

POTENCIAL TROMBOLÍTICO DE ENZIMAS MICROBIANAS: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE TROMBOSE

Data de aceite: 01/04/2024

Lillian Maria Baggio

Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/8342395413264972>

Edna Suzana Antônio Jinga

Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/9921798754730508>

Hyan Gabriel Barbosa da Costa

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/8364272149071130>

Antonio Carlos da Silva Vieira

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/7955697812306668>

Nubia Natalia Lopes Cardoso

Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/7029365038336595>

Cristiani Baldo

Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia
Universidade Estadual de Londrina
Londrina – PR
<http://lattes.cnpq.br/7405984333346151>

RESUMO: Doenças cardiovasculares associadas à trombose são uma das principais causas de morte em todo mundo. A uroquinase, estreptoquinase e o ativador do plasminogênio tecidual são os principais agentes trombolíticos utilizados no tratamento da trombose. Esses agentes têm sido utilizados amplamente na clínica médica. Porém, fatores como meias-vidas curtas, custos elevados de produção e complicações hemorrágicas tem impulsionado a busca de compostos mais seguros e economicamente viáveis para o tratamento de doenças cardiovasculares. Neste contexto, as enzimas fibrinolíticas e fibrinogenolíticas secretadas por microrganismos são alternativas promissoras, pois promovem a degradação direta dos trombos e não induzem efeitos colaterais, além de possuírem baixo custo de produção. Neste capítulo, exploraremos o potencial das enzimas fibrinolíticas e fibrinogenolíticas secretadas por microrganismos como alternativas promissoras no tratamento de doenças cardiovasculares associadas à trombose, destacando sua capacidade de degradação direta dos trombos, ausência de efeitos colaterais e custos de produção reduzidos.

PALAVRAS-CHAVE: fermentação, enzimas microbianas, doenças cardiovasculares

ABSTRACT: Cardiovascular diseases associated with thrombosis are one of the main causes of death in the whole world. Urokinase, streptokinase, and tissue plasminogen activator are the major thrombolytic agents used to treat thrombosis. These agents have been widely used in the medical clinic. However, factors such as short half-lives, high production costs and hemorrhagic complications have driven the search for safer and more economically viable compounds for the treatment of cardiovascular diseases. In this way, the fibrinolytic and fibrinogenolytic enzymes secreted by fungi promising alternatives, since they promote the direct degradation of the thrombi and does not induce side effects, besides having a low cost of production. In this chapter, we will explore the potential of fibrinolytic and fibrinogenolytic enzymes secreted by microorganisms as promising alternatives in the treatment of cardiovascular diseases associated with thrombosis, highlighting their ability for direct thrombus degradation, absence of side effects, and reduced production costs.

KEYWORDS: fermentation, microbial enzymes, cardiovascular diseases

INTRODUÇÃO

Enzimas microbianas desempenham um papel significativo na indústria farmacêutica, com destaque para a classe especial das proteases. Estas enzimas possuem a notável capacidade de degradar uma ampla variedade de substratos proteicos com alta especificidade. Enzimas produzidas por processos biotecnológicos apresentam diversas vantagens, tais como alta especificidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, além da obtenção por fontes renováveis. Entre essas enzimas, destacam-se as proteases trombolíticas, que são enzimas capazes de degradar substâncias plasmáticas como fibrina e fibrinogênio, podendo ser utilizadas como estratégia terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares. Assim, o foco deste capítulo é explorar biotecnológico de enzimas fibrinolíticas e fibrinogenolíticas secretadas por microrganismos como alternativas no tratamento de doenças cardiovasculares relacionadas à trombos, destacando suas propriedades biológicas e sustentáveis.

DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Doenças cardiovasculares são responsáveis causas de óbitos no Brasil, afetando desproporcionalmente pessoas com mais dificuldades em conseguir acesso a cuidados básicos de saúde (OLIVEIRA et al., 2021). No Brasil cerca de 14 milhões de pessoas apresentam algum tipo de doença cardiovascular tais como hipertensão, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio e a fibrilação atrial (STEVENS et al., 2017).

A taxa de mortalidade causada por distúrbios vasculares tais como enfarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose venosa profunda, embolia pulmonar tem crescido significativamente nos últimos anos. Em conjunto, essas doenças causam a morte de pelo menos 400 mil pessoas por ano (SBC, 2021; OLIVEIRA et al., 2021).

Terapias enzimáticas estão se tornando uma alternativa às cirurgias na prática clínica (SUN et al., 2016), e agentes trombolíticos são empregados para dissolver coágulos não hidrolisados (KUNAMNENI, ABDELGHANI, & ELLAIAH, 2007). Os coágulos de sangue, compreendendo na sua maioria coágulos de fibrina, são formados pela conversão do fibrinogênio em fibrina através da ação proteolítica da trombina e podem bloquear os vasos sanguíneos causando a trombose. No entanto, em pessoas saudáveis o sistema de coagulação encontra-se normalmente em estado de equilíbrio dinâmico, em que os coágulos de fibrina são constantemente depositados e dissolvidos. A dissolução dos trombos é chamada fibrinólise, que ocorre por ação de uma enzima chamada plasmina. A plasmina circulante encontra-se na forma de seu zimogênio inativo, o plasminogênio, é ativada a partir de compostos chamados ativadores do plasminogênio. No entanto, quando a fibrina não é hidrolisada, devido aos diferentes distúrbios hemostáticos, tais como doenças trombóticas podem ocorrer (HOLDEN, LAVIGNE, & CAMERON, 1990).

Existem três opções de terapia disponíveis para o tratamento da trombose: anticoagulantes, agentes antiplaquetários e enzimas fibrinolíticas. Os anticoagulantes são agentes químicos capazes de prevenir ou controlar a coagulação sanguínea. A maioria deles atua bloqueando uma ou mais etapas da cascata de coagulação que culmina na formação de fibrina. Alguns fármacos podem atuar também através da inibição da síntese de fatores de coagulação, enquanto outros aumentam a atividade anticoagulante que ocorre naturalmente no sangue ou previnem a formação do tampão plaquetário (ODÉN & FAHLÉN, 2002). Esses fármacos apresentam uma meia-vida reduzida e estão associados à diversos efeitos colaterais como hemorragias, osteoporose, alopecia, trombocitopenia e hipersensibilidade (FITZMAURICE, BLANN, & LIP, 2002). Os agentes antiplaquetários são usados para prevenir a formação do coágulo ou impedir que este se torne maior, provocando a oclusão dos vasos sanguíneos, atuando através da inibição do fator de ativação plaquetária e do colágeno. Porém o uso desses fármacos está associado a condições patológicas como a supressão da medula óssea, em particular à leucopenia (BLANN, LANDRAY, & LIP, 2002).

O fato dos anticoagulantes e agentes antiplaquetários possuírem meia vida curta, efeitos secundários indesejáveis (SIMKHADA et al., 2012), baixa especificidade além de preço elevado no processo produtivo tem motivado pesquisas na busca de compostos mais seguros e economicamente viáveis para o tratamento de doenças cardiovasculares (ERDUR et al., 2014).

ENZIMAS MICROBIANAS

As proteases são uma classe de enzimas com papéis fisiológicos importantes presentes em animais, plantas e microrganismos, já que possuem a função de catalisar, quebrar, as ligações peptídicas presentes nas proteínas. Enzimas fibrinolíticas e fibrinogenolíticas são proteases que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de outras proteínas (GUPTA, BEG, & LORENZ, 2002). As proteases microbianas também têm atraído grande atenção devido seu grande potencial biotecnológico e são muito usadas em preparações farmacêuticas (SOUZA et al., 2015). Essas enzimas representam cerca de 60% das vendas totais de enzimas no mundo (ZAMBARE, NILEGAONKAR, & KANEKAR, 2011).

Há uma vasta diversidade de organismos produtores de enzimas fibrinolíticas. Contudo, têm sido produzidas industrialmente por fungos (SHIRASAKA et al., 2012) e bactérias isolados de alimentos fermentados tradicionais orientais (CHANG et al., 2012).

As proteases podem ser classificadas de acordo com os valores ótimos de pH e incluem as proteases ácidas (pH 2,0 a 6,0), as proteases neutras (pH de 6,0 a 8,0) e as proteases alcalinas (pH 8,0-13,0) (SABOTIC & KOS, 2012). As proteases ácidas de importância comercial são geralmente produzidas por fungos filamentosos e são enzimas extracelulares empregadas na indústria de alimentos e farmacêutica (ALEKSIEVA & PEEVA, 2000). Alguns fungos são considerados GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) e eles produzem enzimas extracelulares, que são fáceis de recuperar do caldo fermentado (ZAFERANLOO et al., 2014).

No entanto, a utilização de enzimas obtidas por processos biotecnológicos frequentemente é limitada pelo alto custo de produção. Neste contexto, a otimização da produção de enzimas usando substratos de baixo custo tais como resíduos agroindustriais é importante do ponto de vista econômico, já que a matéria-prima representa grande parte dos custos de obtenção de moléculas microbianas (TANG et al., 2015). Nesse cenário, o uso de recursos de resíduos como meio de cultura para a produção de enzimas implica em soluções tecnológicas que auxiliam na gestão de resíduos em diversos setores, proporcionando o desenvolvimento de produtos de interesse nacional com características biodegradáveis e renováveis.

Pesquisas usando agentes trombolíticos diretos têm mostrado resultados encorajadores em testes laboratoriais e em ensaios pré-clínicos (MARDER & NOVOKHATNY, 2010). Nattoquinase, uma das proteases microbianas mais estudadas, é uma enzima fibrinolítica produzida por *Bacillus subtilis*. Esta enzima foi originalmente isolada do natto, um alimento fermentado tradicional japonês e está comercialmente disponível para o tratamento de trombose (FUJITA et al., 1993) e não apenas lisa diretamente os trombos *in vivo*, mas também pode aumentar a atividade fibrinolítica do plasma pelo aumento da atividade do fator de ativação do plasminogênio tecidual (Fujita et al., 1995a; Fujita et

al., 1995b). Desta forma, a nattoquinase pode ser usada para amenizar e tratar diversas patologias associadas aos sistemas cardiovascular e pulmonar, além de reduzir os efeitos graves de doenças como embolia pulmonar, trombose e até pode até realizar a regulação da pressão arterial. Além disso, ela pode prevenir trombozes profundas, aterosclerose e varizes (SOUZA et al., 2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A oclusão vascular continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Embora numerosos agentes trombolíticos tenham sido identificados e caracterizados a partir de fontes diversas, dados científicos promissores obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo* não conseguiram se traduzir com sucesso em ensaios clínicos. Portanto, esforços contínuos são necessários na busca por medicamentos trombolíticos mais eficazes, seguros e econômicos. Agentes trombolíticos de origem microbiana representam um passo em direção a uma abordagem potente na prevenção e tratamento de doenças vasculares, como doenças cardiovasculares. Várias enzimas trombolíticas foram relatadas como sendo isoladas de fontes microbianas com aplicação terapêutica em doenças vasculares e demonstraram possuir as seguintes vantagens em relação às estratégias de tratamento atualmente disponíveis: meia-vida plasmática prolongada, maior especificidade pela fibrina, menor resposta alérgica E menor risco de complicações hemorrágicas. Assim, as enzimas trombolíticas e fibrinolíticas isoladas de fontes microbianas poderiam impulsionar novas estratégias terapêuticas para avançar as perspectivas desses complexos de enzimas derivadas de microrganismos no arsenal terapêutico de medicamentos.

REFERÊNCIAS

ALEKSIEVA, P., & PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola Lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology** 26, 402-405, 2000.

BLANN, A.D., LANDRAY, M.J., & LIP, G.Y.H. ABC of antithrombotic therapy: an overview of antithrombotic therapy. **British Medical Journal**, 325(7367), 762-765, 2002.

CHANG, C.T., WANG, P.M., HUNG, Y.F., CHUNG, Y.C. Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean. *Food Chemistry*, v. 133, n. 4, p. 1611-1617, 2012.

ERDUR, H., SCHEITZ, J.F., TUTUNCU, S., FIEBACH, J.B., ENDRES, M., WERRING, D.J., & NOLTE, C.H. Safety of thrombolysis in patients with acute ischemic stroke and cerebral cavernous malformations, *Stroke*, 45, 1846-1848, 2014.

FITZMAURICE, D.A., BLANN, A.D., & LIP, G.Y.H. Bleeding risks of antithrombotic therapy. **British Medical Journal**, 325(7368), 828-831. 2002.

- FUJITA, M., HONG, K., ITO, Y., MISAWA, S., TAKEUCHI, N., KARIYA, K., & NISHIMURO, S. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 18(9), 1194-1196. 1995a.
- FUJITA, M., HONG, K., ITO, Y., FUJII, R., KARIYA, K., & NISHIMURO, S. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 18(10), 1387-1391, 1995b.
- FUJITA, M., NOMURA, K., HONG, K., ITO, Y., ASADA, A., & NISHIMURO, S. (1993). Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan. **Biochemical and Biophysical Research Communications**.197(3), 1340-1347.
- GUPTA, R., BEG, Q.K., & LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, 59(1), 15-32, 2002.
- HOLDEN, G.W., LAVIGNE, V.V., & CAMERON, A.M. Probing the continuum of effectiveness in parent training: Characteristics of parents and preschoolers. **Journal of Clinical Child Psychology**, 19, 2-8. 1990.
- KUNAMNENI, A., ABDELGHANI, T.T., & ELLAIAH, P. Streptokinase-the drug of choice for thrombolytic therapy. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, 23(1), 9-23, 2007.
- MARDER, V.J., & NOVOKHATNY, V. (2010). Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 8(3), 433-444, 2010.
- ODÉN, A., & FAHLÉN, M. Oral anticoagulation and risk of death: a medical record linkage study. **British Medical Journal** (Clinical research ed.), 325(7372), 1073-1075, 2002.
- OLIVEIRA, G. M. M. et al. Estatística Cardiovascular – Brasil. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 118, n. 1, 115-373, 2021.
- SABOTIC, J., & KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors-current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 93(4), 1351-1375, 2012.
- SHIRASAKA, N., NAITOU, M., OKAMURA, K., KUSUDA, M., FUKUTA, Y., TERASHITA, T. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, v. 53, n. 5, p. 354-364, 2012.
- SIMKHADA, J.R., CHO S.S., MANDER, P., CHOI, Y.H., & YOO, J.C. (2012). Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model. **Thrombosis Research**, 129(2), 176-182.
- SOUZA, P.M., BITTENCOURT, M.A., CAPRARA, C.C., FREITAS, M., ALMEIDA, R.P.C., SILVEIRA, D., MAGALHÃES, P.O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46, 337-346, 2015.
- STEVENS W.; BRYCE C.; SEALE B. CHEN C.CHOWDHURY R.; LEAL J.; LARSON H.; WILSON L.BAE J. P.; COX E.; GAZIANO T. A. Os custos das doenças cardíacas no Brasil. **International Journal of Cardiology** , v. 228 , p. 923-929, 2017.

SUN, Z., LIUA, P., CHENG, G., ZHANGA, B., DONGA, W., SUB, X., KONGB, Y. (2016). A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model. **International Journal of Biological Macromolecules**, 85, 346-354.

TANG, HB. . XU, Z. XU, C. XU, Z. XU, P. LEI, Y. QIU, J. LIANG, X. FENG. Conversion of agroindustrial residues for high poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2 via solid-state fermentation **Bioresource Technology**, 181 (2015), pp. 351-354.

ZAFERANLOO, B., QUANG, T.D., DAUMOO, S., GHORBANI, M.M., MAHON, P.J., & PALOMBO, E.A. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World journal of microbiology & biotechnology**, 30(6), 1755-1762, 2014.

ZAMBARE, V., NILEGAONKAR, S., & KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **New Biotechnology**, 28(2), 173-181, 2011.