiu a atividade dos complexos tenase extrínseco e intrínseco, seja na ausência ou na presença de fosfolípido, significando que essa enzima possui um mecanismo de atuação tanto enzimático como não enzimático. Complementarmente, os autores relataram que a Daboxin P inibiu a formação do complexo protrombinase (a PLA₂ foi pré-incubada com Fator X, fosfolípido e cálcio e, somente depois, o Fator V foi adicionado) e inferiram que esta enzima poderia interagir com o FX em uma região diferente do sítio ativo ou mesmo inibir a formação deste complexo pela formação de um obstáculo estérico (SHARMA *et al.*, 2016).

Damico e colaboradores (2012) avaliaram a atividade anticoagulante da LmrTX, uma Asp49-PLA₂ isolada da peçonha de *Lachesis muta rhombeata* e verificaram que esta enzima causa o prolongamento do TTPa em plasma de ratos, porém, não prolonga de forma significativa o TP; desta forma, os autores sugeriram que a atividade anticoagulante de LmrTX ocorre sobre fatores da via intrínseca. Os autores ainda relataram que quando o resíduo de histidina na posição 48 da LmrTX foi quimicamente modificado pelo brometo de *p*-bromofenacila, foi observada uma redução de 89% da atividade catalítica e a atividade anticoagulante foi neutralizada, reafirmando a relação direta entre as atividades catalítica e anticoagulante desempenhadas pelas Asp49-PLA₂s.

Toyama et al. (2000) relataram que as PrTX-I, PrTX-II (*Bothrops pirajai*), BthTX-I (*B. jararacussu*) e Basp-II (*B. asper*) têm cerca de 97% de similaridade sequencial e provavelmente são descendentes de um gene ancestral codificador. Os nossos estudos filogenéticos estão de acordo com o relatado por Toyama et al. (2000), uma vez que as Lys49-PLA₂s foram agrupadas em um único clado, o que pode corroborar com a semelhança dos resultados observados em nossos experimentos *in vitro*.

A importância de identificar regiões específicas de atuação das PLA₂s já foi exposto por Saikia et al. (2017) quando esses autores afirmaram que a identificação dos sítios de interação entre resíduos de aminoácidos das PLA₂s anticoagulantes e os resíduos de aminoácidos dos fatores de coagulação contribui para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou terapias baseadas em peptídeos para o uso em pacientes com doenças cardiovasculares.

O Fator Xa é um elemento central da cascata da coagulação. Sharma e colaboradores (2016) relacionaram este fator como alvo de diversas PLA₂s anticoagulantes (CBc, Crotoxina B, BthTX-II, AtxA, CM-III, CM-IV). Este fator possui regiões fundamentais para interação proteína-proteína ou proteína-ligante. A estrutura terciária do Fator Xa é composta por um domínio GLA + domínio EGF1 + domínio EGF2 + domínio serino protease; a associação entre estes domínios é mantida por pontes dissulfeto (FAURE; GOWDA; MAROUN, 2007)).

Uma região de grande importância do Fator Xa é o sítio de ligação da heparina (um glicosaminaglicano poliânionico), região formada por resíduos de aminoácidos básicos (Arg93, Lys96, Arg165, Ly169, Lys236 e Arg240). Outra região relevante desse Fator é a tríade do sítio ativo formada pelos resíduos de His57, Asp102 e Ser195; esses resíduos de aminoácidos são conservados em sequências de serino proteases do tipo tripsina-*like* como, por exemplo, o Fator IXa, a Proteína C e a Protrombina (PADMANABHAN et al., 1993).

Em 2007, Faure et al relataram e, em 2017 Saikia et al. reafirmaram que diversos mecanismos podem estar envolvidos na atividade anticoagulante de PLA₂s ofídicas básicas: (i) hidrólise de fosfolipídios procoagulantes e inibição do complexo da tenase extrínseca (sem interação da PLA₂s com o FXa); (ii) competição com proteínas coagulantes pela ligação à superfície lipídica (devido a alta afinidade da PLA₂ pelo fosfolipídio)- efeito antagonista; (iii) mecanismo não enzimático no qual a PLA₂ interage com o FXa, independentemente do fosfolipídio, inibindo a formação do complexo FXa/FVa e aumentando o tempo de geração de trombina.

Em nossos estudos *in silico*, as Asp49-PLA₂s botrópicas básicas (PrTX-III e BthTX-II) interagiram com os resíduos de aminoácido Asp31 e Tyr42 da subunidade B do Fator Xa através de resíduos localizados na α -hélice1 e no *loop* de ligação de cálcio, respectivamente. Além disso, a região catalítica dessas PLA₂s permaneceu livre e acessível para a interação e hidrólise de fosfolipídios, fato este que pode estar correlacionado ao pronunciado efeito anticoagulante observado em nossos experimentos *in vitro*.

Faure e colaboradores (2007) avaliaram as regiões de interação da AtxA (uma Asp49-PLA₂s isolada da peçonha de *Vipera ammodytes ammodytes*) com o Fator Xa e identificaram que o início da folha β antiparalela (resíduos Arg72, Lys74, His76 e Arg77) e o fragmento C-terminal (Arg118, Lys127, Lys128 e Lys132) estavam envolvidos na interação com o Fator Xa. No mesmo trabalho foi também avaliada a interação da isoforma B da Crotoxina B (Asp49-PLA₂s isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*) com este mesmo fator da coagulação e as regiões do *loop* de ligação de cálcio e do *loop* de C-terminal da enzima interagiram com os resíduos de aminoácidos Asn166, Lys169 e Gln178 da subunidade A do Fator Xa. Em nossos estudos de ancoragem molecular, foi observado que tanto a BthA-I como a isoforma B da Crotoxina B interagiram, através do *loop* de ligação de cálcio com a subunidade A do Fator Xa e os mesmos resíduos de aminoácidos do FXa citados por Faure et al.(2007) estavam envolvidos.

Zhong e colaboradores(2002) relataram que a bAhp, uma Asp49-PLA₂ isolada da peçonha de *Agkistrodon halys pallas*, apresentou atividade anticoagulante, porém, após a substituição de uma lisina na posição 67 por um ácido aspártico foi observado redução dessa atividade. Nos experimentos de ancoragem molecular, o aminoácido localizado na posição 67 da BthA-I é um ácido aspártico, o qual interagiu, por ponte salina, com uma argininana posição 93 da subunidade A do Fator Xa. O mesmo foi constatado para a isoforma B da Crotoxina B a qual apresentou um Asn67 interagindo por ligação de hidrogênio com a Arg93 da subunidade A de FXa. Tanto a BthA-I como Crotoxina B (isoformas A e B) não apresentam um aminoácido catiônico (lisina) na posição 67 o que, de acordo com Faure et

al. (2007) pode explicar a fraca atividade anticoagulante observado nos experimentos *in vitro*. É importante complementar que a BthTX-II e a PrTX-III possuem uma lisina na posição 67 e apresentaram forte atividade anticoagulante.

Em nossos experimentos de ancoragem molecular somente resíduos de aminoácidos catiônicos estão envolvidos na interação entre as Lys49-PLA₂s e a subunidade B do Fator Xa. As Lys49-PLA₂s (com exceção da MjTX-II), assim como as Asp49-PLA₂s básicas botrópicas interagiram, principalmente, com o resíduo de aminoácido Asp31 da subunidade B do Fator Xa. A participação desse resíduo de aminoácido do FXa na interação com as PLA₂s parece ser crucial para ancoragem e consequente efeito anticoagulante destas proteínas.

As Lys49-PLA₂s não possuem atividade catalítica, no entanto, conforme observado em nossos experimentos *in vitro*, apresentaram moderada atividade anticoagulante, atuando principalmente na via intrínseca da coagulação. Conforme proposto por Saikia et. al (2017) a interação do Fator Xa com as PLA₂s pode ser dependente ou não da atividade catalítica, e, mesmo na ausência de atividade catalítica, as Lys49-PLA₂s podem desempenhar efeitos farmacológicos diversos, como a anticoagulação independente de catálise.

Faure et al. (2007) realizaram estudos *in vitro* e *in sílico* para determinar a região de ancoragem de diversas PLA₂s ao fator Xa, e mostraram que o sítio catalítico do Fator Xa permaneceu acessível e não esteve envolvido na interface entre a PLA₂s e Fator Xa, uma vez que atividade catalítica de serino-proteinase desse Fator foi conservada mesmo após a associação às PLA₂s. Da mesma forma, quando todos os nossos experimentos de ancoragem entre PLA₂s e Fator Xa foram avaliados, não foram observadas interações das proteínas na região do sítio catalítico de FXa, o que condiz com os estudos apresentados em (2007) por Faure e colaboradores.

Carredano e colaboradores (1998) destacam que PLA₂s isoladas de peçonhas ofídicas da família Viperidae são proteínas multifuncionais e que seus efeitos farmacológicos podem ser causados por múltiplos sítios farmacológicos diferentes do sítio catalítico; relataram, ainda, que estes sítios podem estar sobrepostos ou não. Um exemplo é a RVV-VD (uma Asp49-PLA₂ isolada da peçonha de *Vipera russelli russelli*) a qual apresenta o seu sítio neurotóxico sobreposto à região anticoagulante (CARREDANO *et al.*, 1998). Adicionalmente, Faure e colaboradores (2007) descreveram que vários resíduos da região de C-terminal da AtxA (Asp49-PLA₂ isolada da peçonha de *Vipera ammodytes ammodytes*) estavam claramente envolvidos tanto no efeito anticoagulante quanto no efeito neurotóxico.

Saikia et al. (2017) afirmaram que algumas das PLA₂s podem interagir com outros fatores de coagulação do sangue (Xa, Va, protrombina, trombina). Hopfner e colaboradores

(1997) descreveram o Fator IX como uma proteína formada por múltiplos domínios; um domínio N-terminal de GLA (ácido γ -carboxiglutâmico) seguido por dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF), um peptídeo de ativação (AP) e um domínio C-terminal de serino protease com um sítio ativo semelhante à tripsina. Esta estrutura de domínios define a família de genes FIX de fatores de coagulação (HOPFNER, 1997) e é observada em outros fatores da coagulação, como os Fatores VII, X e a proteína C (PC).

A similaridade estrutural e de arquitetura funcional dos Fatores IXa e Xa (KUNDU; WU, 2021), em adição ao fato de que o complexo tenase intrínseco (FIXa –FVIIIa + superfície fosfolipídica), aumenta a ativação do FXa em até 10^6 vezes, torna o FIXa essencial para a hemostasia (DUFFY; LOLLAR, 1992). Embora fármacos anticoagulantes inibidores específicos do Fator IXa estejam em desenvolvimento, ainda não estão disponíveis comercialmente. Complementarmente, tanto os nossos resultados *in vitro* indicaram expressivo aumento no TTPa, como os resultados de ancoragem molecular indicaram que as PLA₂s ancoraram na região do domínio serino protease do Fator IXa, reforçam a possível participação do FIXa na anticoagulação causada pelas PLA₂s estudadas.

Kini e colaboradores (2005), ao estudarem PLA₂s isoladas da peçonha de *Naja mossambica*, descreveram que as PLA₂s fortemente anticoagulantes apresentavam uma região (entre os resíduos 54-77, incluindo a região de alça elapídica) formada por resíduos catiônicos (básicos), enquanto que para as PLA₂s fracamente anticoagulantes essa região é formada por resíduos aniônicos (ácidos). Deve-se destacar que as PLA₂s descritas por Kini (2005) são Asp49-PLA₂s, pertencentes ao subgrupo IA (família Elapidae) que atuam inibindo o complexo tenase extrínseco. No enquanto, todas as PLA₂s avaliadas no presente estudo pertencem ao subgrupo IIA (família Viperidae) e causaram significativo prolongamento do TTPa indicando interação com componentes da via intrínseca e, portanto, um mecanismo diferente do exposto por Kini em 2005.

Uma das mais importantes propriedades que afetam o efeito anticoagulante é a capacidade das PLA₂s de se inserir em membranas fosfolipídicas e hidrolisar os fosfolipídios (KINI, 1997; MUKHERJEE, 2007). As PLA₂s classificadas como fortemente anticoagulantes apresentam a capacidade pequena, embora específica, de hidrolisar fosfolipídios essenciais para a hemostasia. Em contrapartida, as PLA₂s que apresentam menor atividade anticoagulante hidrolisam os fosfolipídios plasmáticos sem especificidade (Kini e Evans 1989; Saikia et al. 2011). Portanto, PLA₂s que atuam em fosfolipídios não essenciais para a hemostasia, necessitam exercer maior atividade catalítica para que a atividade anticoagulante seja observada (KINI; EVANS, 1989).

Stefansson et al. (1990) descreveram que uma PLA₂ básica isolada da peçonha de *Naja nigricollis* foi capaz de inibir o complexo protrombinase mesmo na ausência de fosfolipídios. Adicionalmente, uma Asp49-PLA₂ ácida purificada da peçonha de *Daboia russelli* desempenhou seu efeito anticoagulante tanto hidrolisando enzimaticamente os fosfolipídios plasmáticos, como competindo com os fatores de coagulação pela ligação aos fosfolipídios essenciais para a coagulação (SAIKIA; MUKHERJEE, 2017).

Por outro lado, Dutta et al. (2015) relataram que a NnPLA₂-I, uma PLA₂ enzimaticamente ativa isolada da peçonha de *Naja naja*, apresentou capacidade de iniciar a atividade amidolítica do FXa sem interferir na sua capacidade de ativar a protrombina. A NnPLA₂-I não causou o prolongamento do TP, porém, o TTPa foi prolongado, indicando que esta enzima atua na inibição de fatores das vias intrínseca ou comum da coagulação. Contudo, os autores sugeriram que a NnPLA₂-I provavelmente ativa alostericamente o FXa, mas, esta ativação não induz a ativação da protrombina pelo FXa.

Apesar de diversos estudos terem sido e continuarem sendo realizados em busca de um minucioso e específico mecanismo de atuação das PLA₂s ofídicas na hemostasia, um modelo ainda não está claramente estabelecido justificando a importância de novos estudos e proposições. De acordo com os resultados obtidos em nossos estudos de ancoragem molecular entre as PLA₂s e os Fatores IXa e Xa da coagulação e, de acordo com os dados de Faure et al (2007), a região 54 a 77 das PLA₂s elapídicas proposta anteriormente por Kini (2005) também poderia ser considerada para as PLA₂s viperídicas, no entanto, outras regiões deveriam ser adicionadas, incluindo a α -hélices 1, o início da folha β , o *loop* de ligação de cálcio e o *loop* de C-terminal.

6 CONCLUSÃO

Nenhuma das quantidades avaliadas das PLA₂s isoladas das peçonhas ofídicas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* causaram a coagulação do plasma citratado humano, mesmo após 2h de incubação a 37°C.

A capacidade anticoagulante das PLA₂s foi mensurada através da avaliação dos Tempos de Protrombina – TP e de Tromboplastina Parcial ativada – TTPa. Nenhuma das PLA₂s avaliadas causou significativo prolongamento do TP, enquanto o TTPa apresentou alterações significativas para todas as PLA₂s. As Asp49-PLA₂s básicas botrópicas foram classificadas como fortemente anticoagulantes; as Asp49-PLA₂s ácida botrópica e básica crotálica foram fracamente anticoagulantes, enquanto que todas as Lys49-PLA₂s foram moderadamente anticoagulantes.

As PLA₂s estudadas podem interferir na cascata de coagulação por três mecanismos independentes ou pela soma deles: i) inibição da formação do complexo tenase observado nas Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s básicas botrópicas que interagiram com a subunidade B dos fatores IXa ou Xa, podendo causar um impedimento estérico; ii) modulação alostérica dos Fatores IXa e Xa induzida pela interação das Lys49-PLA₂s através da região de C-terminal; iii) hidrólise de fosfolipídios e/ou competição das PLA₂s cataliticamente ativas com os fatores de coagulação pela superfície lipídica. Estudos complementares são necessários para avaliar se as Asp49-PLA₂s básicas botrópicas fortemente anticoagulantes exibem seu efeito anticoagulante através de uma combinação de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos.

REFERÊNCIAS

- ABDELKAFI-KOUBAA, Z. *et al.* LES L-AMINO ACIDES OXYDASES DES VENINS DE SERPENTS ET LEURS POTENTIELLES APPLICATIONS BIOMEDICALES. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**, [s. l.], v. 91, n. 1–4, p. 15–32, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26402967>. Acesso em: 1 abr. 2021.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta de Medicamentos**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351423093201068/?nomeProduto=eliqui>. Acesso em: 30 jun. 2021.
- AGUILAR, M. I.; KUO, R. S.; FREEMAN, W. D. New Anticoagulants (Dabigatran, Apixaban, Rivaroxaban) for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 659–675, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733861913000169>.
- ALAPE-GIRÓN, A. *et al.* Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 3556–3571, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr800332p>.
- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Revista de biologia tropical**, [s. l.], v. 36, n. 2 B, p. 563–565, 1988.
- ALVES, E. C. *et al.* Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1–16, 2018.
- ANDE, S. R. *et al.* Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1439–1451, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-006-7959-9>.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. *et al.* Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, [s. l.], v. 82, n. 8, p. 755–763, 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. S. H. *et al.* Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 723–732, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295202012108>.
- ANGULO, Y. *et al.* Isolation and Characterization of a Myotoxic Phospholipase A2 from the Venom of the Arboreal Snake *Bothriechis schlegelii* from Costa Rica. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 339, n. 2, p. 260–266, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986196998653>.
- ARAGÓN-ORTIZ, F.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A. Amino acid sequence of a lectin-like protein from *Lachesis muta stenophrys* venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 763–769, 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041010196000116>.
- ARNI, R. .; WARD, R. . Phospholipase A2—a structural review. **Toxicon**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 827–841, 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041010196000360>.
- BAILON CALDERON, H. *et al.* Development of Nanobodies Against Hemorrhagic and Myotoxic Components of *Bothrops atrox* Snake Venom. **Frontiers in Immunology**, [s. l.],

v. 11, n. May, p. 1–12, 2020.

BANE, C. E.; GAILANI, D. Factor XI as a target for antithrombotic therapy. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 1454–1458, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644614002256>.

BERNARDONI, J. L. *et al.* Functional Variability of Snake Venom Metalloproteinases: Adaptive Advantages in Targeting Different Prey and Implications for Human Envenomation. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e109651, 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109651>.

BHAGAVAN, N. V. Biochemistry of Hemostasis. *In*: MEDICAL BIOCHEMISTRY. [S. l.]: Elsevier, 2002. p. 839-872i. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012095440750038X>.

BJELKE, J. R. *et al.* A loop of coagulation factor VIIa influencing macromolecular substrate specificity. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 581, n. 1, p. 71–76, 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2006.11.079>.

BRASIL. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para uso de hemocomponentes**. Brasília: Editora MS, 2015. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes_2ed.pdf.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil copatrocinou resolução para o problema dos acidentes ofídicos no mundo**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/svs/43413-brasil-copatrocinou-resolucao-para-o-problema-dos-acidentes-ofidicos-no-mundo>. Acesso em: 10 set. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS. SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO**. Brasil: [s. n.], 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria n 204 de 17 de fevereiro de 2016**. Brasília - DF: [s. n.], 2016.

BUDZYNSKI, A. Z.; SHAINOFF, J. R. Fibrinogen and fibrin: Biochemistry and pathophysiology. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 97–146, 1986. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842886800191>.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 50, p. S237–S242, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002227520306180>.

BYON, W. *et al.* Apixaban: A Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Review. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 1265–1279, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40262-019-00775-z>.

CALKOSINSKI, I. *et al.* Skład i właściwości biochemiczne oraz toksyczność jadów węży. **Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, [s. l.], v. 64, p. 262–272, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558864>.

CALVETE, J. J. Snake venom: From the inventory of toxins to biology. **Toxicon**, [s. l.], v. 75, p. 44–62, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.020>.

CALVETE, J. J. *et al.* Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.03.029>.

CARRASCO, P. A. *et al.* Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 109–124, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>.

CARREDANO, E. *et al.* The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A2. **Toxicon**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 75–92, 1998. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010197000512>.

CHAN, N.; SOBIERAJ-TEAGUE, M.; EIKELBOOM, J. W. Direct oral anticoagulants: evidence and unresolved issues. **The Lancet**, [s. l.], v. 396, n. 10264, p. 1767–1776, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620324399>.

CHENG, C.-H. *et al.* L-Amino acid oxidase-induced apoptosis in filamentous *Botrytis cinerea*. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 420, n. 1, p. 93–95, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269711005999>.

CHIPPAUX, J.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Haematology Department, Adelaide Childrens Hospital**. [S. l.: s. n.], 1991.

CUNHA, E. M. da; MARTINS, O. A. Principais Compostos Químicos Presente Nos Venenos De Cobras Dos Gêneros Bothrops E Crotalus – Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, [s. l.], v. 02, n. 1980, p. 21–26, 2012.

DA SILVA GIOTTO, M. T. *et al.* Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 442–454, 1998. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980301\)30:4%3C442::AID-PROT11%3E3.0.CO;2-I](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0134(19980301)30:4%3C442::AID-PROT11%3E3.0.CO;2-I).

DAMICO, D. C. S. *et al.* LmrTX, a basic PLA2 (D49) purified from *Lachesis muta rhombeata* snake venom with enzymatic-related antithrombotic and anticoagulant activity. **Toxicon**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 773–781, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010112005211>.

DE AZEVEDO JR, W. . *et al.* Structure of a Lys49-Phospholipase A2 homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper). **Toxicon**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 371–384, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010198001895>.

DE MOERLOOSE, P.; BOEHLLEN, F. Chapter 12 Blood coagulation and fibrinolysis: mechanisms of thrombosis. *In*: [S. l.: s. n.], 2008. p. 239–246. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007297520801912X>.

DHILLON, D. S. *et al.* Comparison of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 phospholipases A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 1723–1730, 1987. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295287900591>.

DÍAZ, C. *et al.* Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A2 variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Natural Toxins**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 26–31, 1995. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/nt.2620030107>.

DÍAZ, C. *et al.* The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1070, n. 2, p.

455–460, 1991. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000527369190086N>.

DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 298, n. 1, p. 135–142, 1992.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986192901045>.

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom l-amino acid oxidases. **Toxicon**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010102001022>.

DUFFY, E. J.; LOLLAR, P. Intrinsic pathway activation of factor X and its activation peptide-deficient derivative, factor Xdes-143-191. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 267, n. 11, p. 7821–7827, 1992. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1560014>.

DUTTA, S.; GOGOI, D.; MUKHERJEE, A. K. Anticoagulant mechanism and platelet deaggregation property of a non-cytotoxic, acidic phospholipase A2 purified from Indian cobra (*Naja naja*) venom: Inhibition of anticoagulant activity by low molecular weight heparin. **Biochimie**, [s. l.], v. 110, p. 93–106, 2015. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908415000048>.

EMSLEY, J.; MCEWAN, P. A.; GAILANI, D. Structure and function of factor XI. **Blood**, [s. l.], v. 115, n. 13, p. 2569–2577, 2010. Disponível em:

<https://ashpublications.org/blood/article/115/13/2569/26834/Structure-and-function-of-factor-XI>.

FAURE, G.; GOWDA, V. T.; MAROUN, R. C. Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidae snake venom phospholipases A2 by affinity binding studies and molecular bioinformatics. **BMC Structural Biology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 82, 2007. Disponível em: <http://bmcstructbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6807-7-82>.

FEITOSA, S. B.; MISE, Y. F.; MOTA, E. L. A. Ofidismo no Tocantins: análise ecológica de determinantes e áreas de risco, 2007-2015. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. e2020033, 2020.

FRANCIS, C. W. Ximelagatran: a new oral anticoagulant. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 139–152, 2004. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521692604000088>.

FRANCO, R. F. Fisiologia Da Coagulação, Anticoagulação E Fibrinólise Overview of Coagulation, Anticoagulation and Fibrinolysis. **Medicina, Ribeirão Preto**, [s. l.], v. 34, p. 229–237, 2001.

GALE, A. J. Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 273–280, 2011. Disponível em:

<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623310389474>.

GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. G. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. **Toxicon**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1–11, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010109005145>.

HALL, T. NoBioEdit: An important software for molecular biology Title. **GERF Bulletin of Biosciences**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 60–61, 2011.

HOFFBRAND, A.; MOSS, P. **Fundamentos em Hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOPFNER, K.-P. Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 16, n. 22, p. 6626–6635, 1997. Disponível em: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/16.22.6626>.

HUNTINGTON, J. A. Thrombin plasticity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1824, n. 1, p. 246–252, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963911002007>.

HUTTON, R. A.; WARRELL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 176–189, 1993.

KIM, J.-M. *et al.* Dabigatran Acylglucuronide, the Major Metabolite of Dabigatran, Shows a Weaker Anticoagulant Effect than Dabigatran. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 257, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/2/257>.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: Structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006.

KINI, R. M. Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle. Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism. [s. l.], p. 1–28, 1997.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1147–1161, 2005.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 613–635, 1989.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 63, n. 24, p. 3030–3041, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-006-6315-0>.

KOZAKOV, D. *et al.* The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2016.169>.

KRISHNASWAMY, S. The transition of prothrombin to thrombin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 11, p. 265–276, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jth.12217>.

KUNDU, S.; WU, S. A Structure Based Study of Selective Inhibition of Factor IXa over Factor Xa. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 17, p. 5372, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5372>.

LASSILA, R. Management of coagulation factor VIII (FVIII) inhibitors. **Thrombosis Research**, [s. l.], v. 181, p. S60–S61, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004938481930369X>.

LAWSON, J. H.; MANN, K. G. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 266, n. 17, p. 11317–11327, 1991. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818991659>.

LAZO, F. *et al.* Biochemical, biological and molecular characterization of an L-Amino acid oxidase (LAAO) purified from *Bothrops pictus* Peruvian snake venom. **Toxicon**, [s. l.], v.

139, p. 74–86, 2017. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010117302982>.

LEMOS, J. de C. *et al.* Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 50–59, 2009. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2009000100006&lng=pt&tlng=pt.

LEOBAS, G. F.; SEIBERT, C. S.; FEITOSA, S. B. Acidentes por animais peçonhentos no Estado do Tocantins: aspectos clínico-epidemiológicos. **DESAFIOS: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 269, 2016.

Disponível em: <http://revista.uft.edu.br/index.php/desafios/article/view/964>.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. **Therapeutic potential of venom peptides**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: www.nature.com/reviews/drugdisc.

LOMONTE, B. *et al.* Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 1509–1518, 1994.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295294905258>.

MADDINENI, J. *et al.* Product Individuality of Commercially Available Low-Molecular-Weight Heparins and Their Generic Versions: Therapeutic Implications. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 267–276, 2006. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1076029606291434>.

MAGRO, A. J. *et al.* Structure of BthA-I complexed with p -bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [s. l.], v. 61, n. 12, p. 1670–1677, 2005. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444905029598>.

MANCUSO, L. C. *et al.* Fractionation of Bothrops pirajai snake venom: Isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 615–626, 1995.

MARAGANORE, J. M. *et al.* A New Class of Phospholipases A2 with Lysine in Place of Aspartate 49. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, [s. l.], v. 259, n. 22, p. 13839–13843, 1984.

MARCUSSI, S. *et al.* Snake Venom Phospholipase A2 Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 743–756, 2007. Disponível em:

<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=7&issue=8&spage=743>.

MARSH, N.; VAUGHAN, W. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1171–1181, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010105000796>.

MARTINS, B. F. *et al.* Acidentes por serpente (Bothrops spp. e Crotallus spp.) em crianças: relato de dois casos TT - Accidents caused by snakes (bothrops spp. And crotallus spp.) In children: report of two cases. **Rev. RENE**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 693–703, 2012. Disponível em: <http://www.revistarene.ufc.br/revista/index.php/revista/article/view/737/pdf>.

MISE, Y. **ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO OFIDISMO NO NORDESTE BRASILEIRO**. 2014. 116 f. - Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, 2014.

Disponível em: <http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/17436>. Acesso em: 20 jan. 2019.

MOADDEL, M.; FALLS, L. A.; FARRELL, D. H. The Role of $\gamma A/\gamma'$ Fibrinogen in Plasma Factor XIII Activation. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 41, p. 32135–32140, 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820892989>.

MONTEIRO, W. M. *et al.* Bothrops atrox, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. **Toxicon**: X, [s. l.], v. 6, 2020.

MORITA, T. C-type Lectin-related Proteins from Snake Venoms. **Current Drug Target - Cardiovascular & Hematological Disorders**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 357–373, 2004. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0061&volume=4&issue=4&spage=357>.

MUKHERJEE, A. K. Correlation between the phospholipids domains of the target cell membrane and the extent of Naja kaouthia PLA2-induced membrane damage: Evidence of distinct catalytic and cytotoxic sites in PLA2 molecules. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1770, n. 2, p. 187–195, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416506003011>.

MURAKAMI, T. *et al.* Island specific expression of a novel [Lys49]phospholipase A2 (BPIII) in Protobothrops flavoviridis venom in Amami–Oshima, Japan. **Toxicon**, [s. l.], v. 54, n. 4, p. 399–407, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010109002487>.

NEGRIER, C.; SHIMA, M.; HOFFMAN, M. The central role of thrombin in bleeding disorders. **Blood Reviews**, [s. l.], v. 38, p. 100582, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X18300973>.

NEUENSCHWANDER, P. F. COAGULATION CASCADE | Factor X. In: **ENCYCLOPEDIA OF RESPIRATORY MEDICINE**. [S. l.]: Elsevier, 2006. p. 499–503. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0123708796000855>.

NUNES, A. A. P.; NASCIMENTO, M. M.; GOMES, M. S. R. Composição da peçonha de serpente : ação das metaloproteases , serinoproteases e sua aplicação farmacológica Composition of the snake venom : action of metaloproteases ,. [s. l.], p. 35–40, 2021.

NÚÑEZ, V. *et al.* Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake Bothrops atrox. **Toxicon**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 91–101, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010104001837>.

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A2 from Agkistrodon piscivorus piscivorus snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1587–1594, 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010101001416>.

OGAWA, T. *et al.* Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 1–14, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010104003411>.

OLIVEIRA, F. *et al.* Biochemical and functional characterization of BmoosP, a new serine protease from Bothrops moojeni snake venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 111, p. 130–138, 2016.

OWNBY, C. L. *et al.* Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 411–445, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010198001883>.

PADMANABHAN, K. *et al.* Structure of Human Des(1-45) Factor Xa at 2.2 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 232, n. 3, p. 947–966, 1993. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283683714415>.

PARK, S. H. *et al.* Evaluation of global laboratory methods and establishing on-therapy ranges for monitoring apixaban and rivaroxaban: Experience at a single institution. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 33, n. 5, 2019.

PAULA, C. S. *et al.* Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 189–195, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000200004&lng=pt&tlng=pt.

PEREIRA, J. M. *et al.* Predição da neutralização do efeito coagulante da peçonha de *Bothrops pauloensis* pelo extrato aquoso de *hedychium coronarium* (zingiberaceae) através de modelos de regressão. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 973–980, 2010.

PERZBORN, E. *et al.* The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 61–75, 2011. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrd3185>.

PINHO, F.; PEREIRA, I. Ofidismo. **OFIDISMO**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001.

PINTO, D. J. P. *et al.* Structure-based design of inhibitors of coagulation factor XIa with novel P1 moieties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 1635–1642, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X15000402>.

PUY, C.; RIGG, R. A.; MCCARTY, O. J. T. The hemostatic role of factor XI. **Thrombosis Research**, [s. l.], v. 141, p. S8–S11, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384816303541>.

QUEIROZ, M. *et al.* Biological characterization of a myotoxin phospholipase A2 homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 49–58, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992011000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

RAND, M.; KALAFATIS, M.; MANN, K. Platelet coagulation factor Va: the major secretory platelet phosphoprotein. **Blood**, [s. l.], v. 83, n. 8, p. 2180–2190, 1994. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/83/8/2180/171481/Platelet-coagulation-factor-Va-the-major-secretory>.

RANGEL-SANTOS, A. *et al.* A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 801–810, 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010104001047>.

RENETSEDER, R. *et al.* A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 260, n. 21, p. 11627–11634, 1985. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4044572>.

RODRIGUES, F. R. *et al.* ACIDENTES CAUSADOS POR SERPENTES DO GÊNERO *Crotalus* EM PEQUENOS ANIMAIS – REVISÃO DE LITERATURA. **Nucleus Animalium**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 91–100, 2016. Disponível em: <http://nucleus.feituverava.com.br/index.php/animalium/article/view/1598>.

RODRIGUES, E. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 218–233, 2012. Disponível em: <http://revistas.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/536>.

RODRIGUES, R. S. *et al.* Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, [s. l.], v. 91, n. 4, p. 490–501, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908408003386>.

SAIKIA, D.; MUKHERJEE, A. K. Anticoagulant and Membrane Damaging Properties of Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. In: **SNAKE VENOMS**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017. p. 87–104. *E-book*. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6410-1_18.

SARAIVA, M. G. *et al.* Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos no Estado da Paraíba, Brasil, 2005 a 2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 449–456, 2012. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742012000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

SCHMIDT, A. E. *et al.* Na⁺ Site in Blood Coagulation Factor IXa: Effect on Catalysis and Factor VIIIa Binding. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 350, n. 1, p. 78–91, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605004869>.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010105000759>.

SHARMA, M. *et al.* Daboxin P, a Major Phospholipase A2 Enzyme from the Indian *Daboia russelii* Venom Targets Factor X and Factor Xa for Its Anticoagulant Activity. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e0153770, 2016. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0153770>.

SILVA, A. M. da; BERNARDE, P. S.; ABREU, L. C. de. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade. **Rev. bras. crescimento desenvolv. hum**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 54–62, 2015.

SILVA, E. S.; BOCHNER, R.; GIMÉNEZ, A. R. M. O ensino das principais características das serpentes peçonhentas brasileiras: avaliação das literaturas didáticas no Ensino Fundamental do Município do Rio de Janeiro. **Educar em Revista**, [s. l.], n. 42, p. 297–316, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-40602011000500019&lng=pt&tlng=pt.

SMITH, S. B. *et al.* Characterization of Novel Forms of Coagulation Factor XIa. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 11, p. 6696–6705, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820571056>.

SOARES, A. M. *et al.* A rapid procedure for the isolation of the LYS-49 myotoxin II from *bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 503–514, 1998.

SOARES, A. M. *et al.* Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 877–888, 2001.

SOARES, A. M. *et al.* Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A2 Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 378, n. 2, p. 201–209, 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986100917909>.

SOARES, A. M. *et al.* Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 373, n. 1, p. 7–15, 2000.

STEFANSSON, S.; KINI, R. M.; EVANS, H. J. The basic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymic mechanism. **Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 33, p. 7742–7746, 1990. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00485a024>.

SUN, X.; EVATT, B.; GRIFFIN, J. Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. **Blood**, [s. l.], v. 83, n. 11, p. 3120–3125, 1994. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/83/11/3120/171061/Blood-coagulation-factor-Va-abnormality-associated>.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1824, n. 1, p. 164–176, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>.

TAN, N.-H.; FUNG, S.-Y. **Snake Venom L-Amino Acid Oxidases and Their Potential Biomedical Applications** *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. [S. l.: s. n.], 2008.

TEIXEIRA, S. C. *et al.* Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 616–625, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020339349>.

TERRA, R. M. S. *et al.* Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. **Toxicon**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 836–844, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010109003043>.

TOYAMA, M. H. *et al.* Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **Journal of Protein Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 713–718, 1998.

TOYAMA, M. H. *et al.* Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 245–250, 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908400002029>.

TOYAMA, M. H. *et al.* Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **Journal of protein chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 371–378, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395455>.

UETZ, P. **THE REPTILE DATABASE**. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://www.reptile->

database.org/. Acesso em: 8 abr. 2021.

ULLAH, A. Structure–Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.00110/full>.

VERHEIJ, H. M. *et al.* Correlation of Enzymatic Activity and Anticoagulant Properties of Phospholipase A2. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 112, n. 1, p. 25–32, 1980.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7630882>.

WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp033>.

WEIDMANN, H. *et al.* The plasma contact system, a protease cascade at the nexus of inflammation, coagulation and immunity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1864, n. 11, p. 2118–2127, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488917301957>.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature**, [s. l.], v. 360, n. 6400, p. 127–134, 1992.

WILLIGE, S. U. de *et al.* The pleiotropic role of the fibrinogen γ' chain in hemostasis. **Blood**, [s. l.], v. 114, n. 19, p. 3994–4001, 2009. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/114/19/3994/26722/The-pleiotropic-role-of-the-fibrinogen-gamma-chain-in>.

ZAQUEO, K. . **Purificação e caracterização parcial de uma serinoprotease inédita do veneno da serpente Bothrops pirajai**. 2011. 111 f. - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho - RO, 2011.

ZHONG, X. *et al.* Functionally Important Residues for the Anticoagulant Activity of A Basic Phospholipase A2 from the Agkistrodon Halys Pallas. **Protein & Peptide Letters**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 427–434, 2002. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8665&volume=9&issue=5&page=427>.

APÊNDICES

APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO PRODUZIDO DURANTE O PERÍODO MAIS RESTRITIVO DA PANDEMIA DE COVID-19 EM PARALELO AO DESENVOLVIMENTO DA DISSERTAÇÃO



Case Report

J Med Cases. 2020;000(000):000-000

Malignant Hyperthermia in Bariatric Surgery: A Case Study With Clinical, Pathophysiological, Biochemical and Biophysical Correlations

Pierri E.A. Oliveira^a, Guilherme H.M. Salvador^b, Daniela P. Marchi-Salvador^{a, c}

Abstract

Malignant hyperthermia (MH) is an acute pharmacogenetic disorder, which while uncommon is potentially fatal. MH is a calcium channelopathy of skeletal muscle in which a constant increase of intracytoplasmic Ca^{2+} concentration occurs causing a change in cellular metabolism. A hypermetabolic state develops when susceptible patients are exposed to halogenated volatile inhalational anesthetic agents and depolarizing muscle relaxants and/or extreme physical activity in hot environments. MH presents variable clinical expression. During an episode of MH, the patient may present clinical signs and laboratory findings including masseter muscle spasm, tachycardia, rise in end-tidal CO_2 ($EtCO_2$), tachypnea, hyperthermia, cyanosis, metabolic acidosis, rhabdomyolysis, hyperkalemia, myoglobinuria, hyperlactacidemia, and acute renal failure. The aim of this case report is to describe an episode of MH associated with the use of halogenated anesthetic during bariatric surgery. A 29-year-old Brazilian man was admitted to the hospital to undergo a bariatric surgery. The patient's relevant medical history included morbid obesity grade III, allergy to sulfa-based drugs and severe obstructive sleep apnea. Preoperative evaluations with cardiopulmonary exercise testing, echocardiogram and electrocardiogram showed no anatomical and functional changes of the patient's heart. Surgical procedures lasted for 4 h, without complications, but the evolution of the patient's condition indicated oliguria and acute breathing insufficiency. Five hours after the patient was placed under mechanical ventilation in the intensive care unit, he started to present clinical signs of hypermetabolic state, with tremors, excessive sweating, and rapid body temperature increases. In the postoperative period, the patient had hyperglycemia, hypocalcemia, hypernatremia, hyperkalemia, changes in creatine phosphokinase (CPK), aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase

(ALT), urea and creatine concentrations, and metabolic and respiratory acidosis. Urinalysis showed traces of proteinuria, presence of ketones, leukocytes, red blood cells, and urobilinogen. In our case report, MH crisis was diagnosed late; the dantrolene was not administered because it was not available and the patient died. This detailed case report of MH episode triggered by isoflurane anesthetic during bariatric surgery allowed us to describe the severity and lethality of this hypermetabolic syndrome. Dantrolene should be mandatory in all operating rooms. Knowledge of the symptoms, an early diagnosis and an adequate treatment can prevent the death of patients in MH crisis.

Keywords: Pharmacogenetic disorder; Halogenated anesthetic; Hypermetabolic state; Metabolic acidosis; High CPK concentration; Respiratory acidosis; Dantrolene sodium; Caffeine-halothane contracture test

Introduction

Malignant hyperthermia (MH) is an acute pharmacogenetic disorder, which while uncommon is potentially fatal [1, 2]. In humans, susceptibility to MH is an inherited disorder and it has an autosomal dominant pattern [3-7]. To date, genes located at six chromosomal loci associated with MH have been described: 1) Ryanodine receptor type 1 (*RyR1*) gene, ryanodine receptor found in skeletal muscle (chromosomal locus 19q13.1); 2) *CACNA1S* gene, which encodes for the alpha-1S subunit of dihydropyridine (chromosomal locus 1q32); 3) A variant of the *STAC3* gene, which encodes an important protein for excitation-contraction coupling via trafficking the voltage sensor into the correct T-tubular location (chromosomal locus 7q21-q22); 4) *SCN4A* gene (possible), related to voltage-dependent sodium channel of skeletal muscle (chromosomal locus 17q11.2-q24); and, not yet identified genes for 5) chromosomal loci 3q13.1 and 6) 5p [2, 5, 7-10]. However, these genes associated with MH show incomplete penetrance and variable expression [4, 5, 7].

MH is related to muscle function and calcium levels. A muscle contraction starts when the action potential arrives at the neuromuscular junction, starting a muscle depolarization and causing a conformational change in the T-tubular L-type voltage-dependent calcium channel (dihydropyridine calcium channel receptor, DHPR). This conformational change activates the *RyR1* leading to a rapid release of Ca^{2+} , from sar-

Manuscript submitted September 2, 2020, accepted September 19, 2020
Published online xx xx, 2020

^aDepartamento de Biologia Molecular, CCEN, UFPB, Joao Pessoa, PB, Brazil

^bDepartamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

^cCorresponding Author: Daniela P. Marchi-Salvador, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Departamento de Biologia Molecular (DBM), Laboratório de Cristalografia de Problemas (CPr-Lab), Campus I – Cidade Universitária, Joao Pessoa, PB, 58051-900, Brazil. Email: danimarchi@dbm.ufpb.br

doi: <https://doi.org/10.14740/jmc3577>

coplasmic reticulum, increasing the intracytoplasmic Ca^{2+} concentration [5, 11-13]. Muscle relaxation occurs when stimulation of the motor nerve stops and the intracellular adenosine triphosphate (ATP)-dependent Ca^{2+} pump transports intracytoplasmic Ca^{2+} into the sarcoplasmic reticulum lumen [5, 7, 13, 14]. MH is a calcium channelopathy of skeletal muscle [15] in which a constant increase of intracytoplasmic Ca^{2+} concentration occurs causing a change in cellular metabolism [5, 7-9, 13]. A hypermetabolic state develops when susceptible patients are exposed to halogenated volatile inhalational anesthetic agents (halothane, isoflurane, enflurane, sevoflurane, desflurane and methoxyflurane), depolarizing muscle relaxants (e.g., succinylcholine), and/or extreme physical activity in hot environments [3, 7, 8, 16-18]. The MH clinical incidence is estimated to be from 1 in 10,000 - 30,000 to 1 in 100,000 - 250,000 in patients undergoing anesthesia, depending on geographic localization and age [6, 9]. Nevertheless, the prevalence of genetic variants or mutations of an individual susceptible to MH is estimated to be 1 in 2,000 - 3,000 [5, 6, 10]. MH affects all ethnic groups and both sexes, although there is a greater predisposition for men and children, and it is atypical in the elderly [3, 5-7]. The MH episode can occur both in the first exposure to the substances that triggers the crisis and in subsequent contacts [8, 19, 20].

MH presents variable clinical expression [2, 5]. During an episode of MH, the patient may present clinical signs and laboratory findings including masseter muscle spasm, tachycardia, rise in end-tidal CO_2 concentration (EtCO_2), tachypnea, hyperthermia, cyanosis, metabolic acidosis, rhabdomyolysis, hyperkalemia, myoglobinuria, hyperlactacidemia and acute renal failure [1, 3, 7, 8, 17, 21]. When the pathology is diagnosed, the exposure to the triggering agents should be discontinued followed by immediate intravenous administration of dantrolene sodium, a hydantoin-derived skeletal muscle relaxant drug [5, 11, 17, 22, 23]. Dantrolene remains the drug of choice for MH prophylaxis and treatment [8, 11, 22]. In addition, protocols must be established to control or prevent complications associated with the clinical condition of the disease. These include external (if necessary, internal) cooling of the patient's body, hyperventilation with 100% oxygen, correction of metabolic acidosis, adjustment of cardiac arrhythmias, dialysis to remove anesthetic residues and aid in blood filtration to revert metabolites to normal levels [3, 6, 8, 9].

Several tests have been proposed or are being investigated as less invasive diagnostic tests to determinate MH susceptible patients [24], including: 1) Evaluation of creatine kinase concentrations; 2) *In vitro* measurement for the concentrations of ATP, phosphocreatine or other phosphomonoesters, along with pH, in muscle and other tissue by nuclear magnetic resonance spectroscopy; 3) Evaluation of calcium flow at *RYR1* receptors on B lymphocytes; 4) Assessment of the enhanced intracellular calcium from cultured muscle tissue; and 5) Molecular genetic tests to look for mutations in the genes associated with MH susceptibility. However, the caffeine-halothane contracture test (CHCT) remains the standard method used in Brazil [1, 12, 24, 25]. CHCT must be performed on a biopsy of approximately 2 g of muscle from the vastus lateralis or vastus medialis [3, 12, 24]. The muscle fragment is longitudinally dissected into strips and the level of muscle contraction is assessed before and after

exposure to caffeine and halothane (*RYR1* agonists) [6, 24]. Individuals who are susceptible to MH have a CHCT positive result when abnormally high levels of contractile force are detected after the caffeine and/or halothane exposure [6, 12, 24, 26]. The aim of this case report is to describe an episode of MH associated with the use of halogenated anesthetic during bariatric surgery. The case study is intended to serve as inclusive knowledge and a reference tool for healthcare professionals and academic-scientific area with respect to clinical, pathophysiological, biochemical, and biophysical correlations.

Case Report

Informed consent was obtained from the patient's family as well as authorization to use and disclose protected health information. L.R.M.S was a 29-year-old man, born in Jau, Sao Paulo, Brazil but with European ascendance. He was admitted to the Hospital Santa Casa de Jahu to undergo a bariatric surgery, vertical gastropasty to Roux-en-Y gastric bypass without a ring, using the conventional technique (not performed by laparoscopy).

The patient's relevant medical history included morbid obesity grade III, allergy to sulfa-based drugs and severe obstructive sleep apnea (i.e., apnea and hypopnea index greater than 30 hypopneas and apneas per hour). The patient complained of episodes of gastroesophageal reflux and the repeated occurrences of calf cramps. In addition, due to the obesity condition, the patient possessed a lack of energy, impaired mobility, episodes of peak hypertension, and mood changes. The patient was using antidepressant medications to treat anxiety. Preoperative evaluations with cardiopulmonary exercise testing, echocardiogram with color Doppler and electrocardiogram showed no anatomical and functional changes of the patient's heart. However, some signs of hepatic steatosis were detected from a total abdominal ultrasound and spirometry test showed a mild obstructive ventilatory defect. On pre-anesthetic evaluation, the patient reported that he had never undergone general anesthesia. Furthermore, none of his family members had presented complications in surgical procedures with general anesthesia.

Upon arriving at the operating room, the patient's preoperative blood pressure was 200/130 mm Hg with an oxygen saturation of 94%. Although the patient's oxygen saturation showed normal in the preoperative exams, while lying down a significant drop in this saturation was observed. Surgical procedures started at approximately 8 am on February 14, 2011 and ended at 12:50 pm, without complications. General anesthesia was induced and maintained with the following agents as described in Table 1.

After the end of the surgical procedures, the patient remained in the operating room for another hour until he responded to stimuli. Then, the patient was taken to the recovery room, where he stayed until 2 pm. According to medical reports, the evolution of the patient's condition indicated oliguria and acute breathing insufficiency. Therefore, the patient was placed under mechanical ventilation in the intensive care unit (ICU).

Table 1. Anesthetics, Analgesic and Muscle Relaxant Agents Used During the Intraoperative Period

Agents	Drug class	Route of administration	Administration schedule			
			8 am	9 am	10 am	12 am
Propofol	Injectable general anesthetic	Intravenous	15 mL	-	-	-
Fentanyl	Opioid analgesic	Intravenous	10 mL	5.0 mL	5.0 mL	-
Alfentanil	Opioid analgesic	Intravenous	5.0 mL	5.0 mL	-	-
Atracurium	Non-depolarizing neuromuscular blocking	Intravenous	5.0 mL	2.5 mL	-	2.5 mL
Isoflurane	Volatile general anesthetic	Inhalational	80 mL			

Five hours after the patient arrived at the ICU, he started to present clinical signs of hypermetabolic state, with tremors, excessive sweating, and rapid body temperature increases. In early postoperative, the temperature was being adjusted with an antipyretic (dipyrene) administration. On postoperative days 0 (02/14), 1 (02/15), 2 (02/16) and 3 (02/17), nursing reports described an unstable blood pressure, tachycardia and persistent hyperthermia, as shown in Table 2.

In the early postoperative, a chest X-ray was performed, which indicated an elevation of diaphragmatic domes. In addition, the routine tracheal aspiration for intubated patients was carried out and the patient had serosanguinolent secretion.

Some laboratory tests and arterial-blood gas analyses were performed to monitor the patient's clinical conditions (Table 3). The blood sugar levels were measured in the pre- and post-operative periods and hyperglycemia was observed in postoperative tests. Postoperative changes in creatine phosphokinase (CPK) concentration were also observed. The first CPK test was carried out on February 15 at 08:26 am, indicating a high CPK concentration, more than 2,380 U/L. After 5 h, a new CPK evaluation was done showing an increase of 164%. The level of serum calcium was normal in the preoperative evaluation; however, the calcium test performed on postoperative day 1 (morning) showed hypocalcemia, whereas in the following postoperative tests the concentration of this ion was

returned to the normal level. Serum sodium levels increased from postoperative day 2, while hyperkalemia was observed in the afternoon of postoperative day 1. Serum levels of urea and creatinine were evaluated in the pre- and post-operative periods. Urea and creatinine concentrations were normal in the preoperative tests; however, on postoperative day 1, urea was 78% higher and creatinine increased more than 350%. On the following postoperative days, both urea and creatinine concentrations kept increasing. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) enzymes were evaluated in the pre- and postoperative periods. In the preoperative test, the AST and ALT levels were normal. On postoperative day 1 (morning) the AST and ALT levels were approximately 22 and 15 times higher, respectively. A new AST and ALT test were carried out after 5 h and the values almost doubled.

Two arterial-blood gas analyses were performed on postoperative day 1. The first arterial-blood gas analysis (08:26 am) showed normal rates, although the partial pressure of oxygen (PaO₂) increased due to the patient being on mechanical ventilation with pure oxygen. The second arterial-blood gas analysis (01:18 pm) indicated acidification of the blood pH and significant changes in both the concentration of base excess and in arterial-blood distribution of gases. In addition, the bicarbonate concentration remained in a normal range and the partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂) increased in both

Table 2. Postoperative Vitals Control According to the Nursing Reports

Hour	Temperature (°C)				Heart rate (beats/min)				Blood pressure (mm Hg)				Blood O ₂ saturation (%)			
	02/14	02/15	02/16	02/17	02/14	02/15	02/16	02/17	02/14	02/15	02/16	02/17	02/14	02/15	02/16	02/17
2 am		38.4	39.9	40.1		124	128	142		190/120	131/30	152/49	92	94	95	
4 am		38.5	40.3	40.6		120	126	140		160/100	150/32	153/51	95	96	95	
6 am		38.5	40.3	40.7		122	130	142		140/80	139/66	149/66	95	90	97	
8 am		38.6	38.5	40.8		133	129	145		140/60	125/34	161/56	91	95	96	
10 am		38.0	38.3	40.8		128	135	142		169/51	113/35	124/46	90	-	95	
12 am		39.3	40.4	40.8		132	132	142		171/53	123/37	151/50	90	90	97	
2 pm		39.3	40.6	41.2		126	134	143		140/60	139/40	150/50	99	95	97	
4 pm		39.5	39.9	41.5		128	139	154		120/50	134/44	150/47	93	96	100	
6 pm		39.7	40.3	H (42↑)		121	133	174		130/60	125/41	99/27	97	94	92	
8 pm	38.0	39.4	40.3	H (42↑)		121	132	174		156/31	127/43	62/27	97	92	84	
10 pm	37.8	39.8	40.4		100	126	138		180/90	136/34	133/42		97	94	96	
12 pm	38.9	39.9	40.5		120	127	145		160/80	117/31	153/48		97	93	91	

Table 3. Follow-Up Labs and Arterial-Blood Gas Results

Parameters (levels range ^a)	Preoperative		Postoperative		
	12/27/2010	02/15 morning	02/15 afternoon	02/16 afternoon	02/17 afternoon
Glucose (mg/dL) (75 - 99)	91	98	141	128	
CPK (U/L) (< 190)		2,384	6,280	6,890	7,200
Calcium (mg/dL) (8.5 - 10.3)	10.2	6.8	9.5	8.4	
Sodium (mEq/L) (138 - 146)		141	143	155	147
Potassium (mEq/L) (3.8 - 5.5)		5.0	5.9	4.8	4.0
Urea (mg/dL) (18 - 40)	28	50		140	207
Creatinine (mg/dL) (0.6 - 1.2)	0.6	2.0	2.8	6.9	13.0
AST (U/L) (10 - 34)	26	579	1,088		649
ALT (U/L) (9 - 43)	42	667	1,160		554
pH (7.38 - 7.44)		7.41	7.17		
PaO ₂ (mm Hg) (80 - 90)		127.6	105.5		
PaCO ₂ (mm Hg) (31 - 41)		35.5	68.4		
HCO ₃ ⁻ (mEq/L) (21 - 27)		22.0	24.3		
BE (mEq/L) (-2.4 - +2.4)		-1.9	-5.8		
ab-SatO ₂ (%) (95 - 97)		98.0	95.7		

^aLevels range for adult men. CPK: creatine phosphokinase; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; pH: potential of hydrogen; PaO₂: partial pressure of oxygen; PaCO₂: partial pressure of carbon dioxide; HCO₃⁻: bicarbonate ion; BE: base excess; ab-SatO₂: arterial blood oxygen saturation level.

arterial-blood gas analyses (Table 3).

Preoperative and postoperative blood counts were performed. In the preoperative blood counts, the absolute number of leukocytes was 7,900 mm³ (level range: 4,000 - 10,000 mm³). On postoperative day 1, two blood counts were carried out; the first one showed a significant increase of leukocytes (14,700 mm³), characterizing a leukocytosis. After 2 h, a new leukocyte count was performed and the absolute number decreased to 12,000 mm³. On postoperative day 2, the absolute number of leukocytes was 13,800 mm³, while the last blood count performed on postoperative day 3 showed 13,000 leukocytes per mm³.

On the postoperative day 1, an echocardiogram was performed and showed mild symmetric hypertrophy. On the same day, a new chest X-ray was carried out and indicated little pulmonary inspiration, bilateral basal interstitial infiltrate, veiled left diaphragmatic dome, and globose cardiac area.

On the postoperative day 2, an abdominal ultrasound was carried out and did not indicate any anatomical alteration of the liver, gallbladder, spleen, kidneys, and bladder. In addition, it did not indicate signs of ascites or pleural effusion. A third chest X-ray was performed revealing a veiling of the base of the right lung, cardiomegaly, aortic stretching, permeable costophrenic sinuses and free diaphragmatic domes.

On the postoperative day 3 (08:15 am), an urinalysis was accomplished and showed traces of proteinuria, presence of ketones, leukocytes (17,600/mL), red blood cells (12,000/mL), and urobilinogen (0.2 UE). On the same day (3:50 pm), the medical records reported the establishment of multifactorial acute respiratory and renal failures, rhabdomyolysis, systemic inflammatory process and, for the first time, MH crisis was

assumed. At night, nursing reports recorded edema formation of lower limbs, cold and cyanotic extremities, distended abdomen, paleness, and septic shock a few hours before the death of the patient.

The MH diagnosis of L.R.M.S. was conducted less than 5 h before his death, and the administration of dantrolene sodium was not performed. The patient's exposure to the substances that triggered the crisis was completed when the surgical procedures were over. External body cooling and hyperventilation with pure oxygen were administered in the following postoperative days. Dialysis was done a few hours before the patient's death; however, according to medical reports this procedure caused decompensation of several of the patient's clinical and laboratory parameters. The patient died at 9:20 pm on February 17, 2011 in the Hospital Santa Casa de Jahu.

Discussion

In MH crises, there is a persistent increase in the intracytoplasmic calcium concentration. The initial manifestations of a hypermetabolic state induce fast depletion of ATP causing increased carbon dioxide production, increased oxygen demands, respiratory acidosis, and increased temperature [6, 13, 14]. The constant rise in oxygen consumption will lead to a hypoxia and progressive lactic acidosis, while depletion of ATP due to hypermetabolism of skeletal muscle cells will result in metabolic acidosis [7, 13]. Based on the clinical and lab findings, a late diagnosis of MH crisis was established for patient L.R.M.S. According to Litman et al (2008) [27], a MH crisis may occur at any time during anesthesia as well as in

the early postoperative period, although not usually 1 h after discontinuation of volatile agents. However, in our case the patient displayed initial symptoms of MH after 11 h of isoflurane administration, a late postoperative crisis.

Hyperthermia is a key indicator of MH, since the rapid increase in body temperature occurs due to the process of sustained muscle contraction [3, 5, 8]. In the initial postoperative period, the patient's temperature increase was being controlled with the administration of antipyretic. Thereafter, hyperthermia no longer responded with the antipyretic administration, and the patient's body was cooled externally. However, even with measures taken to control the temperature, it continued to increase. Tachycardia is another clinical sign characteristic of MH and it has been registered since the early postoperative period, as described in Table 2.

Constant muscle contraction causes a decrease in ATP levels and consequent difficulty in muscle relaxation, which explains the masseter rigidity presented by patients during the MH crisis [5, 6, 13, 28]. The patient L.R.M.S. was placed on spontaneous ventilation after the surgical procedure but was maintained with Montgomery T-tube due to his morbid obesity. After being transferred to the ICU, the patient presented a drop in oxygen saturation and needed to be placed on a mechanical respirator, in which he remained until his death. However, it was not observed whether the patient showed masseter rigidity as described in other MH case reports.

High temperatures (at times over 42 degrees) achieved during MH crisis, together with the toxins released due to rapid and severe catabolism. It causes profound and acute inflammatory and functional changes of internal organs, leading to changes in the information contained in the blood [7, 8, 29-31]. If diagnosed late, MH causes multiple organ dysfunction (e.g., kidneys, pancreas and liver), disseminated intravascular coagulation (DIC), cardiac dysrhythmias (cardiac arrest), and can progress to multiple organ failure [3, 5, 6, 17, 32].

The pre- and early post-operative patient's blood sugar tests were normal. After the afternoon of postoperative day 1, the glucose concentration increased. The hyperglycemia presented by the patient could be due to both a dysfunction of the pancreas caused by the hypermetabolic state and the need of the body to try to supply glucose for the ATP production and, consequently, muscle relaxation.

Creatine phosphokinase is one of the most sensitive indicators of muscular damage. High serum levels of CPK observed after general anesthesia is a strong indicator of an MH crisis [4]. Expressively high values in the serum CPK concentration indicate damage to contractile cells [31, 33], since this enzyme plays an important role in regulation of muscle contraction [34]. Although serum CPK levels were not evaluated during the intraoperative period, our patient presented high levels in all dosages performed in the postoperative period. The increase in serum CPK concentration occurs due to cell lysis, as this enzyme is not able to naturally cross the sarco-plasmic membrane [29, 31, 33].

Calcium is essential for the integrity and structure of cell membranes, proper conduction of electrical stimuli (cardiac and muscular) blood clotting, and bone formation growth [35]. When serum calcium levels decrease, excitability of nerve and muscle cells increases significantly [30]. Given the abundance

of calcium in the body, hypocalcemia always means failure in the regulatory mechanisms and can have several causes such as rhabdomyolysis, cardiac arrhythmias, and incessant muscle contractions [35, 36]. The patient's hypocalcemia detected on postoperative day 1 could be directly related to the renal failure and with increased muscle cell excitability presented.

Sodium is a cation found in high concentration in extracellular fluids [30, 37]. Hyponatremia is always associated with plasma hyperosmolarity and is usually caused by a water deficit (low intake or abnormal losses) or excessive sodium intake [35, 36]. The patient's hyponatremia observed from postoperative day 2 may be related to renal failure, elevated temperature and hyperventilation.

Potassium is the main intracellular cation and it is critical in many physiological functions, such as in the regulation of neuromuscular excitability and muscle contraction [35, 38]. Acid-base balance can affect the balance between cellular and extracellular potassium concentration. Metabolic acidosis, hyperglycemia, hyperosmolarity, cell lysis, rhabdomyolysis, and renal failure increase the plasma potassium concentration [36, 38, 39]. Hyperkalemia was noted in our patient on the afternoon of postoperative day 1. Although the literature describes case reports with contradictory serum potassium concentration, reviews of MH specify that hyperkalemia is indicative of MH crisis triggering [1, 3, 7, 8, 12, 17]. According to Mahmood (2018) [40], hyperkalemia can induce fatal cardiac dysrhythmias. The patient's hyperkalemia contributed to the pertinent tachycardia observed from the postoperative period until his death.

Urea is the main nitrogen metabolite derived from the breakdown of proteins by the body, 90% of which is excreted by the kidneys. Urea is freely filtered by the glomerulus and 40-70% returns to the plasma through a passive diffusion process, dependent on the urinary flow [41]. Creatinine is a residual product of creatine. The transformation of creatine into creatinine takes place in muscle tissue, in which 1-2% of free creatine is spontaneously and irreversibly converted to creatinine every day. The amount of creatinine produced is dependent on muscle mass. Creatinine is freely filtered in the glomerulus, too. Unlike urea, 7-10% of creatinine is actively secreted in the urine [42, 43]. However, decreased renal function causes increased concentrations of urea and serum creatinine [44]. Lab test results showed a progressive increase in serum levels of urea and creatinine in our patient during the postoperative period, indicating the inability of the kidneys to clear these metabolites and, consequently, the decrease in renal function.

Although our patient's serum myoglobin was not evaluated, the darkening of urine was described in medical reports during the postoperative period. Dark tea or cola-colored urine is caused by an excessive amount of myoglobin in the urine [31, 33]. In addition, a rhabdomyolysis characterized by high levels of CPK [29, 31] resulted in myoglobinuria [29, 45] observed during the patient's urinalysis.

The leukocytosis observed in the blood test and the presence of leukocytes in the urine analysis are indicative of an infection. The presence of leukocytes in urine reinforced the suspicion of acute renal injury due to myoglobinuria [46]. As a result of rhabdomyolysis (generalized inflammatory process),

there was an increase in circulating leukocytes. Kidney damage caused leukocyte migration to combat this inflammatory response. In addition, the intestinal bacterial proliferation significantly increased due to the high and persistent temperature. This bacterial growth caused distension of the intestine and the intra-intestinal pressure became markedly high and triggered a phenomenon called bacterial translocation. However, a large amount of bacteria was pushed into blood circulation and triggered a defensive rise in leukocytosis.

AST enzyme is present inside several tissues of the body; the highest concentrations are in the heart and kidneys, but the enzyme is also produced in the liver and skeletal muscles. ALT is found almost exclusively in liver cells and is responsible for the metabolism of some proteins such as L-aspartate, alpha-ketoglutarate, and alanine. Quantification of AST and ALT serum levels is performed to evaluate potential liver damage. High AST level indicates trauma or muscle damage and is a quite common finding in rhabdomyolysis. The significant increase in serum AST and ALT concentrations observed in the postoperative exams of our patient may be related to skeletal muscle injuries due to exhaustive muscle contraction.

The patient's hyperglycemia, hypernatremia, hyperkalemia, and metabolic acidosis contributed to the blood pH reduction recorded by arterial-blood gas analysis.

Respiratory acidosis is characterized by an elevation of PaCO_2 , with or without compensatory increase in bicarbonate ions (HCO_3^-), plus pH acidification [47]. The causes are associated with decreased respiratory rate, inspired volume (hypoventilation) and blood oxygen saturation due to muscle diseases, respiratory or neurological conditions [37].

Specific situations such as those that occur during the MH crisis cause an increase in temperature, and blood pH acidification with a decrease in the affinity of hemoglobin for oxygen. Although there is an increase in both PaO_2 and oxygen supply as a result of mechanical ventilation with pure oxygen, the affinity of oxygen for hemoglobin is reduced. The increase in carbon dioxide production due to continuous muscle contraction causes an increase in carbon dioxide concentration and, consequently, the PaCO_2 . In addition, the increase in carbon dioxide concentration increases the association between carbon dioxide and water, forming carbonic acid (H_2CO_3). Carbonic acid, by the action of carbonic anhydrase, dissociates into bicarbonate ions and hydrogen ions, further decreasing blood pH [30, 37].

Throughout the postoperative period, even with constant oxygen supply, the patient's blood O_2 saturation was low (Table 2). The high temperature, acidification of blood pH, and the increased PaCO_2 contributed to decrease the affinity of hemoglobin for oxygen. During the MH crisis, although the decrease in hemoglobin affinity for oxygen caused the incorporation of hydrogen ions in hemoglobin, the blood pH acidification occurred both by metabolic acidosis and by increasing the carbon dioxide concentration.

The patient's arterial-blood gas analysis showed blood pH acidification and increase in PaO_2 and in PaCO_2 . The patient's bicarbonate ion concentration was in normal range, but the base excess concentration indicated a deficit of bases dissolved in his blood during the postoperative period.

The increase in the occurrence of dyspnea in obese pa-

tients is evident and its intensity is directly proportional to the body mass index [48]. The patient's medical history included obesity grade III and severe obstructive sleep apnea. During the postoperative period, the patient remained lying down, in high decubitus, with a distended abdomen, making breathing difficult. The patient had low blood O_2 saturation even under mechanical ventilation with hyperventilation of pure oxygen. However, chest X-rays and ultrasound ruled out a possible pleural effusion or pneumothorax due to mechanical ventilation. In addition, atelectasis due to intubation, one of the most common respiratory complications after surgery, was discarded.

Zutt et al (2014) [31] suggest that complementary cardiac assessments should be performed when the patient has electrolyte disturbances during the MH crisis. On postoperative days 2 and 3, chest X-rays were carried out and indicated globose cardiac area and cardiomegaly, respectively. On the postoperative day 1, an echocardiogram was performed to evaluate anatomical and functional aspects of our patient's heart. The echocardiogram indicated mild symmetrical hypertrophy as an adaptive response of the heart to arterial hypertension presented by the patient during the postoperative period, as described in Table 2.

As soon as the MH crisis is diagnosed, the patient's exposure to the substances that triggered the crisis must be stopped and the administration of dantrolene sodium must be initiated immediately [5, 8, 11, 17, 22]. Dantrolene sodium is the only clinically available drug for the specific MH treatment [23]. Several case reports have different descriptions with or without the dantrolene addition. In some cases, dantrolene was administered immediately after the MH crisis triggering, both during the intraoperative [4, 13, 40, 49, 50] and postoperative [32, 51, 52] periods and all patients were discharged from the hospital in stable conditions. Late addition of dantrolene is also reported in intra- and postoperative MH cases with different results, and some were fatal, while others had no additional complications [2, 45, 53, 54]. On the other hand, there were related intra- [28, 55] and postoperative [54] MH cases in which dantrolene was not administered due to non-availability of the drug in the hospital. Iqbal et al (2017) [28] reported the clinical signs and laboratory parameters altered by the MH crisis were reversed with internal (ice cold saline intravenously) and external (ice packs and cold towels over the body) cooling, and the patient had full recovery before being discharged. Pan et al (2016) [54], in the case report III, described that the inhalation anesthetic was not used in the operation, but the body temperature rose slowly during the postoperative period and, after 2 days, the patient was in critical condition. Meanwhile, Lazraq et al (2019) [55] and Pan et al (2016) (case report I) [54] reported that patients had persistent high fever and died despite all the resuscitation procedures administered. Unfortunately, in our case, dantrolene could not be used because it was not available at the hospital or in other hospitals in nearby cities and the patient died. In Sao Paulo, the Law 10.781, published on March 9, 2001, provides for the state policy for the prevention, diagnosis and treatment of MH and the second Article describes that all public or private health services in the state of Sao Paulo, Brazil must have appropriate medications to fight the disease, especially dantrolene sodium.

Larach et al (1994) [56] proposed a clinical grading scale

(CGS) to predict MH susceptibility and help to confirm the MH diagnosis after halogenated volatile inhalational anesthetic administration. Based on the Larach scale, our patient had the almost certain probability to developed MH. He was rated grade 6, the highest grade with a score higher than 50.

In 1998, Richthofen et al [57] compared the results obtained with the use of the CGS with the results obtained in carrying out the *in vitro* contracture test (IVCT) and concluded that the CGS cannot replace IVCT. However, the indication of prediction for MH susceptibility through CGS can guide the patient and/or their family members in IVCT carried out to confirm the MH diagnosis/susceptibility.

The CHCT was carried out on the patient's brother to confirm the MH diagnosis. G.H.M.S., 21-year-old, born in Jau, SP, Brazil and never underwent halogenated anesthesia, was performed the CHCT at the Malignant Hyperthermia Diagnostic Center of the Federal University of Rio de Janeiro, in August 2011. The CHCT indicated a contracture of 1.27 g in a muscle strip exposed to caffeine at 2 mM and the results were considered positive indicating MH susceptibility [24]. Almeida da Silva et al (2019) [1] evaluated the profile of MH susceptibility reports confirmed with muscle contracture test in Brazil. In the period 1997 - 2010, approximately 80% of the individuals submitted to CHCT presented positive results for MH susceptibility [1].

The patient's sister underwent the same surgical procedure, with the same doctor and in the same hospital 2 years earlier and did not present any complications during the intraoperative and postoperative periods. In addition, she had undergone three other surgical procedures with halogenated anesthesia without complications. The literature findings described that the MH crisis can occur during the first or even after the exposure to a triggering agent due to incomplete penetrance and variable expression of the genes encoding the MH disease [8, 19, 20, 58, 59].

The delayed diagnosis of MH crisis reported here could be associated with the onset of clinical symptoms and changes in laboratory parameters observed in the late postoperative period, and with the low clinical incidence of MH. For instance, L.R.M.S. was the first patient diagnosed with MH at Hospital Santa Casa de Jahu (and in Jau city, SP). However, this MH episode and the patient's brother CHCT results should be reported on pre-anesthetic evaluations of the patient's family members before undergoing procedures under general anesthesia to prevent MH crisis.

Conclusions

The detailed report of the development of the MH episode triggered by halogenated anesthetic during bariatric surgery allowed us to describe the severity and lethality of this hypermetabolic syndrome. The dissemination and accessibility of data on MH are of high relevance for the medical, academic and scientific communities. The need to understand in detail the clinical and the pathophysiological, biochemical and biophysical mechanisms associated with MH is of fundamental practical importance in preventing and reversing an MH crisis.

Knowledge of the carrier's situation allows patients and

family members to alert the medical team if there is a need to perform any surgical procedure, thus avoiding the use of halogenated anesthetics. In addition, it is essential that dantrolene sodium be included in emergency medications that are mandatory in all operating rooms. However, knowledge of the symptoms, an early diagnosis and an adequate treatment can prevent the death of patients in MH crisis.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Itamar Trindade Neves Epifanio and Prof. Dr. Victor L. Davidson for their valuable scientific contribution. The authors also thank Francis Joseph Alves, Anthony Pastore and Anthony Scribner for their help in correcting the work.

Financial Disclosure

None to declare.

Conflict of Interest

None to declare.

Informed Consent

Informed consent was obtained from the patient's family as well as authorization to use and disclose protected health information.

Author Contributions

The authors PEAQ, GHMS and DPMS fit all four criteria recommended by the ICMJE: 1) Contributed substantially to the conception or design of the work as well as to the acquisition, organization, analysis, and interpretation of all data set out in this manuscript; 2) Contributed to the preparation of the work and reviewed it critically and in detail; 3) Approved the final version of the manuscript to be published; and 4) Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Data Availability

All data described in this case report are available and can be requested from the corresponding author.

References

1. Almeida da Silva HC, Ferreira G, Rodrigues G, Santos

- JMD, Andrade PV, Hortense A, Vaz Perez M, et al. [Profile of malignant hyperthermia susceptibility reports confirmed with muscular contracture test in Brazil]. *Rev Bras Anesthesiol.* 2019;69(2):152-159.
2. Enid L, Fino E, Antonia L, Villanueva C, Mayela L, Gonzales T. Diagnostico de Hipertermia maligna: reporte de caso Diagnostico of Malignant hyperthermia: a case presentation. *Rev Med Hondur.* 2019;87.
 3. Ali SZ, Taguchi A, Rosenberg H. Malignant hyperthermia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2003;17(4):519-533.
 4. Fernandes CR, Azevedo DM, Gomes JM, Goncalves BP, Coelho GR, Vasconcelos JB, Garcia JH. Malignant hyperthermia in a liver transplant patient: a case report. *Transplant Proc.* 2007;39(10):3530-3532.
 5. Kim KSM, Kriss RS, Tautz TJ. Malignant Hyperthermia: A Clinical Review. *Adv Anesth.* 2019;37:35-51.
 6. Ellinas H, Albrecht MA. Malignant Hyperthermia Update. *Anesthesiol Clin.* 2020;38(1):165-181.
 7. Amare M, Wilson M. Malignant hyperthermia. *Anaesth Intensive Care Med.* 2020:1-5.
 8. Correia AC, Silva PC, da Silva BA. Malignant hyperthermia: clinical and molecular aspects. *Rev Bras Anesthesiol.* 2012;62(6):820-837.
 9. Costa WP da, Menezes TM, Bomfa GGN, Souza R de L e, Menezes PJM, Motta LR. Malignant hyperthermia: reviewing important aspects. *Rev Medica Minas Gerais.* 2017;27(Supl 2):67-73.
 10. Riaz S, Kraeva N, Hopkins PM. Malignant Hyperthermia in the Post-Genomics Era: New Perspectives on an Old Concept. *Anesthesiology.* 2018;128(1):168-180.
 11. Louis CF, Balog EM, Fruen BR. Malignant hyperthermia: an inherited disorder of skeletal muscle Ca²⁺ regulation. *BioSci Rep.* 2001;21(2):155-168.
 12. Hopkins PM, Ruffert H, Snoeck MM, Girard T, Glahn KP, Ellis FR, Muller CR, et al. European Malignant Hyperthermia Group guidelines for investigation of malignant hyperthermia susceptibility. *Br J Anaesth.* 2015;115(4):531-539.
 13. Gibbs IC, Fadahunsi O, Reid N, Bonnick AM. Malignant Hyperthermia: A Case Report in a Trauma Patient. *J Oral Maxillofac Surg.* 2019;77(1):54-58.
 14. Smith JL, Tranovich MA, Ebraheim NA. A comprehensive review of malignant hyperthermia: Preventing further fatalities in orthopedic surgery. *J Orthop.* 2018;15(2):578-580.
 15. Lorenzon NM, Beam KG. Calcium channelopathies. *Kidney Int.* 2000;57(3):794-802.
 16. Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. *J Clin Invest.* 2005;115(8):2000-2009.
 17. Long M, Ross J. Malignant hyperthermia. *J Radiol Nurs [Internet].* 2017;36(3):152-157.
 18. Sene ES de O, Viana TG, Catunda KA, Bittar E. Estrategia educativa com profissionais de enfermagem sobre hipertermia maligna em um centro cirurgico cardiovascular. *Rev SOBECC.* 2020;25(1):42-49.
 19. Larach MG, Gronert GA, Allen GC, Brandon BW, Lehman EB. Clinical presentation, treatment, and complications of malignant hyperthermia in North America from 1987 to 2006. *Anesth Analg.* 2010;110(2):498-507.
 20. Gupta PK, Hopkins PM. Diagnosis and management of malignant hyperthermia. *BJA Educ [Internet].* 2017;17(7):249-254.
 21. Glahn KP, Ellis FR, Halsall PJ, Muller CR, Snoeck MM, Urwyler A, Wappler F, et al. Recognizing and managing a malignant hyperthermia crisis: guidelines from the European Malignant Hyperthermia Group. *Br J Anaesth.* 2010;105(4):417-420.
 22. Harrison GG. The prophylaxis of malignant hyperthermia by oral dantrolene sodium in swine. *Br J Anaesth.* 1977;49(4):315-317.
 23. Krause T, Gerbershagen MU, Fiege M, Weissborn R, Wappler F. Dantrolene - a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia.* 2004;59(4):364-373.
 24. Rosenberg H, Antognini JF, Muldoon S. Testing for malignant hyperthermia. *Anesthesiology.* 2002;96(1):232-237.
 25. Hernandez JF, Secrest JA, Hill L, McClarty SJ. Scientific advances in the genetic understanding and diagnosis of malignant hyperthermia. *J Perianesth Nurs.* 2009;24(1):19-31; quiz 32-14.
 26. Ellis FR, Harriman DG, Keaney NP, Kyei-Mensah K, Tyrrell JH. Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anaesth.* 1971;43(7):721-722.
 27. Litman RS, Flood CD, Kaplan RF, Kim YL, Tobin JR. Postoperative malignant hyperthermia: an analysis of cases from the North American Malignant Hyperthermia Registry. *Anesthesiology.* 2008;109(5):825-829.
 28. Iqbal A, Badoo S, Nageeb R. A case report of suspected malignant hyperthermia where patient survived the episode. *Saudi J Anaesth.* 2017;11(2):232-235.
 29. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med.* 2007;18(2):90-100.
 30. Guyton A, Hall J. *Fisiologia medica [Internet].* Internal medicine (Tokyo, Japan). 2006;37:1151.
 31. Zutt R, van der Kooij AJ, Linthorst GE, Wanders RJ, de Visser M. Rhabdomyolysis: review of the literature. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(8):651-659.
 32. Syed S, Ansari M, Nivarthi B, Patel N, Farooq K, Kaur J, et al. A rare presentation of malignant hyperthermia in a patient with poliomyelitis. *J Med Cases.* 2018;9(7):236-237.
 33. Cabral BMI, Edding SN, Portocarrero JP, Lerma EV. Rhabdomyolysis. *Dis Mon.* 2020;66(8):101015.
 34. Saks VA, Rosenshtraukh LV, Smirnov VN, Chazov EI. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can J Physiol Pharmacol.* 1978;56(5):691-706.
 35. Evora PRB, Reis CL dos, Ferez MA, Conte DA, Garcia LV. Distúrbios Do Equilíbrio Hidroeletrólítico E Do Equilíbrio Acidobásico - Uma Revisão Prática. *Med (Ribeirão Preto Online).* 1999;32(4):451.
 36. Barbosa AP, Sztajnbock J. Distúrbios hidroeletrólíticos Fluid and electrolyte disorders. *J Pediatr (Rio J).*

- 1999;75:223-233.
37. Silverthorn D. Fisiologia humana: uma abordagem integrativa [Internet]. Exercise and Sport Sciences Reviews. 2017;1.
 38. Lehnhardt A, Kemper MJ. Pathogenesis, diagnosis and management of hyperkalemia. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(3):377-384.
 39. Dutra V de F, Tallo FS, Rodrigues FT, Vendrame LS, Lopes RD, Lopes AC. Desequilíbrios hidroeletrólitos na sala de emergência. *Rev Bras Clin Med São Paulo*. 2012;10(5):410-419.
 40. Mahmood S. A case report of malignant hyperthermia in a young male veteran diagnosed with an early rise of ETCO₂ during shoulder arthroscopy. *Juniper Online J Case Stud*. 2018;5(5):1-3.
 41. Dusse LMS, Rios DRA, Sousa LPN, Moraes RMM e S, Domingueti CP, Gomes KB. Biomarkers of renal function: what is currently available? *Rev Bras Analises Clinicas*. 2017;49(1):41-51.
 42. Kirsztajn BM, Bastos MG, et al. 2004;74-87.
 43. Sodre FL, Costa JCB, Lima JCC. Avaliação da função e da lesão renal: Um desafio laboratorial. *J Bras Patol e Med Lab*. 2007;43(5):329-337.
 44. Peres LA, Cunha Junior AD, Schafer AJ, Silva AL, Gaspar AD, Scarpari DF, Alves JB, et al. Biomarkers of acute kidney injury. *J Bras Nefrol*. 2013;35(3):229-236.
 45. Forrest KM, Foulds N, Millar JS, Sutherland PD, Pappachan VJ, Holden S, Mein R, et al. RYR1-related malignant hyperthermia with marked cerebellar involvement - a paradigm of heat-induced CNS injury? *Neuromuscul Disord*. 2015;25(2):138-140.
 46. Petejova N, Martinek A. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis and renal replacement therapy: a critical review. *Crit Care*. 2014;18(3):224.
 47. Carlotti APDCP. A clinical approach to acid-base disorders. *Med*. 2012;45(2):244-262.
 48. Stirbulov R. Respiratory repercussions of obesity. *J Bras Pneumol*. 2007;33(1):vii-viii.
 49. Vasconcelos JVRM, Suguita FH, Cardoso AR BA. Hipertermia maligna em paciente submetida a correção de gigantomastia: relato de caso malignant hyperthermia in patient submitted to gigantomastia correction: case report. *Rev Soc Bras Cir Plast*. 2007;22(2):126-130.
 50. Cornelius BW, Dib SO, Dowdy RA, Horton CK, Frimenko K, Mansour S, Sharkh FA, et al. Malignant hyperthermia: a case study in the dental ambulatory surgery setting. *Anesth Prog*. 2019;66(4):202-210.
 51. Osman BM, Saba IC, Watson WA. A case report of suspected malignant hyperthermia: how will the diagnosis affect a patient's insurability? *Case Rep Anesthesiol*. 2018;2018:1-5.
 52. Plurad D, Blaschke G, Jones S, Pfeiffer J. A case of malignant hyperthermia in a child encountered during a humanitarian assistance mission to the Philippines. *Mil Med*. 2008;173(8):805-808.
 53. Lee YS, Kim WY, Lee SH, Baek SM, Ok SJ, Kim JH, Park YC. A case of malignant hyperthermia during anesthesia induction with sevoflurane -A case report. *Korean J Anesthesiol*. 2010;59(Suppl):S6-8.
 54. Pan T, Ji W, Nie M, Li Y. Clinical treatment of malignant hyperthermia in three cases. *Exp Ther Med*. 2016;12(5):2881-2884.
 55. Lazraq M, Dafir A, Bensaid A, Miloudi Y, Alharrar N. Malignant hyperthermia: a case report. *J Emergency, Crit Care Diagnostic Manag Open*. 2019;2(1):1-2.
 56. Larach MG, Localio AR, Allen GC, Denborough MA, Ellis FR, Gronert GA, Kaplan RF, et al. A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology*. 1994;80(4):771-779.
 57. von Richthofen V, Wappler F, Scholz J, Fiege M, Schulte am Esch J. [Evaluation of malignant hyperthermia episodes with the Clinical Grading Scale]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 1998;33(4):244-249.
 58. Strazis KP, Fox AW. Malignant hyperthermia: a review of published cases. *Anesth Analg*. 1993;77(2):297-304.
 59. Rosenberg H, Davis M, James D, Pollock N, Stowell K. Malignant hyperthermia. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2(1):1-14.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação comparativa entre os efeitos coagulante e anticoagulante de peçonhas brutas e de proteínas isoladas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus e de fármacos anticoagulantes comerciais

Pesquisador: PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30822720.3.0000.8069

Instituição Proponente: UFPB - Centro de Ciências Médicas/CCM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.003.352

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, que será desenvolvida nos laboratórios Cristalografia de Proteínas – CPr-Lab e Multiusuário do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Molecular da UFPB. As amostras serão coletadas no Laboratório de Cristalografia de Proteínas da UFPB na cidade de João Pessoa – PB. A população é formada por estudantes voluntários dos diversos cursos de graduação e pós-graduação da Universidade Federal da Paraíba, devendo compor a amostra um quantitativo de aproximadamente 60 doadores que atenderem os critérios de inclusão e exclusão propostos pelos pesquisadores.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os efeitos coagulante e anticoagulante de peçonhas brutas e de proteínas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus.

Objetivo Secundário:

Avaliar atividade coagulante e/ou anticoagulante de proteínas isoladas de peçonhas brutas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus;

Avaliar o efeito anticoagulante de fármacos comerciais de diferentes mecanismos de ação e

Endereço: Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7308 **E-mail:** comitedeetica@ccm.ufpb.br



UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA / CCM



Continuação do Parecer: 4.003.352

atuação na hemostasia secundária; Comparar o potencial anticoagulante de fármacos comerciais com diferentes mecanismos de ação na hemostasia secundária com a atividade anticoagulante de proteínas isoladas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Essa pesquisa pode oferecer risco mínimo previsível ao voluntário, visto que será realizada punção venosa periférica, dessa forma o paciente pode sentir um leve desconforto e dor na coleta, risco esse que será minimizado uma vez que o procedimento vai ser realizado por profissional biomédico ou outro profissional habilitado para tal atividade. Além disso, o procedimento de coleta obedecerá todas as normas de biossegurança em vigência.

Benefícios:

Esta pesquisa pode trazer benefícios como a identificação de um potencial anticoagulante novo originário a partir de proteínas ofídicas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, além de conhecer, in vitro, a alteração das características hemostáticas promovidas pelas proteínas ofídicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Com esta pesquisa espera-se conhecer as alterações hemostáticas promovidas por peçonhas ofídicas, entendendo de que forma essas proteínas interagem com os fatores de coagulação da via extrínseca, intrínseca e via comum, além de comparar esses efeitos com os efeitos de anticoagulantes comerciais com mecanismo de ação definido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação foram apresentados, porém não se encontram assinados, o que é aceitável devido às orientações sobre a pandemia do coronavírus. O TCLE encontra-se com endereço de outro CEP.

Recomendações:

Solicitamos ao (à) pesquisador(a) responsável que entregue, assim que possível, presencialmente, ao CEP/CCM/UFPB os seguintes documentos:

1. Folha de rosto assinada
2. Carta de anuência assinada

Endereço: Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7308 **E-mail:** comitedeetica@ccm.ufpb.br



UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA / CCM



Continuação do Parecer: 4.003.352

A entrega presencial justifica-se, pois não é possível ao pesquisador anexar tais documentos via Plataforma Brasil, após a avaliação do projeto.

-Reformular endereço em TCLE, fazendo constar endereço do CEP CCM/UFPB.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Parecer favorável, condicionado às assinaturas dos documentos obrigatórios, incluindo folha de rosto e carta de anuência, bem como correção do endereço do CEP (endereço do CEP/CCM/UFPB) no TCLE apresentado.

Os documentos assinados devem ser entregues presencialmente no CEP/CCM, assim que possível.

Considerações Finais a critério do CEP:

Seguindo as recomendações da CONEP em carta publicada em 01 de abril de 2020: ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEPs DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 e II INFORME AOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA PROTOCOLOS DE PESQUISA RELATIVOS À COVID-19, publicado em 14 de abril de 2020, a Câmara Técnica considerou o protocolo de pesquisa APROVADO, ficando na responsabilidade do pesquisador a entrega ao CEP dos documentos que não foram assinados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1539121.pdf	13/04/2020 15:09:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA_PARA_POSTAR.doc	13/04/2020 15:08:40	PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_DE_ANUENCIA.pdf	13/04/2020 15:07:03	PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	13/04/2020 15:06:32	PIERRI EMANOEL DE ABREU	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_PESQUISADOR_PARTICIPANTE.pdf	13/04/2020 15:06:00	PIERRI EMANOEL DE ABREU	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	13/04/2020 15:04:55	PIERRI EMANOEL DE ABREU	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	13/04/2020	PIERRI EMANOEL	Aceito

Endereço: Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7308

E-mail: comitedeetica@ccm.ufpb.br



Continuação do Parecer: 4.003.352

Orçamento	ORCAMENTO.docx	15:04:32	ABREU OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/04/2020 15:03:24	PIERRI EMANOEL DE ABREU OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	13/04/2020 14:38:25	PIERRI EMANOEL DE ABREU	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 02 de Maio de 2020

Assinado por:
Cristina Wide Pissetti
(Coordenador(a))

Endereço: Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1
Bairro: CASTELO BRANCO **CEP:** 58.051-900
UF: PB **Município:** JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7308 **E-mail:** comitedeetica@ccm.ufpb.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Pierri Emanuel de Abreu Oliveira, eu sou pós-graduando Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e o Sr. (a) está sendo convidado (a), como voluntário (a), a participar da pesquisa intitulada sobre **“Avaliação comparativa entre os efeitos coagulante e anticoagulante de peçonhas brutas e de proteínas isoladas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* de fármacos anticoagulantes comerciais”**.

JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E PROCEDIMENTOS: Diversos mecanismos farmacológicos como a cascata de coagulação, a fibrinólise, a neurotransmissão na junção neuromuscular, o processo inflamatório e o sistema complemento têm sido elucidados graças a estudos envolvendo peçonhas ofídicas. Por isso, estudos dos efeitos da peçonha bruta e do mecanismo de ação de suas proteínas isoladas permitem compreender a fisiopatologia do empeçonhamento, por conseguinte o desfecho clínico, aumentando a possibilidade de desenvolver terapias personalizadas e reduzir as sequelas decorrentes do ofidismo.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Essa pesquisa pode oferecer risco mínimo previsível ao voluntário, visto que será realizada punção venosa periférica, dessa forma o paciente pode sentir um leve desconforto e dor na coleta, risco esse que será minimizado uma vez que o procedimento vai ser realizado por profissional biomédico ou outro profissional habilitado para tal atividade. Além disso, o procedimento de coleta obedecerá todas as normas de biossegurança. Esta pesquisa pode trazer benefícios como a identificação de um potencial anticoagulante novo originário a partir de proteínas ofídicas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, além de conhecer, *in vitro*, a alteração das características hemostáticas promovidas pelas proteínas ofídicas.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: Caso os doadores apresentem algum tipo de desconforto serão encaminhados para a Unidade de Pronto Atendimento mais próxima ao local de coleta.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Os voluntários serão esclarecidos sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar, sendo livre para recusar-se a participar da pesquisa, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, procedimento, da pesquisa, permanecerão confidenciais podendo ser fornecidos apenas para os voluntários. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será citado(a) nominalmente ou por qualquer outro meio que o identifique individualmente ou em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento assinada pela gestante ficará sob a responsabilidade do pesquisador responsável e outra será fornecida a gestante.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para os voluntários e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional. Não é previsível dano

decorrente dessa pesquisa as gestantes e caso haja algum, será garantido indenização por parte do proponente.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO PARTICIPANTE: Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci todas minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações, poderei desistir de participar da pesquisa se assim o desejar. Os pesquisadores Pierri Emanuel de Abreu Oliveira certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, no que se refere a minha identificação individualizada, e deverão ser tornados públicos através de algum meio. Elas se comprometem seguir os padrões éticos definidos na Resolução CNS 466/12. Também sei que em caso de dúvidas poderei contatar com o pós-graduando Pierri Emanuel de Abreu Oliveira, residente na cidade de João Pessoa- PB, telefone: 83-99656-4836 e e-mail: pierre.eao@gmail.com ou a professor orientador: Daniela Priscila Marchi Salvador, telefone 83 99916-5909 e através do e-mail: **danimarchi@dbm.ufpb.br**. Além disso, fui informado que em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo poderei consultar o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, situado Centro de Ciências da Saúde - 1º andar, Campus I - Cidade Universitária CEP: 58.051-900 - João Pessoa-PB. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura da Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura da Participante
------	----------------------------