



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE
QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE COAGULANTE DE
VENENOS DE SERPENTES DOS GÊNEROS
***Bothrops* E *Crotalus* (SERPENTES: VIPERIDAE)**

Danielle Santos Ribeiro

Goiânia, 2021

Danielle Santos Ribeiro

**OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE
QUANTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE COAGULANTE DE VENENOS DE
SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops* E *Crotalus* (SERPENTES:
VIPERIDAE)**

Monografia apresentada ao Departamento de
Biologia da Pontifícia Universidade Católica de
Goiás para obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Matheus Godoy Pires

Goiânia, 2021

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA

Aluna: Danielle Santos Ribeiro

Orientador: Dr. Matheus Godoy Pires

Membros:

- 1. Dr. Matheus Godoy Pires**
- 2. Me. Ana Maria Da Silva Curado Lins**
- 3. Me. Lilibete Pereira de Oliveira**

Dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo favor imerecido e por me permitir viver com alegria e mansidão em momentos difíceis em que certamente, não deixou nada faltar.

A meu esposo, Luiz Carlos que sempre esteve ao meu lado, ajudando da melhor forma possível, sendo apoio, provedor e protetor. Dentre os quatros anos de graduação tornou-se apoio, se fez base, trouxe descanso para que eu conseguisse chegar ao fim.

A meus pais Luís dos Santos e Maria Ferreira Ribeiro dos Santos que sempre estiveram próximos, pelo incentivo e dedicação para com a minha educação, como também a minha irmã Anna Karoline que sempre foi um grande exemplo de bondade, humildade e parceria.

Sou grata aos meus tios João Elbson e Raires Lima Nascimento e minha prima Évolvy Nascimento Ferreira que sempre estiveram presentes em minha vida e que participaram de perto do meu desenvolvimento pessoal possuindo um papel de grande influência. A minha prima quase irmã Regiquely Silva dos Santos, um exemplo de pessoa, maturidade e sabedoria, obrigada por fazer parte da minha vida.

Ademais, agradeço as melhores colegas que pude ter durante a graduação, Amanda de Paula, Amanda Soares, Amanda Islemberg, Ivana Neres e às demais que estiveram próximas desde o primeiro dia de aula. Agradeço de forma genuína e com certeza é uma honra desmedida ter conhecido todas. Levo comigo cada boa lembrança, cada sorriso, cada abraço que pude dar e todo apoio que me deram. Não poderia ser uma profissional íntegra sem ter o conhecimento do trabalho em equipe e nesses quatro anos vocês me ensinaram.

A todos os meus professores que me acompanharam durante essa jornada, tenho consciência de que ofereceram o seu melhor. Ao meu orientador Dr. Matheus Godoy Pires, um grande profissional que me concedeu oportunidades durante a graduação, cujo os conselhos acadêmicos farão grande diferença em minha carreira profissional. Ademais, a Dra. Marta Regina Magalhães que me orientou para realização da parte prática deste trabalho, pela dedicação, paciência, pelo tempo que se dedicou para eu obter experiência e chegar ao fim desse trabalho.

Em especial à professora Ana Maria da Silva Curado Lins por possuir um coração tão bondoso e que de certa forma interveio em momentos de grandes necessidades, se expressou como professora, mãe, amiga e conselheira.

A todos meus eternos agradecimentos. Em suma, agradeço a todos que parcialmente contribuíram para que esse dia viesse à tona.

RESUMO

O acidente ofídico é um problema negligenciado na medicina tropical que provoca diversas complicações na saúde da vítima em diferentes graus de morbidade. Os envenenamentos causados por viperídeos promovem uma cadeia de reações no indivíduo, dentre as quais são frequentemente observadas alterações na hemostasia e manifestos como distúrbios na coagulação com efeito hemorrágico. A gravidade desses efeitos depende tanto da resposta individual da vítima quanto da espécie de serpente e da quantidade de proteínas em seu veneno. O presente estudo buscou estabelecer um protocolo padrão para a quantificação da atividade coagulante, usando como parâmetro venenos das espécies *Bothrops moojeni*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus*, comparando as diferenças entre os métodos de Sanchez *et al.* (1992) e o método de O'Leary e Isbister (2010). Foram observadas diferenças significativas entre os métodos estudados e especificou-se que 125µg/ml do veneno de *B. moojeni* e *C. durissus*, 62,5µg/ml de veneno de *B. alternatus* e 33,25µg/ml de *B. pauloensis* são suficientes em provocar a coagulação da amostra de sangue em 60 segundos, e que uma modificação do método de O'Leary e Isbister (2010) é mais adequada para quantificar a atividade coagulante em qualquer condição plasmática.

Palavras-chave: método; protocolo de quantificação; coagulação; proteases; serpentes.

ABSTRACT

The ofidic accident is a neglected problem in tropical medicine that causes several complications to the health of the victim in different degrees of morbidity. Poisonings caused by viperids promote a chain of reactions in the individual, among which are often observed changes in hemostasis, manifested as disorders in coagulation with hemorrhagic effects. The severity of these effects depends on both the individual response of the victim and the snake species and the amount of proteins in its venom. The present study aimed to establish a standard protocol for the quantification of coagulant activity, using as parameter venom of the species *Bothrops moojeni*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops alternatus* and *Crotalus durissus*, comparing the differences between the methods of Sanchez *et al.* (1992) and the O'Leary and Isbister method (2010). Significant differences were observed between the methods studied and it was specified that 125µg/ml of venom. *B.moojeni* and *C. durissus*, 62.5µg/ml of *B. alternatus* venom and 33.25µg/ml of *B. pauloensis* are sufficient to cause blood sample coagulation in 60 seconds, and that a modification of the O'Leary and Isbister method (2010) is more suitable for quantifying coagulating activity in any plasma condition.

Keywords: Methods; Quantification protocol; Coagulation; Proteases; Snakes.

FIGURAS

Figura 1. Ação de células dendríticas em defesa contra antígenos protéicos	5
Figura 2. Visão esquemática da via extrínseca (downstream) da cascata de coagulação	7
Figura 3. Fases de iniciação, amplificação e propagação da cascata de coagulação	7
Figura 4. Demonstração esquemática da amplificação da produção de trombina (via extrínseca) intermediada pelos fatores de coagulação VIII, IX, X e V	8
Figura 5. Representação esquemática de receptores acoplados à proteína G	9
Figura 6. Curva padrão da dosagem da albumina	12
Figura 7. Análise comparativa dos métodos de atividade coagulante	15
Figura 8. Coágulo de fibrina retirada da cubeta	16

TABELAS

Tabela 1. Quantificação de proteínas pelo método proposto por Bradford (1976)	13
Tabela 2. Tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de Sanchez <i>et al.</i> (1992) em venenos de <i>Bothrops moojeni</i>	13
Tabela 3. Tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010) em venenos de <i>Bothrops moojeni</i>	14
Tabela 4. Tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010) em venenos de <i>Bothrops pauloensis</i>	14
Tabela 5. Tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister(2010) em venenos de <i>Bothrops alternatus</i>	14
Tabela 6. Tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010) em venenos de <i>Crotalus durissus</i>	14

SIGLAS

FT	Fator Tecidual
F	Fator de Coagulação
FI	Fator I, Fibrinogênio
FII	Fator II, Protrombina
FIIa	Fator II Ativado, Trombina
FIII	Fator Tissular, Tromboplastina
V	Cofator V, Proacelerina
Va	Cofator V Ativado
FVII	Fator VII, Proconvertina
FVIIa	Fator VII Ativado
VIII	Cofator VIII, Anti-hemofílico
FIX	Fator IX, Doença de Christmas
FX	Fator X ou Fator de Stuart Power
FXa	Fator X Ativado
FXI	Fator XI
FXII	Fator XII, Fator Hageman
FXIII	Fator XIII, Transglutaminase
v/v	Volume/Volume
GPCRs	Receptores Acoplados à Proteína G
PAR	Receptor Ativado por Proteinase
SVMP	<i>Met aloprotease</i> de Veneno de Serpentes
SVSPs	Serinoprotease de Veneno de Serpentes
LAO	L-Aminoácido Oxidase
CTL	Lectinas do Tipo C
VEGF	Fatores de Crescimento Endotelial
BPP	Peptídeos Potenciadores de Bradicinina
CRISP	Secreções Protéicas Ricas em Cisteína
SvPLA2	Fosfolipase A2 de Venenos de Serpentes
PLC β	Fosfolipase C Beta
IP3	Inositol-1,4,5- Trifosfato
DAG	Diacilglicerol
PKC	Proteína Quinase
MOOA	Moojenactivase
Moojase	Serino Proteases de Venenos de <i>B. moojeni</i>
t-PA	Plasminogênio do Tipo Tecidual
u-PA	Plasminogênio de Tipo Uroquinase
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
T-DC8+	Linfócito T Citotóxico DC8
T-CD4+	Linfócito T Citotóxico Auxiliares DC4
Th	Células T Helper
PBS	Phosphate Buffered Saline
CEPB	Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Veneno das serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i>	2
1.2. Proteases coagulantes do veneno de serpentes	2
1.3. Soroterapia	3
1.4. Processamento de toxinas pelo sistema imunológico	4
1.5. Sangue e coagulação	5
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Amostra de veneno	11
3.2. Dosagem de proteína	11
3.3. Atividade coagulante pelo método de Sánchez <i>et al.</i> (1992)	11
3.4. Atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010)	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1. Dosagem de proteína	12
4.2. Ensaio coagulante pelo método de Sánchez <i>et al.</i> (1992)	13
4.3. Ensaio coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010)	13
5. CONCLUSÃO	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
ANEXO I	A-I

1. INTRODUÇÃO

Existem no mundo cerca de 3.400 espécies de serpentes, com distribuição cosmopolita intertropical e ocupando ambientes tão diversos quanto oceanos, desertos, savanas e florestas. São divididas em dois grandes clados; Scolecophídia e Alethinophidia (HSIANG *et al.*, 2015). Entre os Alethinophidia, os Caenophidia (Colubroidea + *Acrochordus*) são o grupo de serpentes mais diversos e derivado, e dentre estes encontramos atualmente as linhagens de serpentes peçonhentas das Américas (Elapidae e Viperidae) (VIDAL *et al.*, 2007). Os Viperidae estão organizados em seis gêneros e quarenta e oito espécies, cuja característica principal de diagnóstico é a presença de glândulas de veneno conectadas a um aparato inoculador do tipo solenoglifodonte (VALENTE *et al.*, 2018).

Estudos moleculares evidenciam que essas glândulas produzem uma grande variedade de toxinas em diferentes espécies. A evolução desses componentes tóxicos está relacionada à diversificação por meio de duplicação de genes seguidos por neofuncionalização, sofrendo ação da seleção positiva, ação via *splicing*, recombinação e modificação da expressão dos genes, tendo como resultado diferentes expressões, codificadas pelas mesmas famílias de genes mas com atividade funcional distinta. Desta forma, esses componentes variáveis, presentes na composição dos venenos atestam a diversidade funcional, causa das diferentes patologias causadas por acidentes ofídicos (SLAGBOOM *et al.*, 2017).

Os venenos das serpentes são uma mistura de substâncias, principalmente proteínas com atividade enzimática, denominadas genericamente de toxinas. Quando inoculadas em um organismo provocam uma série de implicações locais e que logo se disseminam por todo corpo. A falta de tratamento após um acidente com as espécies dos viperídeos pode causar diversos efeitos patológicos permanentes ou duradouros. Essas patologias estão relacionadas com efeitos críticos neurotóxicos, citotóxicos e hemotóxicos. Das atividades hemotóxicas decorrem os principais efeitos sistêmicos como hemorragias, insuficiência renal, coagulopatia e choque cardiovascular (MACKSSEY, 2010).

Devido à sua abundância e camuflagem, a maior prevalência de acidentes ofídicos no Brasil se dá com serpentes do gênero *Bothrops*, sendo que entre os anos de 2019 e 2020, foram registrados 42.510 acidentes ofídicos e 176 óbitos causados por serpentes deste gênero no estado de Goiás (BRASIL, 2021). Dentre os viperídeos do Cerrado, a espécie *Bothrops moojeni* é a mais comum. Essa espécie possui a cauda com ponta esbranquiçada ou amarela e uma preferência alimentar por anuros quando filhotes, porém quando adultos passam a se alimentar

de pequenos mamíferos e sua cauda assume o padrão geral de colorido do corpo. Essa variação ontogenética da dieta do animal pode implicar na variação na composição do veneno (HATAKEYAMA *et al.*, 2021).

1.1. O Veneno das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*

Venenos de serpentes são misturas complexas de substâncias tais como peptídeos e constituintes não protéicos, fundamentais na sua adaptação para o forrageamento e defesa das serpentes. Podem atuar na presa causando a desintegração tissular, assim participando do fenômeno digestório, além de apresentarem diversas outras manifestações tóxicas, como distúrbios neurológicos e coagulopatias, que ocorrem tanto por ação isolada das toxinas constituintes do veneno quanto por sua atuação sinérgica (HATAKEYAMA *et al.*, 2021).

Veneno de *Bothrops moojeni* é composto principalmente por metaloproteases de veneno de cobra (SVMP), serino proteases (SVSPs), fosfolipase A2, L-aminoácido oxidases (LAAO), Lectinas do tipo C (CTL) e por toxinas menos abundantes como fatores de crescimento endotelial (VEGF), peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP), secreções protéicas ricas em cisteína (CRISP) e hialuronidase, estas últimas correspondendo a cerca de 15% de proteínas totais no veneno (AGUIAR *et al.*, 2019).

Os venenos de *Crotalus durissus*, por intermédio de proteínas precursoras, promove a coagulação por meio da Convulxina e da Giroscina, e hemorragia por meio de complexos de Crotoxinas A e B e Crotamina. A fosfolipase A2 de venenos de serpentes (SvPLA2) são enzimas que catalisam a hidrólise dos fosfolipídios e também favorecem a modulação dos efeitos hemostáticos. Entre os principais mecanismos estão a hidrólise de fosfolipídios pró-coagulantes, competição com fator de coagulação e ligação direta com estes (GIMENEZ *et al.*, 2020).

1.2. Proteases coagulantes do veneno de serpentes

Proteases que provocam alteração na hemostasia atuam por meio da estrutura molecular ou pela função bioquímica e, em muitos casos, emulam a trombina, promovendo a ligação do Fator Tecidual, provocando a clivagem do fibrinogênio em duas cadeias de fibrinopeptídicas (A e B) para formar fibrina (ISBISTER, 2009). Exercem uma função importante no organismo, pois promovem a ativação de uma cascata proteolítica que ajuda a manter a integridade de vasos sanguíneos e barreiras epiteliais que barram e destroem organismos invasores. Quando essas proteases são lançadas em alta concentração no sangue, promovem a coordenação da resposta

imunológica por meio da ativação da cascata de coagulação e sistema complementar (CHANDRABALAN *et al.*, 2021).

Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs) são classificadas em três classes com base no seu domínio catalítico. A classe PI possui apenas um grupo catalítico, a classe PII apresenta um grupo catalítico e um domínio desintegrina, e a classe PIII de maior peso molecular, conta com domínios desintegrina e domínios ricos em cisteína (PIIIa e PIIIb), sendo que o domínio PIIIb apresenta um domínio adicional semelhante a lectina. Em serpentes do gênero *Bothrops*, essas SVMPs promovem a ativação dos fatores II e X da cascata de coagulação, que encontram-se no plasma em sua forma inativa e ativação por SVMPs ocorre por clivagem proteolítica do sítio de ligação do peptídeo específico, ativando o Fator Xa formando trombos. Além de promover a coagulação, também promovem outros eventos hemostáticos como fibrinólise (SARTIM *et al.*, 2015).

A Moojenactivase (MooA) é uma metaloprotease do veneno de *Bothrops moojeni*. É formada por três cadeias de proteínas, uma HC-N glicosilada, uma de cadeia α e outra de cadeia β . Desempenha a ativação dos fatores II e X, como também, clivagem do fibrinogênio. Apesar de ativar os dois fatores, apresenta maior eficiência em ativar o fator X. Essa interação ocorre entre o domínio da lectina da protease e o domínio Gla presente em ambos os fatores. Além disso, a formação alfa-trombina ocorre por meio da clivagem da protrombina nos domínios Arg271-Thr272 e Arg320-Ile321 onde é descrito como complexo de protrombinas e endógeno construído pelos Fatores Xa e Va e fosfolípidios negativamente carregados e cálcio (SARTIM *et al.*, 2015).

Um tipo de toxina semelhante à trombina encontrada em venenos de serpentes são as serinoproteases (SVSPs). A Moojase é uma serinoprotease majoritária do veneno de *Bothrops moojeni*, e possui com potencial de promover a agregação plaquetária. Coletivamente, serinoproteases são glicoproteínas que apresentam uma única cadeia, possuem uma região catalítica formada por uma tríade de aminoácidos His57, Asp 102 e Ser 195, abundantes ligações dissulfeto e uma extensa região de glicosilação com uma variedade de substratos, o que lhe confere ação sobre a cascata de coagulação (AMORIM *et al.*, 2018).

1.3. Soroterapia

Os soros contra acidentes ofídicos produzidos no Brasil são adquiridos através de hiperimunização em cavalos que envolvem processos de alta complexidade. A hiperimunização ocorre com a injeção de antígenos diluídos em cavalos a fim de produzir uma resposta imune,

cada animal recebe apenas um antígeno. Depois que a imunização é dada como completa, o plasma é retirado e passa pelo processo de purificação para isolar anticorpos específicos (BRASIL, 2018).

Soroterapia é a única medida efetiva para o tratamento dos acidentes ofídicos. A grande diversidade na composição dos venenos implica, no entanto, em uma baixa eficácia dos soros, principalmente na ação proteolítica e em muitos casos na função hemostática, uma vez que esses soros são produzidos a partir da imunização de organismos com um pool de venenos de uma variedade limitada de espécies de serpentes, que expressam toxinas em diferentes graus. Por meio disso, a eficácia do veneno pode variar consideravelmente (SOUSA *et al.*, 2018). Os soros antitoxinotrópico e polivalentes produzidos no Brasil, por exemplo, são feitos a partir de plasma de cavalos imunizados e com o veneno de *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops pauloensis* (12,5%), *Bothrops alternatus* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%) e *B. jararacussu* (12,5%) (SOUSA *et al.*, 2018).

1.4. Processamento de toxinas pelo sistema imunológico

Quando ocorrem acidentes com serpentes, dois eventos principais acontecem: a ocorrência dos efeitos tóxicos provocados pelas toxinas e a resposta do sistema imunológico para destruir e remover essas toxinas. Com o envenenamento ofídico, entretanto, o organismo não consegue reagir a tempo de evitar a rápida evolução do envenenamento (LEÓN *et al.*, 2011).

Os componentes do veneno são internalizados e processados pelas células apresentadoras de antígenos (APC- macrófagos e células dendríticas), onde fragmentamos peptídicos para encaixá-los em molécula MHC de classe II para que rapidamente sejam apresentadas às células T. Após o reconhecimento, as células T helper (Th) iniciam a seleção clonal de células B *naive* primárias. Logo as células B se expandem para se diferenciar em células B pré-memória ou pré-plasmáticas, e quando maduras iniciam a síntese de anticorpos específicos (SILVA *et al.*, 2011) (Figura 1).

Para o estudo das alterações nos mecanismos da coagulação existem diversos protocolos e métodos, e portanto, grande variabilidade de resultados, implicando numa dificuldade na análise comparativa entre os venenos de diferentes indivíduos ou espécies. Desta forma, o presente estudo buscou padronizar um protocolo para o estudo da coagulação com venenos de serpentes através da realização controlada de testes de mensuração do efeito coagulante, comparando-se os métodos de Sánchez *et al.*, (1992) e O'Leary e Isbister (2010), ambos

baseados na quantificação do efeito óptico gerado pelo contato do veneno com o sangue em condições controladas.

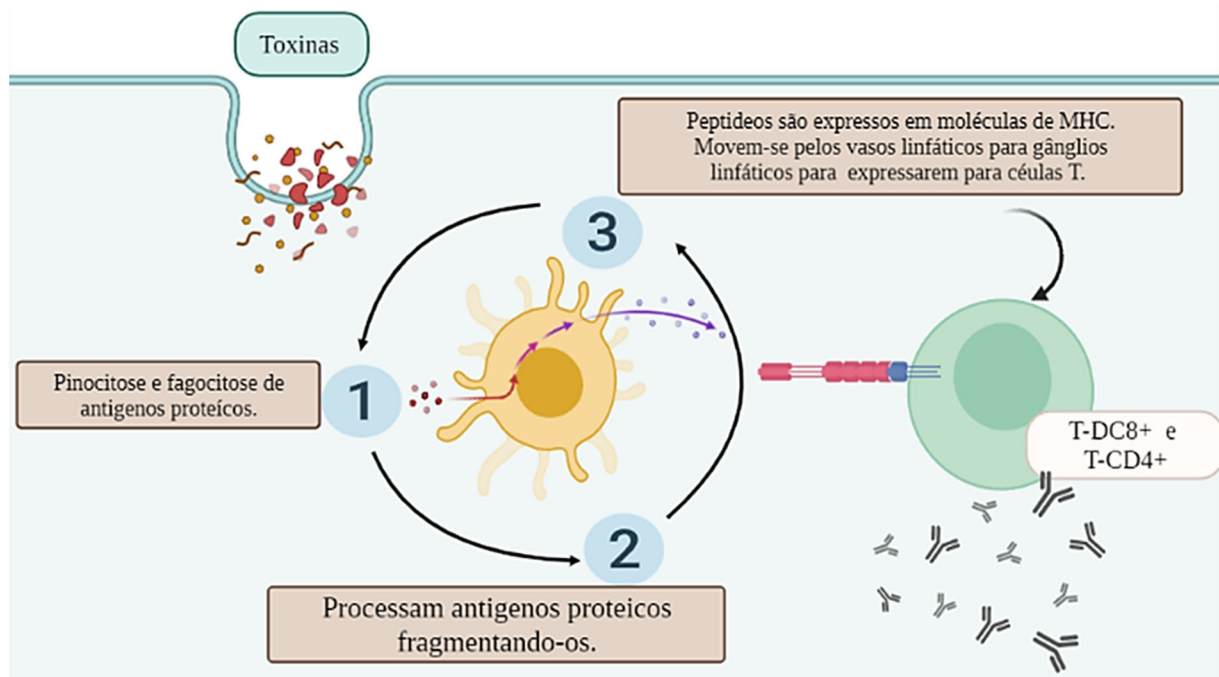


Figura 1. Ação de células dendríticas em defesa contra antígenos proteicos. Derivadas de monócitos, são encontradas no sistema gastrointestinal, tecido epitelial e órgãos linfóides. A ativação de células T, é um processo crucial para desencadear a produção de anticorpos específicos para defesa do organismo. Ilustração da autora.

1.5. Sangue e coagulação

A principal função do sangue é realizar transporte de substâncias essenciais tais como nutrientes, proteínas, células de defesa, hormônios e gases pelo corpo. Desse modo, para que estas funções sejam efetuadas adequadamente, o mesmo deve sempre estar em seu estado fluido (BITTENCOURT, 2016). Na presença de lesão vascular, entretanto, o sangue precisa coagular na região da lesão a fim de evitar perda de sangue. O sistema hemostático tem a função de manter a fluidez sanguínea por meio de células como as plaquetas, proteínas séricas específicas, integridade vascular e, por fim, da fibrinólise (HOFFBRAND, 2013).

Os processos que explicam a hemostasia são descritos como hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise (GRIMALDO-GÓMEZ, 2017). A hemostasia primária é efetuada por derivados celulares (plaquetas), que além de atuar no papel crucial da hemostasia, também possuem funções ligadas ao processo tromboinflamatório. Plaquetas são derivados celulares anucleados e apresentam três tipos de grânulos que são responsáveis por manter o controle da hemostasia: grânulos α , grânulos densos e grânulos T. Na ocorrência de lesão tecidual ou vascular, as plaquetas desempenham funções de adesão com algumas estruturas endoteliais e subendoteliais consecutivos com ativação e agregação plaquetária, fenômenos

que, em conjunto, são denominados como primeira onda da hemostasia. Adicionalmente, as plaquetas expressam vários receptores de membranas como receptores de integrinas, glicoproteínas (GP), receptores ativados por proteases (PARs) e receptores toll-like (TLRs), estes últimos responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que conseqüentemente formam trombos (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

As plaquetas se aderem ao endotélio lesado através das glicoproteínas (GP), que interagem com o colágeno subendotelial com intermediação do Fator de Von Willebrand (FvW). Quando as plaquetas se aderem, promovem o aumento da afinidade das GP pelo fibrinogênio (FI). Deste modo, a formação do agregado de plaquetas é mediada com fibrinogênio interagindo com GP a fim de formar agregados de plaquetas (KROUPENOVA-ZAMOR *et al.*, 2017).

A hemostasia secundária ocorre quando o fibrinogênio é clivado pela trombina formando fibrina. O processo que envolve a formação de fibrina se dá pela ativação de fatores de coagulação, sintetizados no fígado e ativados por ocasião de lesão. Essa ativação se dá por duas vias, extrínseca e intrínseca, que agem em sinergia e culminam na via comum. O início da via extrínseca é iniciado quando o Fator VII (Proconvertina) plasmático se liga ao fator tecidual (FT) liberado pelo endotélio vascular lesionado, e rapidamente gera uma resposta celular cálcio-dependente. O FT ativa o Fator VII, que desencadeia a ativação do Fator X (Fator de Stuart Power), conseqüentemente ativando o Fator V (Proacelerina) que converte o Fator I (protrombina) em Fator IIa (trombina). Trombinas são proteases chaves na coagulação, sua gênese é determinada pelo processo de clivagem proteolítica da protrombina zimogênica (HEUBERGER *et al.*, 2019; SANG *et al.*, 2020) (Figura 2).

A produção de Fator IIa (trombina) dá início à via intrínseca, também denominada “amplificação” da cascata de coagulação, pois o Fator XII ativa o Fator XI na presença de cálcio. Ativado o Fator XI, é causada a ativação em cascata, respectiva e consecutivamente, do Fator IX e do Fator X (SANG *et al.*, 2020) (Figura 3).

O último processo é denominado via comum, pois tanto a via intrínseca como extrínseca ativam o Fator X. A amplificação da coagulação é um evento concomitante, pois uma vez que não se tenha alguns fatores de coagulação como o Fator V, o Fator X pode produzir traços de trombina a partir de protrombina, dessa maneira também causando a ativação consecutiva dos Fatores V, VIII e IX. O processo de amplificação é um dos mais importantes para promover o aumento na produção de trombina por meio de comunicação intracelular pela ativação do FV ou por meio de receptores acoplados à proteína G (GPCR). (SANG *et al.*, 2020) (Figura 4).

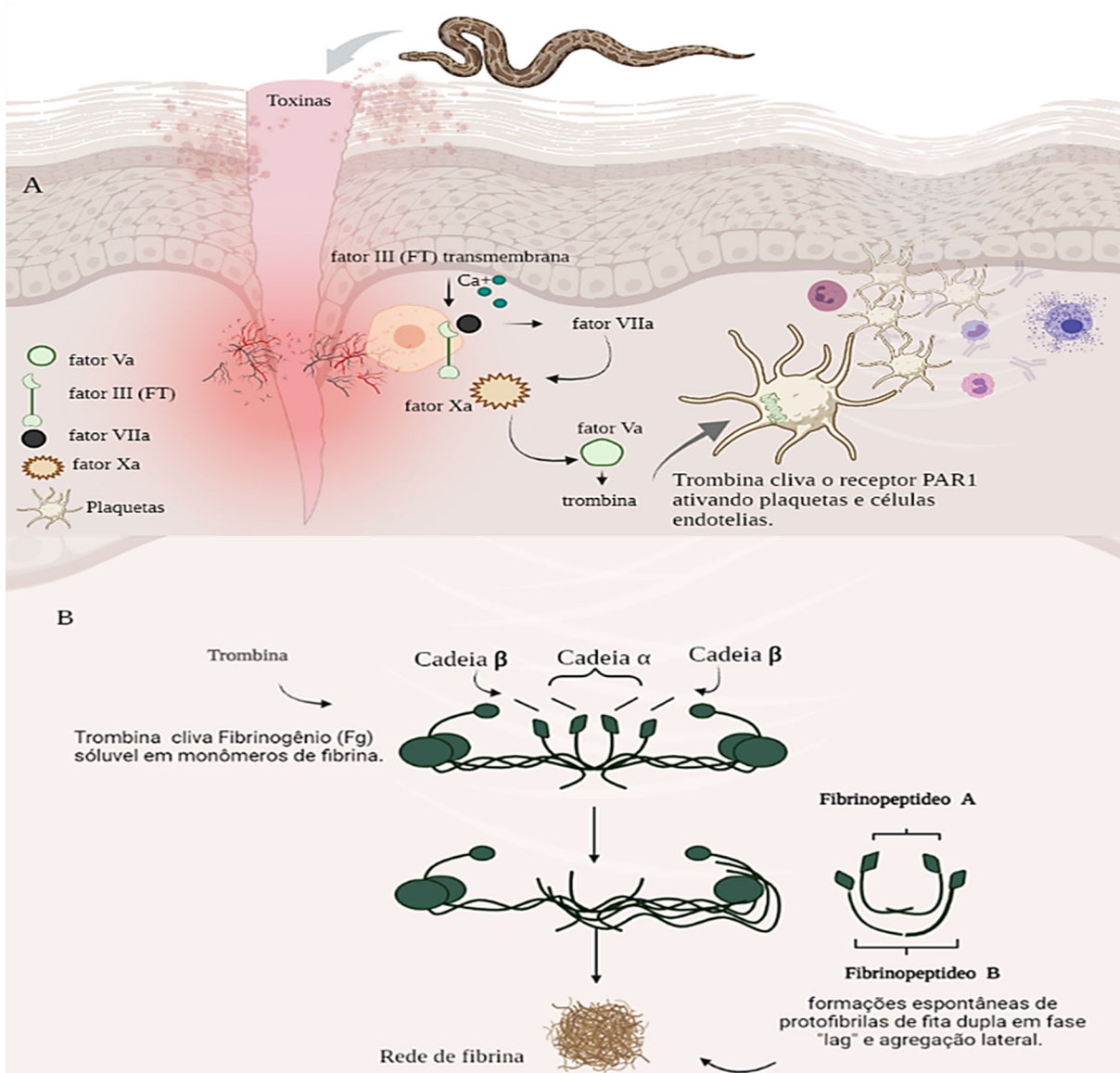


Figura 2. A via extrínseca da cascata de coagulação. A lesão tecidual expõe o FIII ao plasma sanguíneo. A ativação da cascata se dá por ativação do FVII, FX e FV para a mediação de outros agentes coagulantes. A ativação do fator Va gera FII, que logo se converte em trombina. A trombina recém-formada estimula receptores de membranas de plaquetas e células endoteliais, ativando o sistema complemento e conversão do FI (fibrinogênio) em fibrinopeptídeos A e B e formando a rede de fibrina. Ilustração da autora.

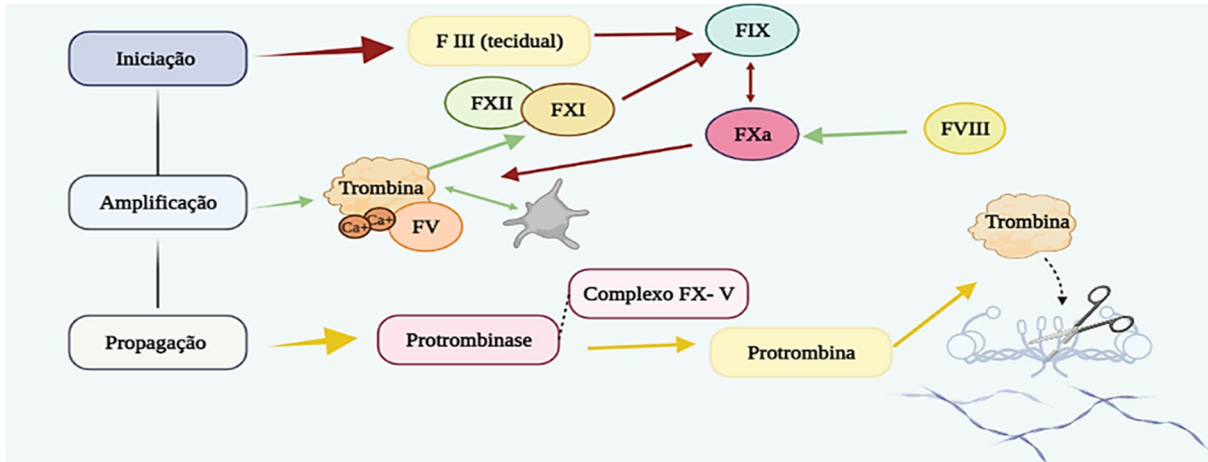


Figura 3. Fases de iniciação (setas vermelhas), amplificação (setas verdes) e propagação (setas amarelas) da cascata de coagulação. Ilustração da autora.

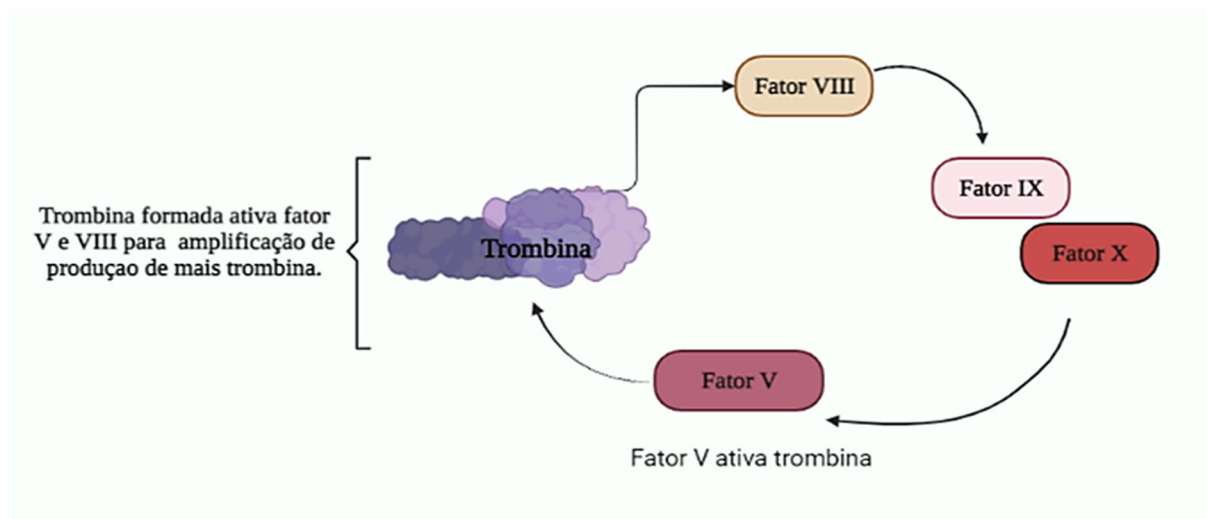


Figura 4. A amplificação da produção de trombina (via extrínseca) intermediada pelos fatores de coagulação VIII, IX, X e V. Ilustração da autora.

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) são constituídos em 4 membros (PAR 1-4) que realizam clivagem proteolítica de caráter irreversível, desacoplando ligantes da região N-terminal do mesmo receptor, ativando-o através de ligações intramoleculares que acionam a sinalização transmembranar. São agonistas tendenciosos, onde vários ligantes promovem diferentes respostas de sinalização e que ativam os mesmos receptores (CHANDRABALAN *et al.*, 2021). Estão amplamente distribuídos em células de vasos sanguíneos, plaquetas, neutrófilos e macrófagos, suscitando um perfil de expressão de proteases em vários campos fisiológicos, principalmente na coagulação, câncer e na resposta inflamatória. Originalmente, o PAR1 é identificado como receptor de trombina em plaquetas, ou por múltiplas proteases que pode variar na localização dos receptores, como os cofatores de cada protease (HAN *et al.*, 2020). O PAR1 é ativado por concentrações nanomolares de trombina, ativando principalmente os fatores X e VII (SANG *et al.*, 2020).

A resposta é intermediada por fosfolipase C β (PLC β), fosfatidilinositol com formação de inositol-1,4,5- trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) com a finalidade de ativar proteínas quinase (PKC). Esse processo desempenha a produção de integrinas, disseminando a produção de grânulos e principalmente de plaquetas que, enfim, desenvolvem uma resposta de agregação plaquetária (SANG *et al.*, 2020) (Figura 5).

O último processo da coagulação se dá pela degradação do coágulo de fibrina pelo sistema fibrinolítico sob ação de plasmina derivada do plasminogênio, uma pró-enzima inativa podendo ser ativado por plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) que possui alta afinidade pela fibrina que desempenha a fibrinólise intravascular, ou plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) que admite atividade em superfície de células operando em ação proteolítica da plasmina. A plasmina tem

a incubência de degradar a fibrina, apesar de sua importância para esse processo, apresenta baixa especificidade com relação ao substrato, e quando de forma livre no sangue degrada várias proteínas (fibrinogênio, fator V, VIII), nesse caso, o plasma apresenta outra proteína para inibir plasmina de forma rápida, alfa-2-antiplasmina (COLLEN, 1986).

Em resposta à trombina, as células endoteliais promovem a liberação de tPA, assim têm-se a ativação de plasmina em grande quantidade, essas, podem degradar fibrina como também outras proteínas em pequenos fragmentos, e os produtos degradados apresentam uma resposta anticoagulante. Isto ocorre pois os produtos formados para degradar fibrina passam a degradar trombina, impedindo a formação de fibrinogênio e, conseqüentemente, inibindo a formação de coágulos de fibrina (DUKE, 2003).

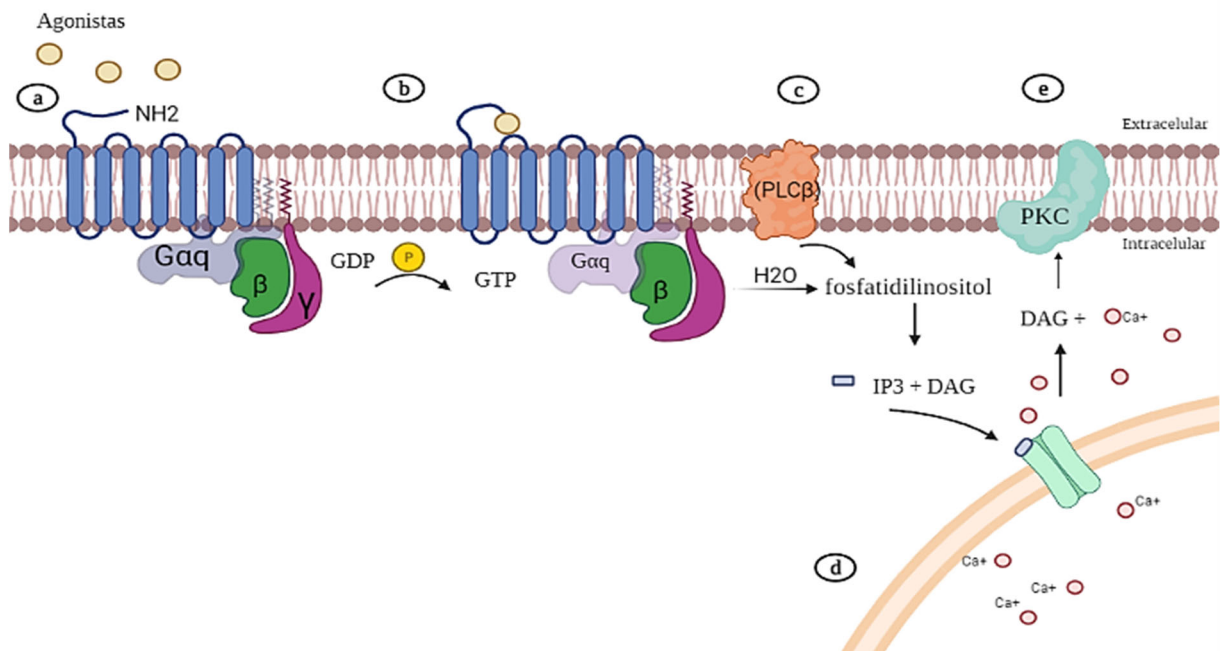


Figura 5. Representação esquemática de receptores acoplados à proteína G (em azul). Exibição de receptores ativados por proteases PAR1. A sinalização é iniciada por meio de uma protease agonista no receptor PAR1. A ativação induz ganho de fosfato formando guanosina trifosfato (GTP) a fim de estimular a subunidade Gαq. Ativado, forma-se o intermediário N-terminal agonista em que se liga em outro receptor de trombina que induz a sinalização intracelular (b). Este dinamismo ativa fosfolipase C β (PLCβ), que forma uma molécula de fosfatidilinositol, logo passa por um processo de hidrólise dissociando em duas moléculas: inositol-1,4,5- trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (c). O IP3 liga-se a receptores de proteínas transmembrana do *retículo endoplasmático* (d) que logo promove a liberação de íons Ca²⁺ que se unem com o DAG para ativar proteínas quinase (e). As proteínas-quinase promovem a ativação para agregação plaquetária. Ilustração da autora.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabelecer um protocolo padrão para a quantificação da atividade coagulante do veneno usando como padrão o veneno de *Bothrops moojeni*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus*.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer a concentração mínima coagulante em venenos de *Bothrops moojeni*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops alternatus*, e *Crotalus durissus* por meio da dosagem de proteínas para ambos os métodos estudados.
- Efetuar ambos os métodos sob condições semelhantes e conforme os parâmetros autorais;
- Comparar a sensibilidade, rapidez e complexidade de ambos os métodos;
- Comparar estatisticamente se existem diferenças significativas entre os resultados obtidos através do emprego dos métodos de Sanchez *et al.* (1992) e de O’Leary e Isbister (2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostra de veneno

Foram utilizados venenos (pool) homogeneizados e liofilizados das espécies *Bothrops moojeni*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus* do banco de venenos do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da PUC-GO. As amostras foram diluídas em PBS e submetidas à dosagem de proteínas.

3.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada mediante o método de Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão comparativo. Primeiramente, foi feita uma diluição seriada. De acordo com o método, a quantificação de proteína foi avaliada pela interação do reagente com a concentração de proteína total em cada dosagem. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.3. Atividade coagulante pelo método de Sánchez *et al.* (1992)

Alíquotas de veneno (200 μ L) diluídas em diferentes concentrações (1, 62,5; 125, 250 e 500 μ g/ml) foram adicionadas ao plasma humano com PBS (diluição 1:1 v/v). A atividade coagulante foi medida em dose mínima coagulante, onde foi definida a quantidade de veneno (μ g/mL) capaz de coagular o plasma em 60s. A coagulação foi verificada a olho nu registrando-se o tempo de coagulação manualmente. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.4. Atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010)

Soluções-estoque de venenos e plasma do tipo O, Rh⁺ de um único indivíduo foram preparados e incubados a 37°C e, em seguida, alíquotas de veneno (100 μ L) diluídas em série foram adicionadas a 100 μ L de plasma. A coagulação foi medida por espectrometria a 340 nm e o tempo foi registrado quando houve o aumento de 0,02 unidades de absorbância. A atividade coagulante foi determinada com o encurtamento do tempo de coagulação. O ensaio foi realizado em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a importância da padronização dos métodos, presume-se que os efeitos dos distúrbios de coagulação promovidos pelos venenos são afetados por diversas variáveis de difícil controle, tais como a resposta particular de cada indivíduo exposto às toxinas e variação individual, sazonal, ontogenética e sexual do veneno das serpentes. Desta forma, procuramos demonstrar, em condições controladas de reação, a eficiência e congruência comparada entre estes métodos de avaliação de atividade coagulante.

4.1. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína pelo método de Bradford (1976) foi realizada observando-se condições iguais de manuseio e temperatura, a partir de solução-estoque de concentração inicial de 1 $\mu\text{g/ml}$ dos venenos e diluição seriada, obtendo-se a concentração final de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ para os venenos *B. moojeni*, *B. alternatus* e *C. durissus*. A concentração final para o veneno de *B. pauloensis* foi de 31,25 $\mu\text{g/ml}$, pois a atividade coagulante é mais intensa que as demais espécies em estudo. A utilização deste método é fundamental pela necessidade de se estabelecer uma concentração de melhor sensibilidade para descrever a coagulação com venenos de serpentes com quantidades dentro da curva padrão (Figura 6). As concentrações médias da dosagem de proteínas foram utilizadas como base do cálculo para a expressão em $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 1). O método foi realizado em triplicata para confirmação de harmonia entre os resultados obtidos.

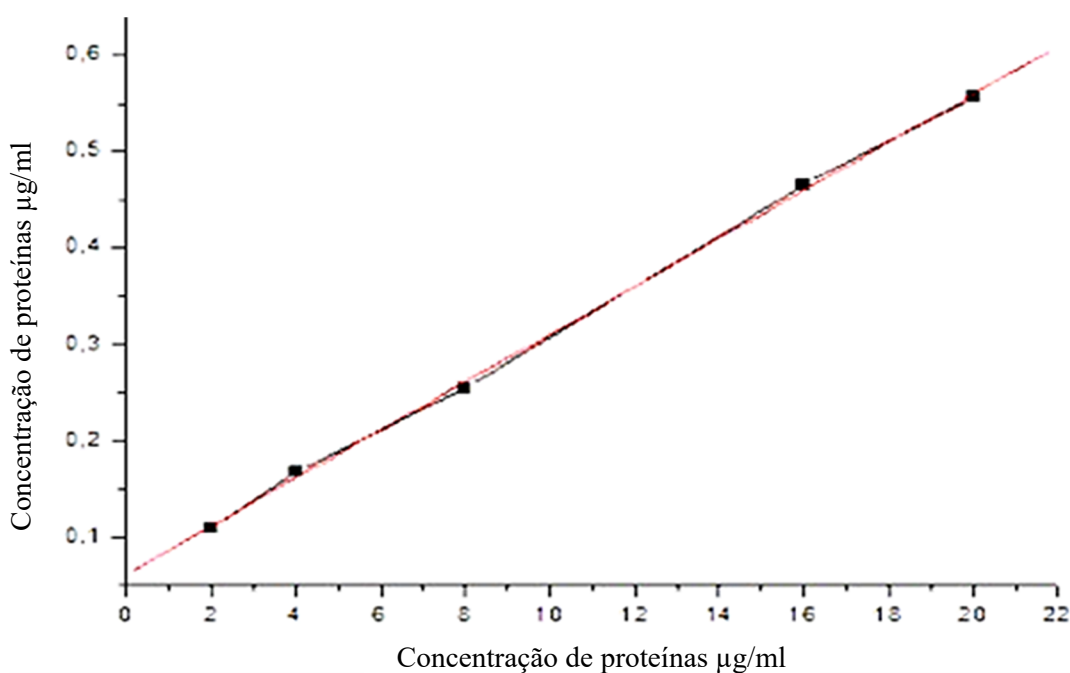


Figura 6 - Curva padrão da dosagem da albumina. No eixo horizontal é expressa a absorvância aferida em unidades de absorvância (UA) e no eixo vertical a concentração de proteínas em $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 1 - Descrição da quantificação de proteínas pelo método proposto por Bradford (1976). Valores da curva padrão onde foram obtidos os seguintes resultados em triplicata.

Concentração	1µg/ml	500 µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
Absorbância	0,267 UA	0,181 UA	0,163 UA	0,160 UA	0,125 UA
	0,237 UA	0,317 UA	0,142 UA	0,111 UA	0,149 UA
	0,157 UA	0,150 UA	0,113 UA	0,140 UA	0,136 UA
\bar{X}	0,220 UA	0,216 UA	0,139 UA	0,137 UA	0,137 UA

4.2. Ensaio coagulante pelo método de Sánchez *et al.* (1992)

Efetuando-se o método de Sanchez *et al.* (1992) em triplicata, sua acurácia, sensibilidade e eficiência foram avaliadas. Os resultados obtidos dessa forma são expressos e sistematizados na Tabela 2. Neste método, a leitura a olho nu não mostrou precisão devido a incapacidade de se observar o início da formação de protofibrilas (fase “lag”) e por promover uma visão insatisfatória da formação de fibrina dentro nos tubos, o que ocasionou uma contagem de tempo imprecisa. A concentração de 1µg/ml, por exemplo, mostrou-se altamente eficaz para coagular o sangue em menos de 30 segundos, porém atrasando cerca de 13 segundos em comparação ao método de O’Leary & Isbister (2010).

Tabela 2. Tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de Sanchez *et al.* (1992) em venenos de *Bothrops moojeni*. O ensaio foi realizado em triplicata em tubos de ensaio contendo plasma e veneno diluído e o tempo de coagulação foi medido com base na observação da formação de rede de fibrina com uma pipeta automática.

Concentração	0µg/ml*	1µg/ml	500 µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
Tempo (s)	237	30	40	53	75	99
	204	30	37	49	65	99
	262	28	39	53	67	95
\bar{X}	234,3	29,3	38,7	51,7	70,3	97,7

4.3. Ensaio coagulante pelo método de O’Leary e Isbister (2010)

Da mesma forma que para o método anterior, a sensibilidade, acurácia e eficiência do método de O’Leary & Isbister (2010) foi avaliada realizando-se o teste em triplicata (Tabelas 3, 4, 5 e 6). A contagem do início da coagulação se deu pelo início do aumento da absorbância demonstrada pelo espectrofotômetro. O método O’Leary e Isbister (2010) mostrou-se conveniente para descrever o tempo da atividade coagulante. Contudo, a leitura no espectrofotômetro em 340 nm, conforme sugerido originalmente, foi impraticável devido a coloração amarelada do plasma.

O plasma sanguíneo do indivíduo em jejum prolongado é mais translúcido, e talvez essa fosse a característica do plasma utilizado na concepção original do teste. Já para indivíduos que não praticaram jejum anterior à coleta de sangue, o plasma encontra-se colorido (amarelado) por interferência das substâncias e derivados oriundos do processo digestório. Desta forma, o

método foi adaptado para que a leitura fosse observada em 540 nm, e, com esta adaptação obtivemos maior sucesso na execução desse teste.

Tabela 3. Descrição do tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010) em venenos de *Bothrops moojeni*. O ensaio foi realizado em triplicata em cubetas contendo plasma e veneno diluído em PBS nas concentrações designadas da dosagem de proteínas, o tempo de coagulação foi medido em 540nm com o aumento disparado da leitura, indicando coagulação total do plasma.

Concentração	0µg/ml*	1µg/ml	500 µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
	2785	18	38	38	61	70
Tempo (s)	189	18	32	39	56	66
\bar{X}	209,7	16,3	28,3	38	54,7	67,3

Tabela 4. Descrição do tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010) em venenos de *Bothrops pauloensis*. O ensaio foi realizado em triplicata em cubetas contendo plasma e veneno diluído em PBS nas concentrações designadas da dosagem de proteínas, o tempo de coagulação foi medido em 540nm com o aumento disparado da leitura, indicando coagulação total do plasma.

Concentração	1µg/ml	500 µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml	31,25µg/m
	16	21	24	28	39	55
Tempo (s)	13	18	24	22	38	53
	13	20	18	26	38	43
\bar{X}	14	19,7	22	25,3	38,3	50,3

Tabela 5. Descrição do tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010) em venenos de *Bothrops alternatus*. O ensaio foi realizado em triplicata em cubetas contendo plasma e veneno diluído em PBS nas concentrações designadas da dosagem de proteínas, o tempo de coagulação foi medido em 540nm com o aumento disparado da leitura, indicando coagulação total do plasma.

Concentração	1µg/ml	500 µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
	17	23	27	34	53
Tempo (s)	20	20	24	36	51
	19	22	29	39	53
\bar{X}	18,7	21,7	26,7	36,3	52,3

Tabela 6. Descrição do tempo (segundos) da atividade coagulante pelo método de O'Leary e Isbister (2010) em venenos de *Crotalus durissus*. O ensaio foi realizado em triplicata em cubetas contendo plasma e veneno diluído em PBS nas concentrações designadas da dosagem de proteínas, o tempo de coagulação foi medido em 540nm com o aumento disparado da leitura, indicando coagulação total do plasma.

Concentração	1µg/ml	500 µg/ml	250µg/ml	125µg/ml	62,5µg/ml
	40	36	46	64	126
Tempo (s)	20	43	40	63	140
	26	30	42	70	129
\bar{X}	28,7	36,3	42,7	65,7	131,7

Outro aspecto a ser considerado nesse método é que o aumento de 0,02 de absorvância observado na atividade coagulante pode significar pouca ou nenhuma concentração de protofibrilas. Uma vez que observou-se que um incremento de apenas 0,02 UA era sucedido por um breve período (alguns segundos) de estabilidade e, somente após essa fase, a rápida ascensão da absorvância é verificável.

Sugerimos portanto que um acréscimo tão pequeno como 0,02 UA deve ser considerado como “ruído de fundo” nesse teste conforme praticado neste trabalho. Pode inclusive ter sido causado pela própria turbulência causada pela injeção do veneno na cubeta. Desta forma,

sugerimos iniciar a contagem de tempo para a mensuração da atividade a que o teste se presta somente após a ultrapassagem de 0,02 UA no incremento da absorbância (Figura 7).

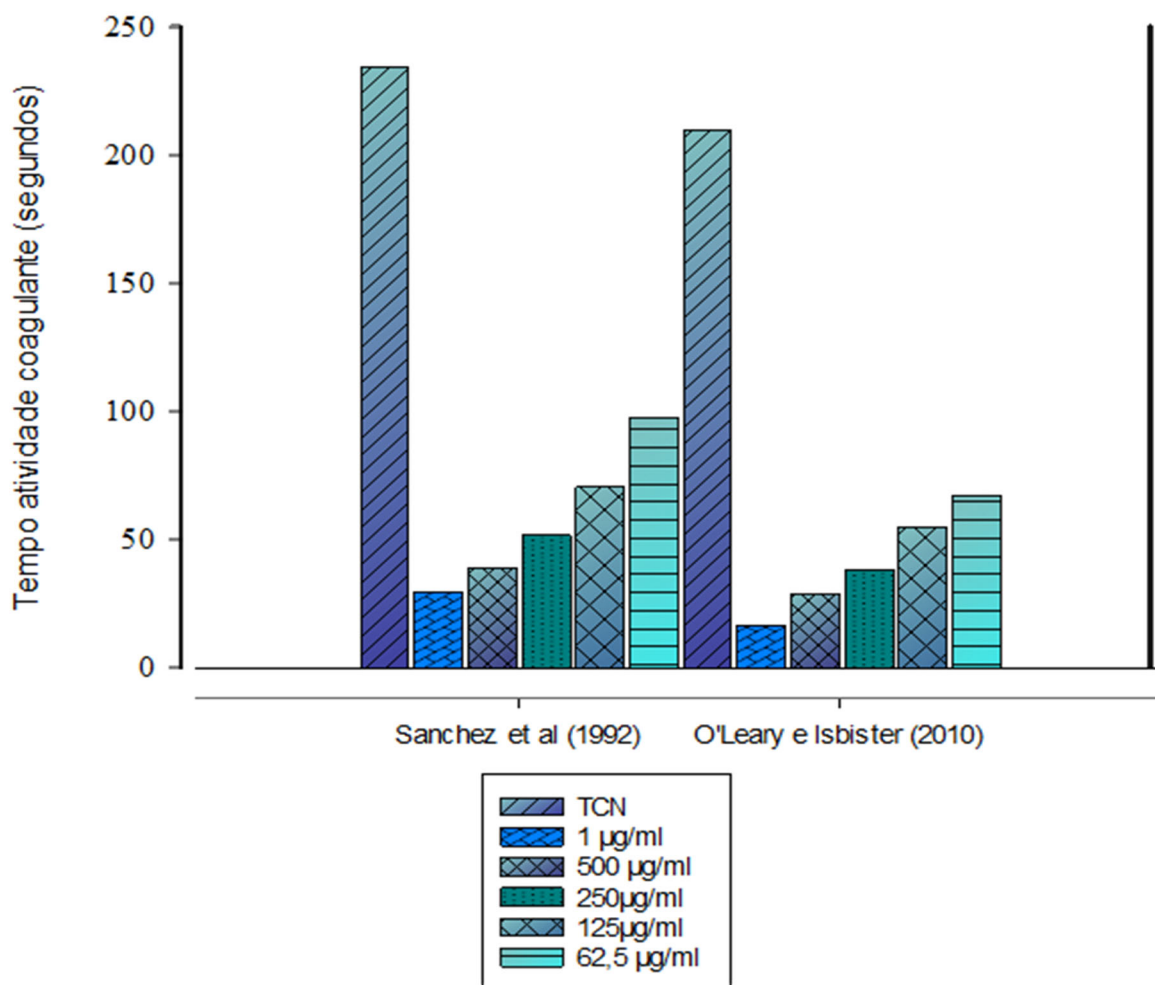


Figura 7. Análise comparativa dos métodos de atividade coagulante com veneno de *Bothrops moojeni*. Em azul escuro representa o tempo de coagulação normal (TCN) seguido das concentrações utilizadas. A média do menor tempo de coagulação foi de 29,3 s e o maior de 234,3 s para o protocolo de Sanchez *et al* (1992) e a média do menor tempo de coagulação para o protocolo O'Leary e Isbister (2010) foi 16,33 e o maior 209,7.

O resultado obtido em resposta à atividade coagulante com *Bothrops pauloensis*, demonstraram que vários processos metabólicos influenciam na formação da estrutura final do coágulo de fibrina. Nisto, foi possível observar que ao final da formação do coágulo, demonstrou uma aparência mais densa e sem a formação de uma borda líquida quando comparado ao coágulo com veneno de *Crotalus durissus* (Figura 8A), o tempo que levou para coagular foi maior e o coágulo formado apresentou uma forma gelatinosa pouca estabelecida, com delineamento aquoso mostrando um coágulo denso apenas no centro (Figura 8B). Para tanto, pode-se observar que, a ativação de fatores de coagulação específicos como o V, X são extremamente importantes, pois o FV pode acelerar a formação de trombina e o FX ativa a via

comum podendo justificar a precisão na descrição final do coágulo em um curto período de tempo.

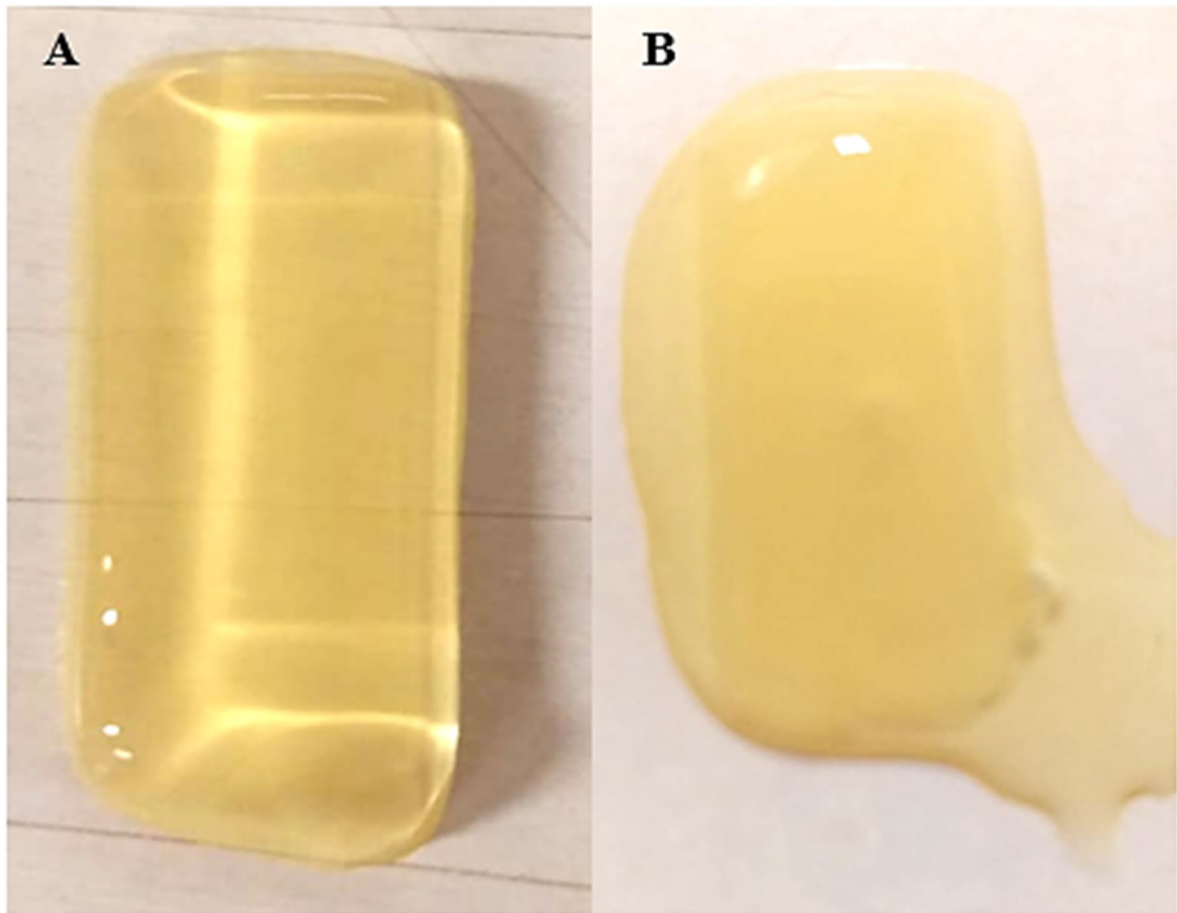


Figura 8. Coágulo de fibrina retirado da cubeta. (A): Veneno de *Bothrops pauloensis*; (B): Veneno de *Crotalus durissus*.

Outros aspectos a serem observados após o consumo de fibrinogênio é a escassez nos estoques de no organismo que pode provocar eventos hemorrágicos. Além dessa complicação, existem vários eventos que tornam maior a complexidade da ação de proteases. A existência de trombos limita a circulação em tecidos musculares configurando má regeneração tecidual e consequentemente mionecrose local, como também induz a amplificação da resposta inflamatória (LARRÉCHÉ *et al.*, 2021).

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a quantidade mínima para coagular o sangue em 60 segundos com venenos de espécies do gênero *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* é de 125µg/ml, 33,25µg/ml para *Bothrops pauloensis*, 62,5µg/ml para *Bothrops alternatus*. O protocolo mais apropriado para o estudo da coagulação revelou-se ser o teste de O'Leary e Isbister (2010) modificado no comprimento de onda da leitura espectrofotométrica e condições aqui propostas.

A padronização do método possibilitou um meio preciso e de fácil aplicabilidade para identificar o tempo de coagulação.

A leitura da absorbância no comprimento de onda 340 nm, conforme sugerido originalmente, é comprometida pela coloração do plasma. Nessas condições de coloração, o uso do comprimento de onda de 540 nm mostrou-se uma alternativa viável para superar essa limitação.

Um acréscimo tão pequeno quanto 0,02 UA na leitura pode indicar diferentes interferências na amostra, como a interação entre componentes do plasma, formação de bolhas no manuseio da amostra, turbulência transitória pela inoculação do reagente ou mesmo erro de leitura, uma vez que se trata de limite de sensibilidade do espectrofotômetro utilizado.

A contagem do tempo de coagulação, pelo motivo exposto acima, deve iniciar-se somente após a ultrapassagem do aumento de 0,02 UA da amostra por se tratar de um meio rico em proteínas, o tempo de coagulação se inicia a partir do momento em que há um disparo na absorbância de forma rápida bastante perceptível.

O consumo induzido de fibrinogênio no organismo gera não só coagulação como também hemorragia, pois, uma vez que o estoque de fibrinogênio torna escasso, o sangue torna-se incoagulável, desta forma, a padronização de um método preciso e específico para avaliar o tempo de coagulação torna-se necessário sendo uma grande ferramenta para estudos na área. A análise de variância realizada entre os dois métodos apresentou distribuição normal e também diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR W.S; GALIZIO, N.C; SILVA, C.S; SANT'ANNA, S. S; GREGO, K.F; TASHIMA, A.K; Nishiduka, E. S; ZANI, K.M; AZEVEDO, A. M.T. Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. **PloSone**, n. 9 v. 14, , 2019.
- AMORIM, F. G.; MENALDO, D. L.; CARONE, S. E. I.; SILVA, T. A.; SARTOM, E. P.; QUINTON, L.; SAMPAIO, S. V. et al. New insights on Moojase, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxins**. Novos insights sobre a moojase, uma serina protease semelhante à trombina do veneno da cobra *Bothrops moojeni*. **Toxins**, v. 10, n. 12, P.1-19, 2018.
- BITTENCOURT, N. C.; SANTOS, P. N. Avaliação das provas da hemostasia primária em indivíduos atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, n. 2, p. 144–148, 2016. **Brazilian Journal of Clinical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 144-8, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248–254, 1976.
- BRASIL. Sistema de informação de agravos de notificação. **SINAM**, 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>.
- BRASIL. Soros e vacinas do **Butantan**. **Instituto Butantan** 1 ed. São Paulo, p.24, 2018.
- CHANDRABALAN, A.; RAMACHANDRAN, R. Molecular mechanisms regulating Proteinase-Activated Receptors (PARs). **The Federation of European Biochemical Societies FEBS Journal**, v. 288, n. 8, p. 2697–2726, 2021.
- COLLEN, D. Molecular mechanisms of fibrinolysis and their application to fibrin-specific thrombolytic therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 77–86, 1987.
- DUKE, James. Segredos em anestesiologia. 2ª edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2003.
- GIMENEZ, B.T.; CEZARETTE, G.N. BOMFIM, A.S.; MONTEIRO, W.M.; RUSSO, B.M.S.; FRANTZ, F. G; SAMPAIO, S. V. SARTIM, M.A. Papel da crotoxina na coagulação: novos insights sobre os mecanismos anticoagulantes e comprometimento da coagulação induzida por inflamação. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases** , v. 26, 2020.
- GRIMALDO-GÓMEZ, F. A.; Fisiología de la hemostasia. **Revista Mexicana de Anestesiología**, v. 40, n. S2, p. 398-400, 2017.
- HATAKEYAMA, D. M. TASIMA, L. J.; GALIZIO , N.C.; SILVA , C. S.; RODRIGUES, C. F.B.; STUGINSKI.; D.R. SANT'ANNA , S. S.; GREGO, K. F. TASHIMA , A. K.; NISHIDUKA, E.S.; MORAIS-ZANI, K.; TANAKA , A. A. Do nascimento à idade adulta: uma análise do veneno da jararaca (*Bothrops moojeni*) em diferentes fases da vida. **PloSone**, v. 16, n. 6. 2021.
- HEUBERGER, D. M.; SCHUEPBACH R. A. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. **Thrombosis journal**, v. 17, n. 1, p. 1-24, 2019.
- HSIANG, A. Y.; FIELD , D. J.; WEBSTER , T. H.; BEHLKE, A. D.B.; DAVIS, M. A.B.; RACICOT, R. ; GAUTHIER J. A. The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. **BMC evolutionary biology**, v. 15, n. 1, p. 1-22, 2015.
- HOFFBRAND, A. V. Fundamentos em Hematologia. 6. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2013.
- ISBISTER, Geoffrey K. Procoagulant snake toxins: laboratory studies, diagnosis, and understanding of snakebite coagulopathy. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. © **Thieme Medical Publishers**, p. 93-103, 2009.
- KOUPENOVA, M.; KEHREL, B.E.; CORKREY, H.A.; FREEDMAN, J.E. Thrombosis and platelets: **Jornal europeu do coração** , v. 38, n. 11, pág. 785-791, 2017.
- LARRÉCHÉ, S.; CHIPPAUX, J.P.; CHEVILLARD, L.; MATHÉ, S.; RÉSIÈRE, D.; SIRGURET, V.; MÉGARBANE, B. . Sangramento e trombose: insights sobre a fisiopatologia dos distúrbios de hemostasia relacionados ao veneno de botrópia. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 22, n. 17, pág. 1-26, 2021.
- LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; HERRERA, M. V.; SEGURA M.; ESTRADA, R.; Gutiérrez , M.J. Immune Response Towards Snake Venoms. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Anteriormente Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)** (Descontinuado) v. 10, n. 5, p. 381-398, 2011.
- MACKESSY, Stephen P. Handbook of venoms and toxins of reptiles. **CRC press**, P.1-548 2010.
- O'LEARY, Margaret A.; ISBISTER, Geoffrey K. A turbidimetric assay for the measurement of clotting times of procoagulant venoms in plasma. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 61, n. 1, p. 27-31, 2010.
- SANG, Y.; ROEST, M. B. L.; GROOT, P. G.; HUSKENS, D. Interação entre plaquetas e coagulação. **Blood Reviews**, v. 46, p. 1-11, 2020.
- SARTIM, M.A.; COSTA, T. R.; LAURE, H. J.; ESPÍNDOLA M, S.; FRANTZ, F. G.; SORGI, C. A.; CINTRA A. C. O.; ARANTES ,E. C.; FACCIOLI, L. H.; ROSA , J. C.; SAMPAIO, S. V. Moojenactivase, a novel

- pro-coagulant PIIIId metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 5, p. 1261-1278, 2016.
- SIDELMANN, Johannes J .; Kluft, Cornelis; Krug, Andrea; Winkler, Ulrich; Jespersen, Jørgen; Gram, Jørgen. Estrutura do coágulo de fibrina - efeito pró-fibrinolítico de anticoncepcionais orais em mulheres aparentemente saudáveis. **Thrombosis and Haemostasis**, 117 (4), 700–705.
- SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. The humoral immune response induced by snake venom toxins. **Inflammation & Allergy-Drug Targets** (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy) (Discontinued),, v. 10, n. 5, p. 343–357, 2011.
- SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L. VELARD, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIR, M.N.; AGOSTINE-COTTA, G.; DINZ, C.R. Atividades biológicas de venenos de cobras sul-americanas. **Toxicon**, v. 30, n. 1, pág. 95-103, 1992.
- SLAGBOOM, J.; KOOL, J.; HARRISON, R.A.; CASEWELL, N. R.. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British journal of haematology**, v. 177, n. 6, p. 947-959, 2017.
- SOUSA, L.F.S.; ZDENEK, C.N.; DOBSON, J. S.; BROUW, B.O.; COIMBRA, F.; GILLET, A.; DEL-REI, T. H.M.; CHALKIDIS, H.M.; SANT’ANNA, S.; TEIXEIRA-DA-ROCHA, M.M.; GREGO, K.; CARDOSO, S.R.T.; SILVA, A. M. Ana M.; FRY, B. G. Coagulotoxicity of *Bothrops* (lancehead pit-vipers) venoms from Brazil: Differential biochemistry and antivenom efficacy resulting from prey-driven venom variation. **Toxins**, v. 10, n. 10, p. 411, 2018.
- TEIXEIRA, C.; FERNANDES, C.M.; LEIGUEZ, E. TAVASSI, A.M.C. Inflamação induzida por venenos de serpentes viperídeos ativadores de plaquetas: perspectivas sobre a tromboinflamação. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2082, 2019.
- VIDAL, N.; DELMAS, A.S.; DAVID, P.; CRUAUD, C.; COULOUX, A.; HEDGES, S.B. A filogenia e classificação de cobras caenofidianas inferidas a partir de sete genes codificadores de proteínas nucleares. **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, n. 2, p. 182-187, 2007
- VALENTE, H. R; FERNANDA, S.; JOSÉ, J.P; VIANA, L. G; CARNEIRO, S. C; PERALES, J.; YAMANOUYE, N. The Primary Duct of *Bothrops jararaca* Glandular Apparatus Secretes Toxins. **Toxins**, 2018.
- WOLBERG, Alisa S.; CAMPBELL, Robert A. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 38, n. 1,



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
Av. Universitária, 1069 | Setor Universitário
Caixa Postal 86 | CEP 74605-010
Goiânia | Goiás | Brasil
Fone: (62) 3946.1020 ou 1021 | 0
www.pucgoias.edu.br | prograd@pucgoias.edu.br

RESOLUÇÃO n°038/2020 – CEPE

ANEXO I APÊNDICE ao TCC

Termo de autorização de publicação de produção acadêmica

A estudante **Danielle Santos Ribeiro** do Curso de **Bacharelado em Ciências Biológicas**, matrícula **20181005001171**, telefone: **(62)993786275** e-mail **daniellesantos_5@hotmail.com**, na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei n° 9.610/98 (Lei dos Direitos do autor), autoriza a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) a disponibilizar o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **Otimização e padronização de protocolo de quantificação de atividade coagulante de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (serpentes: viperidae)**, gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, por 5 (cinco) anos, conforme permissões do documento, em meio eletrônico, na rede mundial de computadores, no formato especificado (Texto (PDF); Imagem (GIF ou JPEG); Som (WAVE, MPEG, AIFF, SND); Vídeo (MPEG, MWV, AVI, QT); outros, específicos da área; para fins de leitura e/ou impressão pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada nos cursos de graduação da PUC Goiás.

Goiânia, 01 de dezembro de 2021.

Danielle Santos Ribeiro

Danielle Santos Ribeiro, autora.

Dr. Matheus Godoy Pires, orientador.