

Consórcio Setentrional de Educação a Distância
Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás
Curso de Licenciatura em Biologia a Distância

**Estudo dos Potenciais Terapêuticos do Veneno da
Serpente *Bothrops Jararaca***

MARCOS AURELIO FORMIGA CABRAL

Brasília
2011

MARCOS AURELIO FORMIGA CABRAL

**Estudo dos Potenciais Terapêuticos do Veneno da
Serpente *Bothrops Jararaca***

Monografia apresentada, como exigência parcial para a obtenção do grau pelo Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília no curso de Licenciatura em Biologia a distância.

**Brasília
2011**

MARCOS AURELIO FORMIGA CABRAL

Estudo dos Potenciais Terapêuticos do Veneno da Serpente
Bothrops Jararaca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Biologia do Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília.

Aprovado em junho de 2011.

Profa. Ms. Lanuse Caixeta Zanotta
Universidade de Brasília
Orientadora

Prof. Ms. Gil Amaro
Universidade de Brasília
Avaliador I

Prof. Esp. Lívio Dantas Carneiro
Universidade de Brasília
Avaliador II

Brasília
2011

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Sebastião e Marli, pelo amor e dedicação, por tudo que me ensinaram, e pelos estímulos oferecidos durante minha vida.

À minha esposa Fabiane, pelo amor e companheirismo, pelo apoio constante e incentivo, sei que toda conquista minha é dela também.

Ao meu filho Marcus Vinícius, pelo seu amor e amizade e por ter dividido parte do meu tempo reservado a ele para a realização desse trabalho.

Aos meus irmãos Claudiney, Michele, Edileuza e sobrinhos, pela amizade, amor e carinho que os fazem tão especiais.

À minha orientadora Lanuse Zanotta, pelo suporte oferecido, e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo como docente.

A todos os meus amigos do Curso de Licenciatura em Biologia a distância, pelo companheirismo e ajuda mútua durante essa difícil jornada.

Ao Professor Leopoldo, e demais tutores e professores, que durante o curso nos ajudaram a vencer as dificuldades encontradas.

RESUMO

CABRAL, Marcos Aurelio Formiga. **Estudo dos Potenciais Terapêuticos do Veneno da Serpente *Bothrops jararaca***. 2011. 26f. Trabalho de Conclusão de Curso Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

Responsável por cerca de 90% dos casos de acidentes ofídicos em humanos no Brasil, a peçonha da serpente *Bothrops jararaca* apresenta uma complexa mistura de enzimas, proteínas e peptídeos que possuem, entre outros, efeitos proteolíticos, procoagulantes e hemorrágicos, sendo os efeitos clínicos mais observados: os distúrbios homeostáticos e os sinais locais como edemas, hemorragias e necroses. A enzima conversora da angiotensina (ECA) passou a ser alvo da indústria farmacêutica, após sua caracterização em 1956, com o objetivo de desenvolver, em princípio, drogas anti-hipertensivas e, mais tarde, explorar outros potenciais terapêuticos das moléculas isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Esse trabalho consiste em um estudo bibliográfico das principais características físicas das serpentes desse gênero, dos acidentes ofídicos e seus efeitos clínicos, da descrição dos principais componentes da peçonha, como as Fosfolipases A₂ (FLA₂), os Peptídeos Potenciadores da Bradicinina (BPPs) e a metaloprotease conhecida por Jararagina. Tem como objetivo principal buscar na literatura estudos que evidenciaram os efeitos terapêuticos de substâncias presentes no veneno botrópico, entre eles a eficácia da jararagina quanto à inibição da progressão de células de melanoma, os efeitos observados do veneno botrópico sobre as formas promastigostas de *Leishmania spp* e o desenvolvimento do fármaco anti-hipertensivo a partir do isolamento da ECA, o captopril.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*, hipertensão arterial, peptídeos potenciadores da bradicinina, jararagina, fosfolipase A₂.

SIGLAS E ABREVIATURAS

A-I – Angiotensina I

A-II – Angiotensina II

BJ-FLA₂ – Fator inibidor de ação plaquetária

Bk – Bradicinina

BPP – Peptídeo Potenciador da Bradicinina (*Bradykinin Potentiating Peptides*)

Bpp-9a – Peptídeo de nome comercial Teprotide

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina

cFLA₂ - Fosfolipases intracelulares

FAP – Fator Ativador de Plaquetas

FLA₂ – Fosfolipase A₂

sECA – Enzima conversora da Angiotensina somática

sFLA₂ – Fosfolipases extracelulares

NO – Óxido Nítrico

SHR – Rato espontaneamente hipertenso

SNC – Sistema Nervoso Central

vWF – Fator de von Willebrand (*von Willebrand Factor*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Serpente <i>Bothrops jararaca</i>	10
Figura 2 – Detalhe do olho e fosseta loreal da <i>Bothrops jararaca</i>	11
Figura 3 – Aparelho inoculador de veneno da <i>Bothrops jararaca</i>	11
Figura 4 – Acidentes provocados por serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	12
Figura 5 – Esquema representativo do papel metabólico da ECA no sistema renina-angiotensina e calicreína-cininas.....	17
Figura 6 - Formas promastigota e amastigotas da <i>Leishmania</i>	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. DESENVOLVIMENTO.....	10
2.1 <i>Bothrops jararaca</i>.....	10
2.2 Acidentes ofídicos causados por serpente do gênero <i>Bothrops</i>.....	11
2.3 O veneno botrópico.....	13
2.4 Contexto histórico da utilização do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> com fins terapêuticos.....	14
2.5 Principais moléculas encontradas na peçonha de <i>Bothrops jararaca</i>.....	15
2.5. 1 Fosfolipase A₂	15
2.5. 2 Peptídeos Potencializadores da Bradicinina (BPPs)	16
2.5. 3. Jararagina.....	18
2.6. Efeitos terapêuticos do veneno botrópico.....	19
2.6.1. Hipertensão arterial	19
2.6. 2 Melanoma	20
2.6. 3. Leishmaniose	21
3. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

Acidentes ocasionados por serpentes venenosas (ofidismo) foram incluídos pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada. No Brasil, 90% dos acidentes com humanos são atribuídos às serpentes da espécie *Bothrops jararaca* (BRASIL, 1999). A maior parte dos casos desses acidentes ocorre nos meses de janeiro, fevereiro e março, período de reprodução das serpentes e época em que apresentam maior atividade em busca de alimento. (SILVA JÚNIOR, 2007).

O veneno da *Bothrops*, assim como de outras serpentes, é constituído por uma complexa mistura de enzimas, proteínas e peptídeos. No entanto as enzimas proteolíticas são encontradas em maior concentração no veneno botrópico (SILVA JÚNIOR, 2007). Nos acidentes com essas serpentes as alterações clínicas mais importantes são as ações proteolíticas, procoagulante e hemorrágica, sendo que as principais manifestações clínicas observadas são os distúrbios homeostáticos e os sinais locais como os edemas, hemorragias e necroses. (CHACUR, 2000).

Atualmente, o único tratamento para esses casos consiste na administração do soro poliespecífico (BRASIL, 1999), que proporciona a recuperação do paciente evitando sua morte. Entretanto, devido às ações das enzimas proteolíticas, ocorre a destruição tecidual e conseqüentemente um quadro severo de ulceração dérmica local, podendo atingir o tecido subcutâneo ou, em situações mais graves, comprometer estruturas mais profundas como músculos, tendões e ossos. (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2007).

Diante de tão numerosos casos de acidentes provocados por esse tipo de serpente e de seus efeitos no organismo humano, diversos estudos foram desenvolvidos com o intuito de entender o mecanismo de ação do veneno, bem como seu potencial terapêutico.

Em 1956 Leonard T. Skeggs e colaboradores descreveram a enzima conversora da angiotensina (ECA), responsável pela formação de angiotensina II (causadora da hipertensão arterial). Dessa época em diante, essa enzima passou a ser alvo de indústrias farmacêuticas objetivando a obtenção de drogas anti-hipertensivas. Após nove anos da descoberta da ECA, o cientista brasileiro Sérgio Ferreira descreveu o fator potencializador da bradicinina (BPFs), presente no veneno da *Bothrops jararaca*, que culminou em 1975 na produção do primeiro fármaco via oral inibidor da ECA, o captopril, desenvolvido pelos cientistas David Cushman, Miguel Ondetti e colaboradores. (THE MEDICAL NEWS, 2011).

A partir do estudo que possibilitou o desenvolvimento do anti-hipertensivo captopril, outras pesquisas envolvendo peptídeos, enzimas e proteínas presentes no veneno da *Bothrops* foram realizadas, desvendando grande parte dos mecanismos de ação dessas substâncias e demonstrando seus potenciais terapêuticos.

Este trabalho tem como objetivo principal identificar na literatura os potenciais terapêuticos descritos para o veneno de serpentes do gênero *Bothrops* para o tratamento da hipertensão, do melanoma, bem como na observação dos efeitos do veneno botrópico sobre formas promastigotas de *Leishmania spp.*

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. *Bothrops jararaca*

A serpente *Bothrops jararaca*, popularmente conhecida como Jararaca ou Jararaca preguiçosa, possui comprimento médio de um metro e coloração que varia de tons pretos ao acastanhado. A cada ciclo reprodutivo nascem de 3 a 35 filhotes, com cerca de 20 cm de comprimento. Destaca-se por sua agilidade e capacidade de adaptação, o que determina sua ocorrência na maior parte do território brasileiro (Figura 1). (SILVA JÚNIOR, 2007).



Figura 1 – Serpente *Bothrops jararaca* (SILVA JÚNIOR, 2007)

As serpentes do gênero *Bothrops*, constituído por mais de 30 espécies, pertencem ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, classe *Reptilia*, ordem *Ophidia*, superfamília *Viperoidea*, família *Viperidae* e subfamília *Crotalinae*. Morfologicamente apresentam cabeça triangular coberta com pequenas escamas que se diferem das escamas quilhadas que recobrem o restante do corpo, possuem pupilas verticais que indicam uma melhor adaptação à visão noturna (SILVA JÚNIOR, 2007). Além disso, possui fosseta loreal, estrutura localizada entre os olhos e as narinas das serpentes que tem a função de termorrecepção, auxiliando na caça em ambientes escuros (Figura 2). (ALVES et al., 1989; BORGES, 1990; OLIVEIRA, 1999).



FIGURA 2 - Detalhe da cabeça da *Bothrops jararaca* escamas, pupilas verticais e fosseta loreal. (MARQUES, 2009)

A espécie de *Bothrops jararaca* ainda conta com um aparelho inoculador de veneno constituído por dentes localizados na região anterior da cavidade bucal. Eles ficam postados perpendicularmente ao palato quando a serpente se encontra com a boca fechada, projetando-se a frente no momento em que realiza o ataque. (Figura 3) (ALVES et al., 1989; BORGES, 1999; OLIVEIRA, 1999).



FIGURA 3 – Aparelho inoculador de veneno da *Bothrops jararaca*. (FILGUEIRAS, 2008)

2.2. Acidentes ofídicos causados por serpente do gênero *Bothrops*

Os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado por dor intensa e imediata na região da picada, o que pode ser explicado por alterações na transdução dos nociceptores modulada por mediadores inflamatórios. A substância responsável pelo início do processo de hiperalgesia é a bradicinina, que por sua vez estimula a

liberação de fator de ulceração dérmica tumoral, interleucinas, eicosanóides e aminas simpatomiméticas, sendo as duas últimas consideradas mediadores finais da hiperalgesia. (SILVA JÚNIOR, 2007).

Os edemas locais são os sinais clínicos mais destacados em picadas de serpente do gênero *Bothrops*; a ação dos diversos componentes das toxinas presentes no veneno aumenta a permeabilidade dos vasos, levando ao extravasamento de fluidos. As fosfolipases determinam a liberação de histamina por mastócitos, causando lesões em diversos tipos celulares com a liberação de ácido araquidônico pelos fosfolípidos de membrana, o que potencializa o processo inflamatório, diminuindo a eficácia dos tratamentos. (SILVA JÚNIOR, 2007).

A ação proteolítica do veneno botrópico é a responsável pela destruição tecidual e ulceração dérmica local, sendo esta última o sinal local de maior importância, podendo atingir apenas o subcutâneo ou comprometer estruturas mais profundas como músculos, tendões e ossos, podendo ocorrer diretamente pela ação de miotoxinas que afetam a integridade da membrana plasmática das células do músculo esquelético e/ou pela ação do veneno sobre a rede vascular, o que leva a isquemia. (GUTIERREZ & LOMONTE, 1989).

A necrose resultante das diversas ações do veneno botrópico é responsável por perdas definitivas de tecidos, conseqüente perda de função e amputações. Sua ocorrência se deve primeiramente à ação de miotoxinas, que possuem estrutura semelhante a fosfolipase A₂, e posteriormente a outros fatores como edemas e ação de hemorraginas que atuam sinergicamente na potencialização da formação de úlceras dérmicas (Figura 4). (SILVA JÚNIOR, 2007).



FIGURA 4 – Acidentes provocados por serpentes do gênero *Bothrops*. (MACHADO, 2011)

Destacado como o melhor e mais eficiente tratamento contra o envenenamento ofídico, sendo utilizado há mais de 100 anos, o soro poliespecífico produzido pela administração do veneno de serpentes em cavalos contém anticorpos que neutralizam muito

dos efeitos sistêmicos induzidos por venenos ofídicos. Diferentemente do quadro sistêmico, o soro antibotrópico não neutraliza os efeitos locais do veneno. (CHACUR, 2000).

2.3 O veneno botrópico

O veneno botrópico é constituído de uma complexa mistura de substâncias, entre elas proteínas e peptídeos de pequeno peso molecular que corresponde a mais de 90% do extrato seco. Além das proteínas e peptídeos, está presente grande variedade de enzimas, proteínas tóxicas sem atividade enzimática e proteínas não tóxicas. Algumas dessas proteínas necessitam estar associadas a componentes inorgânicos, tais como K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Fe^+ , Mn^{2+} e Zn^{2+} para que seja mantida sua estrutura e atividade. (GUÉRCIO, 2004).

Grandes variedades de enzimas presentes na peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* afetam principalmente o sistema homeostático, entre elas estão enzimas como metaloproteinases, serinoproteinases, nucleotidasas e fosfolipases. Existem ainda componentes não enzimáticos como lectinas, desintegrinas e peptídeos que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina, além de compostos não protéicos como carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres. Os diferentes compostos encontrados no veneno da *Bothrops* podem atuar sozinhos ou de modo sinérgico, potencializando seus efeitos nos acidentes ofídicos. (GUÉRCIO, 2004).

O veneno botrópico ainda pode apresentar variações decorrentes de diferentes localizações geográficas, fases de desenvolvimento e sexo dos animais. As variações bioquímicas intraespecíficas da composição do veneno da *Bothrops* podem também ser explicadas por fatores genéticos ou pelas diferentes dietas dessas serpentes. (Guércio, 2004). Foi observada variação na composição do veneno de serpentes em idades diferentes, onde as mais jovens apresentavam atividade coagulante mais predominante, ação que decorre de uma maior concentração de ativadores de protrombina e fator X, enzima da cascata de coagulação (SILVA JÚNIOR, 2007).

Em relação ao sexo, constatou-se que as fêmeas de *Bothrops jararaca*, além de serem maiores que os machos (cerca de cinco vezes maior), produzem e inoculam uma maior quantidade de veneno, diferem ainda quanto a sua constituição, sendo mais hemorrágico e provocando menor mioulceração dérmica quando comparado ao veneno produzido pelo macho (SILVA JÚNIOR, 2007).

2.4. Contexto histórico da utilização do veneno da *Bothrops jararaca* com fins terapêuticos

Por não possuir garras para aprisionar suas presas, as serpentes utilizam o veneno como forma de imobilizá-las, garantindo assim sua alimentação. Estudos dos mecanismos fisiopatológico do envenenamento e a caracterização molecular de toxinas presentes no veneno da *Bothrops jararaca*, resultaram em grandes contribuições científicas, podendo destacar: a descoberta da Bk (Bradicinina) e dos primeiros BPPs (Peptídeos Potencializadores de Bradicinina) produzidos pela glândula de veneno da *Bothrops*, onde pode se constatar que a ação sinérgica era capaz de ocasionar uma elevada queda da pressão arterial nas presas (GUERREIRO, 2009).

A Bk é um nonapeptídeo (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), lançado a partir do bradicinogênio plasmático ou globulina cininogênio do plasma. A Bk é produzida enzimaticamente a partir da caladina no sangue onde, apesar de ser um potente vasodilatador, possui uma meia vida curta (menos de um minuto) (ALLAIN, 2008).

A cascata plasmática de formação das cininas são ativadas pelas células endoteliais após certos insultos, tais como lesões. As cininas são responsáveis por vários efeitos fisiológicos, incluindo controle de pressão sanguínea, contração e relaxamento da musculatura lisa, permeabilidade vascular e mecanismo de transmissão de dor. As cininas tem como sua principal molécula a bradicinina que, em situações inflamatórias ou traumas, podem promover a migração de células para os tecidos, a ativação de mastócitos, fibroblastos, macrófagos e várias células do sistema imunológico. Suas ações são mediadas pela estimulação de dois subtipos de receptores transmembrânicos acoplados à proteína-G, denominado B1 e B2 (CAMPANHOLLE, 2010).

Em 1970, John Vane e colaboradores identificaram a enzima conversora de angiotensina I (ECA) como alvo para os BPPs que foram os primeiros inibidores naturais da ECA descritos e que apresentavam forte efeito hipertensivo tanto em animais como em humanos. Foi a partir dos estudos realizados sobre a estrutura e atividades de um BPP de cinco resíduos de aminoácidos que foi desenvolvido o captopril, um inibidor não peptídico da ECA, terapeuticamente tolerado e passível de administração via oral, sendo um fármaco muito utilizado até os dias de hoje no tratamento da hipertensão humana. (LAMEU, 2009).

Em 1992, Paine e colaboradores isolaram a jararagina uma metaloprotease dependente de zinco que é a principal responsável pela ocorrência de hemorragias ocasionadas pela peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* (García Sánchez, 2008). Em 2002,

Correia e colaboradores demonstraram que a jararagina é eficaz quanto à inibição da progressão de células de melanoma.

Como forma de desenvolver ferramentas alternativas para auxiliar o tratamento de doenças infecciosas, as moléculas presentes nos venenos de serpentes vêm sendo estudadas e testadas como forma de combater parasitoses como a Leishmaniose. Em estudos recentes, como o realizado por Deolindo e colaboradores, em 2005, foi observada a indução de morte celular em *Trypanosoma cruzi* por peçonha de *Bothrops jararaca*, através de indução de estresse nas formas epimastigotas. (CASTILHOS, 2008).

2.5 Principais moléculas encontradas na peçonha de *Bothrops jararaca*

2.5.1 Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (FLA₂) são enzimas miotóxicas encontradas na membrana plasmática das células musculares, extensamente distribuídas na natureza e de alto interesse científico e terapêutico. Interesse que é atribuído ao seu alto envolvimento com doenças inflamatórias em humanos e ao envenenamento por peçonhas de serpentes e abelhas. Essas enzimas podem ser encontradas tanto no interior quanto no exterior das células. As fosfolipases A₂ extracelulares (sFLA₂) são abundantes em tecidos pancreáticos e nas peçonhas de serpentes e artrópodes (CASTILHOS, 2008).

De acordo com Marucia Chacur (2000), efeitos do veneno botrópico, como hemorragia, edema, dor intensa e necrose têm sido atribuídos à ação de proteases, fatores hemorrágicos e fosfolipases presentes nesses venenos, bem como à liberação de compostos farmacologicamente ativos gerados pela ação do veneno.

As FLA₂ são particularmente abundantes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, compreendendo um grupo importante de enzimas presentes na maioria dos venenos e secreções orais de serpentes. Além da função digestiva sobre a presa, essas enzimas interferem nos processos fisiológicos, causando vários efeitos farmacológicos e fisiopatológicos, caracterizados por efeito neurotóxico, cardiotoxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, hemorrágico, inflamatório e mionecrótico (CHACUR, 2000).

As fosfolipases são genericamente divididas em dois grandes grupos, as FLA₂ extracelulares e de baixo peso molecular denominadas fosfolipases não pancreáticas ou secretadas (sFLA₂) e as FLA₂ intracelulares de alto peso molecular e de origem citosólica (cFLA₂). As sFLA₂ subdividem-se em três grupos e diversos outros subgrupos, com base na

sequência de aminoácidos: grupo I, compreendendo as enzimas encontradas em veneno de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hidrophidae* e no pâncreas de mamíferos; grupo II constituído por enzimas encontradas no veneno de serpentes da família *Viperidae*, nas plaquetas e no fluído sinovial humano; grupo III, representados pelas FLA₂ de venenos de abelha e do lagarto *Heloderma*. As FLA₂ ainda são encontradas em exsudatos inflamatórios e grânulos de plaquetas e mastócitos. (CHACUR, 2000; GUÉRCIO, 2004).

As cFLA₂ isoladas do citosol de plaquetas e monócitos expressam sua atividade catalítica em presença de concentrações mínimas de íons de cálcio, o que se faz acreditar que elas são ativadas por estímulos ligados à transdução de sinal (CHACUR, 2000). Além de sua função catalítica primária, as FLA₂ apresentam ainda atividades farmacológicas adicionais tais como hemorrágica, miotóxica, hemolítica, formadora de edema, hipotensiva, neurotoxidade pré e pró sináptica, cardiotoxicidade e agregadora de plaquetas. A peçonha de espécime do gênero *Bothrops* possui isoformas de FLA₂ básica com atividade miotóxica. (GUÉRCIO, 2004).

Segundo García Sánchez, (2004) as FLA₂ são enzimas lipolíticas que clivam a ligação Sn-2 acil dos fosfolípidos da membrana plasmática e produzem lisofosfatídeos e ácidos graxos livres como o ácido araquidônico, os FAP (Fator ativador de plaquetas) e os eicosanóides que são mediadores pró-inflamatórios. O veneno de *Bothrops jararaca* apresenta atividade fosfolipásica baixa, quando comparada a outras serpentes do mesmo gênero. Entre as fosfolipases presentes nesse veneno, pode-se destacar as: BJ-FLA₂ (Fator inibidor de ação plaquetária) e a JAR 10, 11, 12 e 13 com diferentes atividades fosfolipásica e miotóxica.

2.5.2 Peptídeos Potencializadores da Bradicinina (BPPs)

Os Peptídeos Potencializadores da Bradicinina (BPPs) pertencem a uma classe de oligopeptídeos de cinco a quatorze resíduos de aminoácidos, caracterizado por apresentar um alto conteúdo de prolina, apresentando resíduos piraglutâmicos na extremidade N-terminal e uma prolina na extremidade C-terminal. Os BPPs possuem capacidade de potenciar algumas atividades farmacológicas da bradicinina, como por exemplo, da ação contrátil do íleo isolado de cobaia e, *in vivo*, efeitos da Bk no Sistema Nervoso Central (SNC), além de efeitos cardiovasculares e antinoceptivos. (LAMEU, 2009).

Anteriormente acreditavam que o mecanismo de ação dos BPPs resultaria da inibição da atividade da enzima inativadora da Bk, o ECA. Essa enzima está inserida na membrana plasmática das células endoteliais nos vasos sanguíneos, tendo papel fundamental

na fisiologia cardiovascular, devido a sua dupla ação: converter a angiotensina I (A-I) em angiotensina II (A-II) (um potente vasoconstritor) e degradar a Bk, (potente vasodilatador), pertencendo tanto ao sistema renina-angiotensina como ao sistema caliceína-cininas (FIGURA 5).

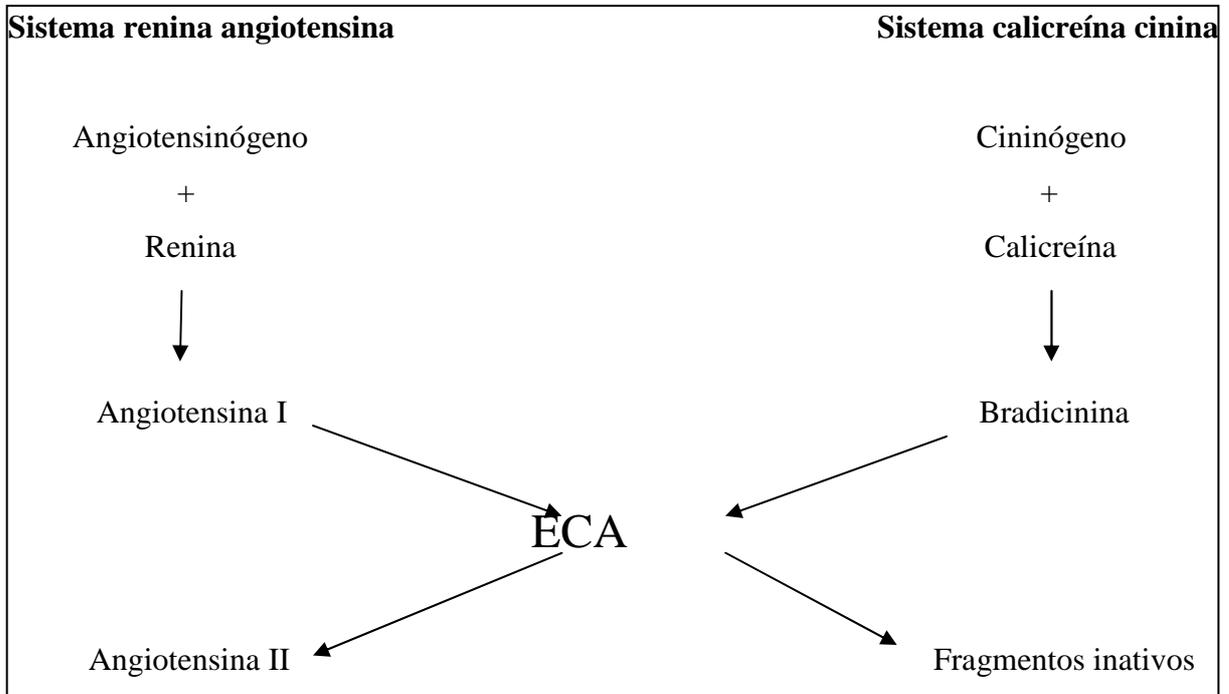


FIGURA 5 – Esquema representativo do papel metabólico da ECA no sistema renina-angiotensina e caliceína-cininas (LAMEU, 2009).

Em estudos recentes realizados por Guerreiro, é possível verificar que a atividade anti-hipertensiva de alguns BPPs, não dependem da geração de A-II, pois são capazes de promover a redução da pressão arterial em SHRs em concentrações cerca de 500 vezes abaixo das que promovem A-I em A-II. (GUERREIRO, 2009).

Ainda segundo Guerreiro (2009), com a utilização do peptídeo BPP-9a (nome comercial teprotide) foi atribuída a inibição da sECA pelos BPPs, a propriedade de corrigir a pressão arterial de pacientes hipertensos, revolucionando a terapêutica da hipertensão humana. Essa molécula não peptídica foi desenhada e testada pelos pesquisadores David Cushman e Miguel Ondetti que utilizaram a estrutura dos BPPs e os conhecimentos sobre a especificidade da carboxipeptidase B para sintetizar um composto não-peptídico que fosse capaz de atuar como um inibidor sítio-dirigido da sECA e que fosse eficiente por via oral, estudos esses que resultaram no desenvolvimento de um dos medicamentos anti-hipertensivos mais utilizados no mundo, o captopril (GUERREIRO, 2009).

2.5.3. Jararagina

A hemorragia local e sistêmica constitui o principal problema relacionado a acidentes ocasionados por serpentes do gênero *Bothrops*. Um dos principais componentes do veneno de serpentes é a metaloprotease conhecida por jararagina, presente no veneno da *Bothrops jararaca* e responsável pela causa de intensa hemorragia local inibindo a agregação plaquetária *in vitro* e contribuindo no desenvolvimento da hemorragia sistêmica *in vivo*, não sendo inibida por inibidores de proteinases plasmáticas. (GARCÍA SÁNCHEZ, 2004).

A jararagina é uma hemorragina de 421 resíduos de aminoácidos que inibe a ação plaquetária bloqueando a ação do colágeno a integrina plaquetária $\alpha 2\beta 1$. Essa enzima é uma zinco-metaloprotease hemorrágica de alta massa molecular (47kDa), da classe P-III possuindo um domínio tipo desintegrina e um domínio rico em cisteína adicional, ao C-terminal do domínio tipo-desintegrina. Pertence à família metaloprotease, e à subfamília reprotisina, com atividade catalítica hidrolase do tipo endopeptidase dependente do zinco (GARCÍA SÁNCHEZ, 2004). Geralmente apresenta a região N-terminal (amino-terminal) bloqueada por um resíduo de ácido piroglutâmico, não sendo possível caracterizá-la através de sequenciamento N-terminal por degradação de Edman (GORI, 2008).

García Sánchez (2004) descreveu dois mecanismos de interferência da jararagina sobre a ação plaquetária. A primeira delas é por degradação dos diferentes receptores plaquetários e proteínas adesivas envolvidas na hemostasia; a segunda é por interferência não enzimática, que é mediada pelo domínio desintegrina, com função de receptores da adesão plaquetária.

A jararagina contribui com a hemorragia sistêmica do envenenamento porque não é inibida pelos inibidores de proteinases plasmáticos como a $\alpha 2$ -macroglobina e porque degrada proteolíticamente o receptor plaquetário de colágeno, a integrina $\alpha 2\beta 1$, e o ligante adesivo, o vWF (Fator de von Willebrand). (GARCÍA SÁNCHEZ, 2004).

2.6. Efeitos terapêuticos do veneno botrópico

2.6.1. Hipertensão arterial

Devido a sua elevada prevalência, cerca de 15% a 20% da população adulta e mais de 50% nos idosos, a hipertensão arterial representa um sério problema de saúde pública, podendo, juntamente com o tabagismo, diabetes e dislipidemia, constituir um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, responsáveis por cerca de 30% das mortes (STRELEC e cols, 2003). Segundo Lameu (2009), a hipertensão arterial atinge diferentes faixas etárias como 5% das crianças, sexos, etnias, hábitos, dependências químicas, condições psíquicas e ambientais.

No Brasil, as doenças cardiovasculares passaram de 11,8% na década de 30 para 31,5% da mortalidade geral em 2003. Doenças coronárias, insuficiência cardíaca congestiva e doenças renais estão associadas ao risco de mortalidade e morbidade por derrame causando um impacto negativo da qualidade de vida. Essas doenças representam 65% dos óbitos ocorridos, não somente entre os idosos, mas constitui a segunda causa de morte entre a faixa etária de 45 a 64 anos e a terceira entre 25 e 44 anos, segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial. (LAMEU, 2009).

Não existe ainda uma vacina que previna o desenvolvimento da hipertensão arterial, mas é possível ser controlada com a adoção de hábitos de vida mais saudáveis ou através do uso de medicamentos. Apesar de o mercado disponibilizar mais de 75 agentes anti-hipertensivos divididos em 9 classes, incluídos os bloqueadores de aldosterona, β -bloqueadores noradrenérgicos, inibidores de renina, antagonistas do receptor de endotelina e inibidores de peptidases, o controle da pressão arterial está longe do desejado, o que tem levado ao estudo de novas classes de drogas anti-hipertensivas com o objetivo de ampliar a variedade de terapias para o combate à hipertensão arterial nas suas múltiplas expressões (LAMEU, 2009).

Estudos iniciados no final da década de 60 comprovaram que a sECA, uma glicoproteína com atividade metalo-carboxidipeptidase, participa do processo de geração da A-II e da degradação da Bk. A partir do final da década de 70, acreditava-se que o efeito do BPPs sobre a pressão arterial de animais hipertensos seria resultante da inibição da formação de A-II a qual seria corroborada pela inibição da degradação da Bk. (GUERRIRO, 2009).

Segundo Guerreiro, (2009) estudos recentes desenvolvidos pela Universidade de São Paulo mostraram que a atividade anti-hipertensiva de peptídeos extraídos da peçonha da *Bothrops jararaca*, como por exemplo, o BPP-7a e o BPP-10c, não dependem da geração

de A-II, pois podem reduzir a pressão arterial sistêmica em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) em concentrações cerca de 500 vezes abaixo daquelas que promovem inibição da conversão de A-I em A-II. Nesse estudo também foi mostrado que a atividade anti-hipertensiva do BPP-7a e do BPP-10c somente se manifesta em SHR, sendo os mesmos desprovidos de ação cardiovascular em ratos com pressão arterial normal. (GUERREIRO, 2009).

2.6.2 Melanoma

A incidência de melanoma cutâneo (câncer de pele) tem aumentado consideravelmente em vários países durante os últimos quarenta anos, fato esse que passou a ser alvo de preocupações entre as autoridades de saúde pública, que passaram a realizar campanhas e pesquisas com a finalidade de prevenir e realizar diagnósticos precoces dessa doença. O melanoma cutâneo é potencialmente hoje um câncer que pode ser curado se tratado precocemente, mas sua letalidade ainda é alta nos casos em que a doença é diagnosticada em fase não inicial. (MENDONÇA, 1992).

Como citado por Mendonça (1992), pessoas de pele clara possuem uma maior pré-disposição para o desenvolvimento desse tipo de câncer, o que pode ser comprovado através da verificação dos coeficientes de ocorrência de melanoma, onde as raças negras e amarelas possuem menor ocorrência do que em pessoas de raça branca.

Em estudos realizados por Correia em 2002, a metaloprotease hemorrágica isolada do veneno da *Bothrops jararaca*, conhecida por jararagina, mostrou resultados promissores sobre culturas de células de melanoma. O tratamento realizado com a jararagina alterou a morfologia celular, a viabilidade e a adesão às proteínas de matriz extracelular, resultando em uma significativa redução de metástase. (BASTOS, 2008). García Sánchez, (2004) reforça que o tratamento com a jararagina foi efetivo em células cancerígenas de melanoma humano em cultura, onde se observou a promoção de mudança na morfologia dessas células e em suas propriedades biológicas.

Foi observado ainda que, quanto maior o tempo de exposição à jararagina, maior era o número de células mortas e uma maior diminuição da viabilidade das mesmas. Pode-se ainda constatar que a jararagina inativa teve resultados melhores do que os realizados com a enzima ativa. Isso ocorreu provavelmente porque as proteínas induzidas em células cancerígenas, que potencializam os efeitos sobre a viabilidade celular, foram degradadas pela

jararagina ativa, mas não pela enzima com o domínio metaloprotease inativo, o que fez com que as proteínas não degradadas aumentassem a toxicidade dessa proteína inativa. A ligação da toxina possui efeito inibitório, estatisticamente significativo, sobre a invasão celular, particularmente em células tratadas com jararagina ativa.

Em estudo realizado por Corrêa em 2002, pode-se constatar que o número de metástase pulmonar em camundongos tratados com jararagina diminuía significativamente, o que levou a acreditar que a habilidade dessa enzima de diminuir o número de casos de metástase *in vivo* apontou para um potencial uso terapêutico dessa toxina.(GARCÍA SÁNCHEZ, 2004).

2.6.3. Leishmaniose

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas, endêmicas e tropicais, geralmente relacionadas à pobreza e que acomete tanto homens como animais. O parasitismo dos macrófagos pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania* afetam a pele, a mucosa ou vísceras. Esse protozoário é inoculado pela picada de fêmeas de flebotomíneos, que são encontrados em 88 países no mundo, a maior parte se encontra nos trópicos e subtropicais, afetam 12 milhões de pessoas no mundo e aproximadamente 350 milhões vivem em área de risco. (CASTILHOS, 2008).

Segundo Berman, (1997) as Leishmanioses são consideradas de transmissão essencialmente silvestre e em ambientes rurais, sendo o homem apenas um hospedeiro acidental das várias espécies com potencial patogênico. Hoje o padrão de transmissão apresenta mudança devido às modificações sócio-ambientais, como o desmatamentos e o êxodo rural, que levou as pessoas para as periferias das grandes cidades.

Estes protozoários podem se apresentar de duas diferentes formas: uma presente no intestino médio de hospedeiros invertebrados, que possui flagelo único, núcleo no terço médio da célula e cinetoplasto em posição mais anterior, denominada promastigotas; ou outra, presente nos vacúolos parasitóforos no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado, não apresenta flagelo livre, possui forma esférica, núcleo na posição central e cinetoplasto adjacente ao mesmo, denominada amastigota (Figura 6). (CASTILHOS, 2008).

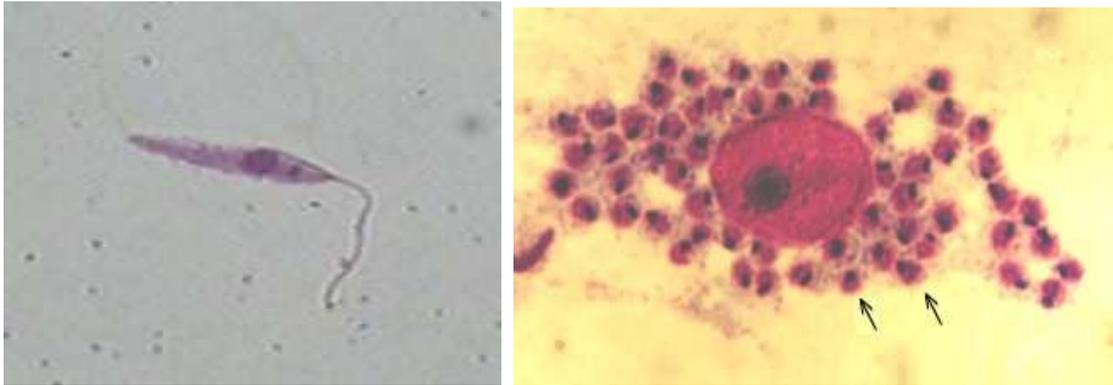


FIGURA 6 – *Leishmania* - Imagem mostrando a forma promastigotas da *Leishmania sp* e a forma amastigota da *Leishmania spp.* (CASTILHOS, 2008)

Diante dos resultados apresentados por Castilhos (2008) em seu estudo sobre os efeitos da peçonha da serpente do gênero *Bothrops* sob as formas promastigotas de *Leishmania spp.*, foi descrito que a referida peçonha e suas frações protéicas reduzem a viabilidade celular e a produção de NO de *Leishmania*, levando à diminuição da infectividade dos parasitos. Estando esses dados de acordo com os obtidos por Tempone e colaboradores (2001), que observaram a atividade da proteína L-amino oxidase do veneno botrópico na morte de parasitos da espécie *Leishmania spp* ‘*in vitro*’ (CASTILHOS, 2008)

3. Conclusão

A composição do veneno botrópico, bem como a atuação de seus compostos em organismos vivos, desencadeou uma série de estudos com o objetivo de entender os mecanismos de ação das várias substâncias que o constitui.

Diante dos estudos realizados por Junho Vane e colaboradores, foi possível o desenvolvimento, em escala industrial, de um inibidor não peptídico da ECA, terapeuticamente tolerado e passível de administração via oral, resultando no fármaco captopril.

Sobre a eficácia da jararagina no tratamento do melanoma, pode-se constatar, através de estudos descritos por García Sánches, (2004), que a jararagina mostrou-se efetiva no tratamento de células de melanoma humano em cultura, modificando a morfologia da célula e sua atividade biológica. Foi ainda observada redução de metástases em estudos com a jararagina realizado por Corrêa em 2002, onde foi observado a habilidade de redução dessa metaloprotease nos casos de metástase.

Este trabalho ainda descreveu os resultados apresentados por Castilhos (2008) em seu estudo sobre os efeitos do veneno botrópico sob as formas promastigotas de *Leishmania spp*, onde a referida peçonha e suas frações protéicas levam à diminuição da infectividade dos parasitos. Resultados esses, onde foi observada a atividade da proteína L-amino oxidase presente no veneno botrópico na morte de parasitos da espécie *Leishmania spp* ‘*in vitro*’ (CASTILHOS, 2008).

Com base no levantamento de dados realizados durante a realização desse trabalho, observa-se um grande potencial terapêutico do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, além dos citados nesse texto, outros estudos apontam para o desenvolvimento de tratamentos que utilizam essa peçonha, como a apoptose do *Trypanosoma cruzi* causada por enzimas presentes no veneno botrópico, a descoberta do mecanismo de ação no local da picada, que contribuirá significativamente para o tratamento local de picadas envolvendo a serpente *Bothrops jararaca*. O que se faz acreditar que outras pesquisas ainda estão por produzir resultados tão importantes quanto os que resultaram na descoberta do anti-hipertensivo captopril.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAIN, P. Angiotensina, a bradicinina, a endotelina, peptídeos natriuréticos. Disponível em: < www.pharmacorama.com>. Acesso em: 24 mar. 2011

ALVES, A.L.; GIMENEZ, A.R.M.; VENTURA, D.V.R. et al. *Cartilha de ofidismo (COBRAL)*. Brasília: Ministério da Saúde, 1989, 32p.

BASTOS, L. M. Ação in vitro da neuwiedase sobre a infecção por T. gondii em fibroblastos humanos e na produção de mediadores inflamatórios por células mononucleares do sangue periférico humano. 2008. 13f. Dissertação (Mestrado em genética e bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, 2008.

BERMAN, J. D. Human *Leishmaniasis*: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 24 (4), p. 684-703, 1997.

BORGES, R.C. *Serpentes peçonhentas brasileiras*: manual de identificação, prevenção e procedimentos em caso de acidentes. São Paulo: Atheneu, 1999. p.146.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, DF, 1999.

CAMPANHOLLE, G. O papel do receptor B1 da bradicinina em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda direta e indireta. 2010. 25f. Dissertação (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2010.

CASTILHOS, P. Efeitos da peçonha de *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp. 2008. 30f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicada) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, UFMG, Uberlândia, 2008.

CHACUR, M. Mediação química da hiperalgesia induzida pelos venenos de serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* e por uma miotoxina com atividade de fosfolipase a₂ isolada do veneno de *Bothrops asper*. 2000. 1f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2007.

FILGUEIRAS, H. Galeria de Henrique Filgueiras. Disponível em <<http://www.flickr.com/photos/hrfilgueiras/page9/>>. Acesso em: 18 mar. 2011

GARCÍA SÁNCHEZ, L. T. Subclonagem e expressão do domínio catalítico da Jararagina: Estudo do efeito das modificações pós-traducionais na atividade hemorrágica. 2004. 36f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, USP, São Paulo, 2004.

GORI, A. L. L. Estudos Bioquímicos e Biofísicos de Metaloproteases/desintegrinas de venenos de serpentes. 2008. 28f. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, USP, São Paulo, 2008.

GUÉRCIO, R. A. P. Análise Proteômica de *Bothrops atrox* durante seu desenvolvimento ontogenético. 2004. 5f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, UnB, Brasília, 2004.

GUERREIRO, J. R. Análise Proteômica de *Bothrops atrox* durante seu desenvolvimento ontogenético. 2009. 22f. Dissertação (Doutorado em Ciências Bioquímica) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. **Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review.** *Mem. Inst. Butantan*, n.51, p.211-223, 1989.

LAMEU, C. O Sistema Nervoso Central como Alvo das Ações Anti-Hipertensivas de um Peptídeo Rico em Resíduos de Prolina do Veneno da *Bothrops jararaca*. 2009. Dissertação (Doutorado e Bioquímica) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2009.

MACHADO, C. Projeto Cobras Brasileiras. Disponível em <http://www.cobrasbrasil.com.br/apresentacao_resumo.html>. Acesso em: 17 mar. 2011

MENDONÇA, G. A. e S. **Revista Saúde Pública São Paulo**, São Paulo, v.26 n.4 p. 290. 1992.

OLIVEIRA, M. M. V. Serpentes venenosas. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n.28, p.1-52, 1999.

SILVA JÚNIOR, P. G. P. Efeitos do ar-turmerone, isocurcumenol e soro antibotrópico em coelhos após inoculação do veneno de *bothrops jararaca*. 2007. 18, 19f. Dissertação (Doutorado em Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2007.

STRELEC e cols. A Influência do Conhecimento sobre a Doença e a Atitude Frente à Tomada dos Remédios no Controle da Hipertensão Arterial. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, São Paulo, volume 81, número 4, 343-8, 2003.

THE MEDICAL NEWS, Os inibidores da ECA. Disponível em <www.news-medical.net/health/ACE-Inhibitors-What-are-ACE-Inhibitors.aspx>. Acesso em: 16 mar. 2011

WADSWORTH, D. A. B. Caracterização de desintegrinas de venenos viperídeos como ferramentas seletivas na detecção ou inibição da função de integrinas. 2003. 32f. Dissertação (Doutorado em Química) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2003.