



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PEDRO GABRIEL NASCIMENTO DOS SANTOS

**Avaliação da atividade oxidante das peçonhas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e
B. moojeni sobre hemoglobinas humanas**

João pessoa - PB

2019

PEDRO GABRIEL NASCIMENTO DOS SANTOS

Avaliação da atividade oxidante das peçonhas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre hemoglobinas humanas

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador

João Pessoa - PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237a Santos, Pedro Gabriel Nascimento dos.

Avaliação da atividade oxidante das peçonhas de
Bothrops alternatus, *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre
hemoglobinas humanas / Pedro Gabriel Nascimento dos
Santos. - João Pessoa, 2019.

36 f. : il.

Orientação: Daniela Priscila Marchi Salvador.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Ofidismo. 2. Oxidação. 3. Metahemoglobina. I.
Salvador, Daniela Priscila Marchi. II. Título.

UFPB/BC

PEDRO GABRIEL NASCIMENTO DOS SANTOS

Avaliação da atividade oxidante das peçonhas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre hemoglobinas humanas

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba

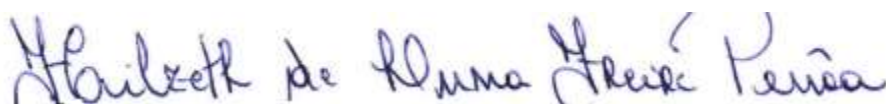
Data: 02/10/2019

Resultado: APROVADO (Nota 10)

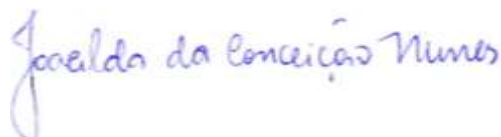
BANCA EXAMINADORA:



Orientadora: Profa. Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador



Avaliador: Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa



Avaliador: Profa. Dra. Joacilda da Conceição Nunes

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e em seguida a minha amada família, aos meus pais, Agatangelo Feitosa dos Santos e Edna Lima do Nascimento, e ao meu irmão Maike Felipe Nascimento dos Santos, por todo o apoio, ensinamento, paciência, cuidado e carinho ao longo dos anos.

A minha orientadora Prof. Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador, por me acolher como seu aluno e ter me orientado aos longos destes anos, e por ensinamentos, pelo cuidado e dedicação em mim durante todo esse tempo.

Agradeço aos meus amigos de turma do bacharel 2015.2 (Breno Falcão, Victor Spencer, Vitória Maria, Thuany Pehone, Letícia Costa, Lucca Sorrentino, Edson Santos, Erica Falcão, Alan Bruno e Awrystepfanya Maria) por serem as pessoas que me acompanharam de perto por ao longo dos anos, com quem compartilhei os meus momentos mais especiais, risadas, choros, estresses, por serem minha segunda família.

Agradeço aos meus amigos de licenciatura do 2015.2 (Amanda Vasconcelos, Rebeca Macedo, Thaciana Barreto e Karoline Soares) pela grande amizade formada e pelos excelentes momentos vividos.

Aos meus colegas de laboratório que passaram pela minha vida: Ayrton Ramos, pelos seus ensinamentos, pelo seu companheirismo, e por todos os dias de experimento ouvindo um trap bolado. A Sarah Ferreira e Diana Pontes, por terem me ensinado tanto, e pela amizade criada. A Anna Luiza pelo gigantesco companheirismo, sua amizade e o por me aguentar por tanto tempo em um laboratório. A Layssa Gualberto, por sua amizade e principalmente os seus conselhos sábios nas horas precisas. A Micaela Eulálio, pela excelente companhia em bancada. E a Pierre Emanuel, pelas dores de pescoço compartilhada durante os experimentos de coagulação.

A minha amiga Thais Susana, por todo seu apoio em minha jornada, por toda sua ajuda, por me ensinar a fazer slides (principalmente), por ter sido um dos pilares principais durante o início e ter me ajudado a crescer durante a graduação.

As minhas amigas Suzanne Fernandes, por seu cuidado, por todo seu apoio e por principalmente me levar a maravilhosas experiências de ver macaco, Wendy Santos por seu cuidado desde o início do curso, sua amizade e pelas noites viradas estudando genética. E a minha amiga Emanuela Fernandes, por todo seu carinho, apoio, conselho e cuidados.

Agradeço a todas as pessoas que passaram por minha vida e deixaram seu carinho e sua amizade especial (Jéssica Aretz, Laiana Araújo, Anderson Coimbra, Isabella Brito, Helder Oliveira).

E aos meus companheiros do Lovely Queen of The Toxic Iron (em especial, Mark, Igor e Jean) pelas noites de desestresse e alívio de carga essenciais para relaxar e conseguir prosseguir com meu curso.

“Não esqueça como é ver a vida pelos olhos de uma criança, onde cada dia é uma nova jornada, um novo capítulo, pois mesmo na escuridão as belezas e as maravilhas do mundo nunca se vão, estão sempre lá, esperando para serem vistas”

- Senua

RESUMO

Acidentes que envolvem empeçonhamento decorrente da inoculação de toxinas pelo aparelho inoculador das serpentes são denominados de acidentes ofídicos. Em 2017, a Organização Mundial de Saúde, inseriu acidentes ofídicos na lista de alta prioridade das doenças tropicais negligenciadas. O Brasil é o país da América do Sul com o maior índice de empeçonhamento, em 2017 foram registrados 222.452 casos de ofidismo. A família Viperidae foi responsável por 98,7% dos ofidismos identificados, sendo o gênero *Bothrops* responsável por 91,4% dos casos registrados com serpentes identificadas. No ofidismo botrópico podem ser observados diversos sintomas, podendo ser divididos em alterações fisiopatológicas locais e sistêmicas, esses variados sintomas se dão devido a composição de sua peçonha, exibindo diversas atividades farmacológicas (antibacteriano, antiparasitário, indução de apoptose, etc.). Poucos estudos avaliaram a ação oxidativa de peçonhas ofídicas sobre células sanguíneas e devido a isso, os efeitos das peçonhas sobre a hemoglobina não são completamente compreendidos. Ainda assim, estudos com diversas serpentes diferentes já descreveram o potencial oxidante de hemoglobina presente nas peçonhas. Até o presente, o soro antiofídico não oferece proteção contra o possível efeito oxidante causado pelo ofidismo, a formação de metahemoglobina pode resultar em uma severa metahemoglobinemia, o que poderia levar a um quadro fatal de hipóxia. Com isso, este trabalho tem como objetivo, avaliar e comparar a taxa de formação de metahemoglobinas causadas pela presença das peçonhas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre soluções de hemoglobinas humanas provenientes de sangue venoso do tipo O+. O potencial efeito oxidante desencadeado pelas peçonhas em soluções de hemoglobinas provenientes tanto de um concentrado de hemácias como do sangue total humano foi avaliado *in vitro*. A presença de diferentes quantidades das peçonhas de *B. alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* em soluções de hemoglobinas provenientes tanto de um concentrado de hemácias como do sangue total, provocaram maior formação de metahemoglobina quando comparado com a oxidação espontânea (controle negativo), e ainda, apresentaram resultados semelhantes, com pequenas diferenças entre si. Estudos realizados com diversas espécies das famílias Viperida e Elapidae, evidenciaram que as peçonhas ofídicas possuem um potencial efeito de indução da oxidação de hemoglobina. Embora não se saiba ao certo os mecanismos envolvidos no processo de oxidação, supõem-se que esse efeito é devido a ação indireta da L-aminoácido oxidase, ou até mesmo um efeito gerado pela Fosfolipase A₂. Ainda assim, os estudos atuais que avaliam o efeito oxidante de peçonhas ofídicas sobre a hemoglobina são escassos, impedindo inferir com maior precisão os mecanismos envolvidos neste processo. Estudos mais aprofundados necessitam ser realizados para que possa ser entendido o mecanismo de interação entre componentes ofídicos com a hemoglobina para causar a formação significativa de metahemoglobina observada.

Palavras-chave: Ofidismo; Oxidação; Metahemoglobina

ABSTRACT

Accidents involving stunting due to toxin inoculation by the snake inoculating apparatus are called ophidism. In 2017, the World Health Organization placed snakebite accidents on the high priority list of neglected tropical diseases. Brazil is the country in South America with the highest rate of accidents, in 2017 there were 222,452 cases of ophidism. The Viperidae family was responsible for 98.7% of the identified ophidisms and the *Bothrops* genus was responsible for 91.4% of the cases registered with identified snakes. In botropic ophidism, several symptoms can be observed and can be divided into local and systemic pathophysiological changes. These varied symptoms are due to the composition of its venom, exhibiting various pharmacological activities (antibacterial, antiparasitic, induction of apoptosis, etc.). Few studies have evaluated the oxidative action of snake venoms on blood cells and due of this, the effects of venoms on hemoglobin are not fully understood. Still, studies with several different snakes have described the oxidative potential of hemoglobin present in venom. To date, anti-snake venom serum does not offer protection against the possible oxidant effect caused by ophidism, the methaemoglobin formation may result in severe methaemoglobinemia, which could lead to a fatal hypoxia. Thus, this work aims to evaluate and compare the rate of formation of methaemoglobins caused by the presence of venom from *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* and *B. moojeni* on human hemoglobin solutions from venous blood type O +. The potential oxidative effect caused by venoms in hemoglobin solutions from both red blood cell concentrates and human whole blood was evaluated in vitro. The presence of different amounts of *B. alternatus*, *B. jararacussu* and *B. moojeni* venoms in hemoglobin solutions from both red blood cell and whole blood cells caused a higher formation of methemoglobin when compared to spontaneous oxidation (negative control), and, also presented similar results, with slight differences among themselves. Studies conducted with several species of the Viperida and Elapidae families showed that ophidian venoms have a potential effect on hemoglobin oxidation. Although the mechanisms involved in the oxidation process are not known, it is assumed that this effect is due to the indirect action of L-amino acid oxidase, or even an effect generated by Phospholipase A2. Nevertheless, current studies evaluating the oxidizing effect of ophthalmic venom on hemoglobin are scarce, preventing the more precise inferences of the mechanisms involved in this process. Further studies need to be performed to understand the mechanism of interaction between ophidic components with hemoglobin to cause significant methemoglobin formation observed.

Keywords: Ophidism; Oxidation; Methemoglobin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – BOTHROPS ALTERNATUS E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.	2
FIGURA 2 – BOTHROPS JARARACUSSU E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	2
FIGURA 3 – BOTHROPS MOOJENI E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	3
FIGURA 4 – COMPONENTES TOTAIS DO SANGUE.	5
FIGURA 5 – A FORMA DO ERITRÓCITO E A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA.....	6
FIGURA 6 – EFEITO OXIDANTE CAUSADO PELA PRESENÇA DE DIFERENTES QUANTIDADES DA PEÇONHA BRUTA DE BOTHROPS ALTERNATUS SOBRE HEMOGLOBINAS PROVENIENTES DE UM CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS HUMANO DO TIPO O+ (SOLHB-CE) A 5%.....	11
FIGURA 7 – EFEITO OXIDANTE CAUSADO PELA PRESENÇA DE DIFERENTES QUANTIDADES DA PEÇONHA BRUTA DE <i>BOTHROPS ALTERNATUS</i> SOBRE HEMOGLOBINAS PROVENIENTES DE SANGUE TOTAL HUMANO DO TIPO O+ (SOLHB-ST) A 10%.	12
FIGURA 8 – EFEITO OXIDANTE CAUSADO PELA PRESENÇA DE DIFERENTES QUANTIDADES DA PEÇONHA BRUTA DE BOTHROPS JARARACUSSU SOBRE HEMOGLOBINAS PROVENIENTES DE UM CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS HUMANO DO TIPO O+ (SOLHB-CE) A 5%.....	13
FIGURA 9 – EFEITO OXIDANTE CAUSADO PELA PRESENÇA DE DIFERENTES QUANTIDADES DA PEÇONHA BRUTA DE BOTHROPS JARARACUSSU SOBRE HEMOGLOBINAS PROVENIENTES DO SANGUE TOTAL HUMANO DO TIPO O+ (SOLHB-ST) A 10%.	14
FIGURA 10 – EFEITO OXIDANTE CAUSADO PELA PRESENÇA DE DIFERENTES QUANTIDADES DA PEÇONHA BRUTA DE BOTHROPS MOOJENI SOBRE HEMOGLOBINAS PROVENIENTES DE UM CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS HUMANO DO TIPO O+ (SOLHB-CE) A 5%.....	15
FIGURA 11 - EFEITO OXIDANTE CAUSADO PELA PRESENÇA DE DIFERENTES QUANTIDADES DA PEÇONHA BRUTA DE BOTHROPS MOOJENI SOBRE HEMOGLOBINAS PROVENIENTES DO SANGUE TOTAL HUMANO DO TIPO O+ (SOLHB-ST) A 10%.	16
FIGURA 12 – OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA CAUSADO PELA PEÇONHA OFÍDICA.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Ofidismo	1
1.2 – Características do gênero <i>Bothrops</i>	1
1.2.1 – <i>Bothrops alternatus</i> (Duméril, Bibron & Duméril, 1854).....	2
1.2.2 – <i>Bothrops jararacussu</i> (Lacerda, 1884).....	2
1.2.3 – <i>Bothrops moojeni</i> (Hoge, 1966)	3
1.3 – Efeitos biológicos e farmacológicos da peçonha.....	3
1.4 – Componentes do sangue	4
1.5 – Oxidação de hemoglobina	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 OBJETIVO GERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Peçonha Bruta.....	9
3.2 Eritrócitos, sangue total e aspectos éticos.....	9
3.3 Preparação da solução de hemoglobina e ensaio oxidante	9
3.4 Análise estatística	10
4. RESULTADOS.....	11
4.1. <i>Bothrops alternatus</i>	11
4.2. <i>Bothrops jararacussu</i>	13
4.3. <i>Bothrops moojeni</i>	15
5. DISCUSSÃO.....	17
6. CONCLUSÃO	21
7. REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Ofidismo

Acidentes que envolvem empeçonhamento decorrente da inoculação de toxinas pelo aparelho inoculador das serpentes são denominados de acidentes ofídicos ou ofidismo (PAIXÃO JÚNIOR, 2017). Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (WHO) inseriu acidentes ofídicos na lista de alta prioridade das doenças tropicais negligenciadas (WHA, 2018). Mundialmente, 5,4 milhões de acidentes com serpentes são registrados por ano, dos quais 1,8 a 2,7 milhões são casos de ofidismo, resultando entre 81.410 e 137.880 fatalidades ocasionando graves crises médicas e socioeconômicas (SANTHOSH et al., 2016; WHO, 2019).

No Brasil, há 411 espécies de serpentes descritas, das quais 66 destas são consideradas peçonhentas e distribuem-se entre as famílias Viperidae e Elapidae (UETZ, 2019). O Brasil é o país da América do Sul com o maior índice de empeçonhamento, com 29 mil casos ao ano, sendo um dos cinco países com maiores estimativas mundiais (FERREIRA, 2017; SANTOS, 2018). Os representantes da família Viperidae são responsáveis tanto pela maioria dos casos, como pelos casos mais graves (SANTOSH et al., 2016). De acordo com os dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, em 2017 foram registrados 222.452 casos de ofidismo e destes 25.388 acidentes tiveram a espécie de serpente identificada. A família Viperidae foi responsável por 98,7% dos ofidismos identificados e sendo o gênero *Bothrops* responsável por 91,4% dos casos registrados com serpentes identificadas (BRASIL, 2019).

1.2 – Características do gênero *Bothrops*

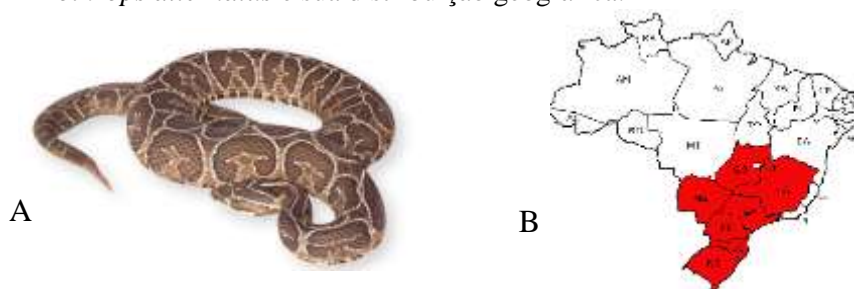
As serpentes do gênero *Bothrops* são popularmente conhecidas como jararacas, ouricana, jararacuçu, caíçaca, entre outros. O gênero engloba 45 espécies das quais 27 são encontradas em território brasileiro (UETZ, 2019).

As espécies deste gênero possuem a cauda lisa, dentição maxilar com um par de presas canaliculadas de grande mobilidade e possuem um órgão termorreceptor situado entre o olho e a narina denominado de fosseta loreal. Essas serpentes são amplamente distribuídas em todo território brasileiro e habitam geralmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, com preferências por ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas. (PINHO; PEREIRA, 2001; PAIXÃO JÚNIOR, 2017).

1.2.1 – *Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854)

Conhecida popularmente como urutu e urutu cruzeiro, a *Bothrops alternatus* apresenta ampla distribuição geográfica sendo encontrada em países como Argentina, Paraguai e Uruguai. No Brasil, pode ser encontrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul em zonas de cultivo, principalmente em plantações de cana-de-açúcar. Embora seus acidentes raramente levem a óbito, sua peçonha é capaz de provocar necroses teciduais e musculares podendo causar amputações (O'SHEA, 2018; UETZ, 2019).

Figura 1 – *Bothrops alternatus* e sua distribuição geográfica.

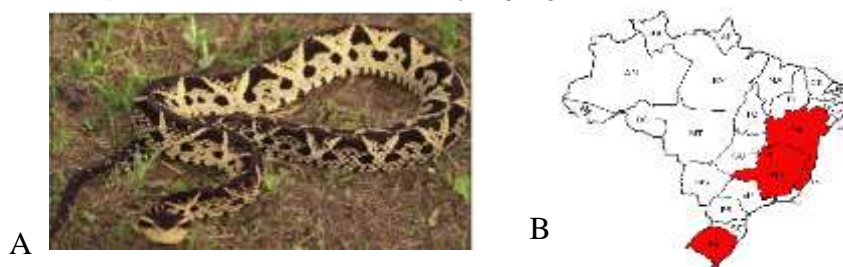


(A) Espécime adulto de *B. alternatus*. (B) Em vermelho, a distribuição nos locais em que essa serpente pode ser encontrada. **Fontes:** O'SHEA M., 2018, p.561; adaptado de UETZ, 2019.

1.2.2 – *Bothrops jararacussu* (Lacerda, 1884)

Conhecida popularmente como jararacuçu, a *Bothrops jararacussu* é encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai e no Brasil. Está distribuída, em território nacional, nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e Bahia. Os indivíduos chegam até 1,80m de comprimento, sendo a espécie que produz uma maior quantidade de veneno e uma que mais causam fatalidades no Brasil. (SHUPE, 2013; UETZ, 2019).

Figura 2 – *Bothrops jararacussu* e sua distribuição geográfica



(A) Espécime adulto de *B. jararacussu*. (B) Em vermelho a distribuição nos locais em que essa serpente pode ser encontrada **Fontes:** SHUPE, 2013, capítulo 9; adaptado de UETZ, 2019.

1.2.3 – *Bothrops moojeni* (Hoge, 1966)

A *Bothrops moojeni* é conhecida como caíçaca ou caissaca sendo a maior serpente do gênero, podendo chegar até 2 metros e 20 centímetros. Está amplamente distribuída em todo território brasileiro, nos estados da Bahia, Piauí, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás e Maranhão e é comumente encontrada em regiões de savanas e pastagens. Os acidentes com *B. moojeni* geralmente são fatais e, quando não, levam a amputação (SHUPE, 2013; UETZ, 2019).

Figura 3 – *Bothrops moojeni* e sua distribuição geográfica.



(A) Espécime adulto de *B. moojeni*. (B) Em vermelho distribuição nos locais em que essa serpente pode ser encontrada **Fonte:** SHUPE, 2013, capítulo 9; Adaptado de UETZ, 2019.

1.3 – Efeitos biológicos e farmacológicos da peçonha

No ofidismo botrópico podem ser observados diversos sintomas, podendo ser divididos em alterações fisiopatológicas locais e sistêmicas. Quando locais, é observado a formação de edema, mionecrose, hemorragia e, em casos mais graves, pode ocorrer necrose do tecido, gerando sequelas permanentes na vítima. Dentre as alterações sistêmicas pode ser observada insuficiência renal aguda, alterações cardiovasculares, desregulação da hemostasia, além náuseas, vômitos e hipotensão arterial (PINHO; PEREIRA, 2001; SILVA, 2017).

Os variados sintomas observados pelo empeçonhamento por serpentes do gênero *Bothrops* ocorrem devido composição de sua peçonha. As peçonhas de serpentes são uma mistura complexa de proteínas, polipeptídios, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos, aminas e lipídeos (GUO et al., 2012). As peçonhas botrópicas são compostas por moléculas proteicas, como as fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidase, lectinas, proteases, hialuronidases, acetilcolinesterases, ativadores de proteína C e íons inorgânicos como, cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro e potássio (STOCKER, 1990).

Devido a sua composição, as peçonhas ofídicas apresentam diversas atividades farmacológicas (GUO et al., 2012). Estudos demonstraram efeitos de indução de apoptose (SUHR et al., 1996), na hemostasia (MATSUI et al., 2000), antibacteriano (NASCIMENTO

CANHAS et al., 2017), na agregação de plaquetas (JULIANA et al., 2017), antitumoral (CALDERON et al., 2014; COSTA et al., 2014) e antiparasitária (CISCOTOO et al., 2009).

O estresse oxidativo ainda é um efeito biológico pouco estudado em casos de ofidismo (SUNITHA et al., 2015). Porém, alguns estudos já avaliaram o estresse oxidativo causados pela peçonha de *Vipera russelli* (SANTHOSH et al., 2013b; SANTHOSH et al., 2016) e pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (YAMASAKI et al., 2008). Ainda, um potencial efeito antioxidante foi observado nas peçonhas de *Cerastes cerastes gasperetti* e *Naja naja* (HAFFOR; AL-SADOON, 2008; DAS et al., 2011)

Poucos estudos avaliaram a ação oxidativa de peçonhas ofídicas sobre células sanguíneas e devido a isso, os efeitos das peçonhas sobre a hemoglobina não são completamente compreendidos (WILLIAM et al., 2018). Em 2015, Sharma e colaboradores avaliaram a indução de formação metahemoglobina causada pela presença das peçonhas de *Naja naja*, *Ophiophagus hannah*, *Echis carinatus* e *Daboia russelli*. Meléndez-Martínez e colaboradores (2017) estudaram o estresse oxidativo de eritrócitos humanos causados pela presença da peçonha de *Crotalus molossus nigrescens*. Williams e colaboradores (2018) avaliaram a oxidação de hemoglobinas causada pela presença de peçonhas de 47 espécies de serpentes das quais apenas 7 não induziram a formação de metahemoglobina; os efeitos oxidativos da hemoglobina causados pela peçonha de *Naja nigricollis* foram descritos com maior ênfase, devido a este apresentar uma maior oxidação da hemoglobina dentre todas as peçonhas avaliadas.

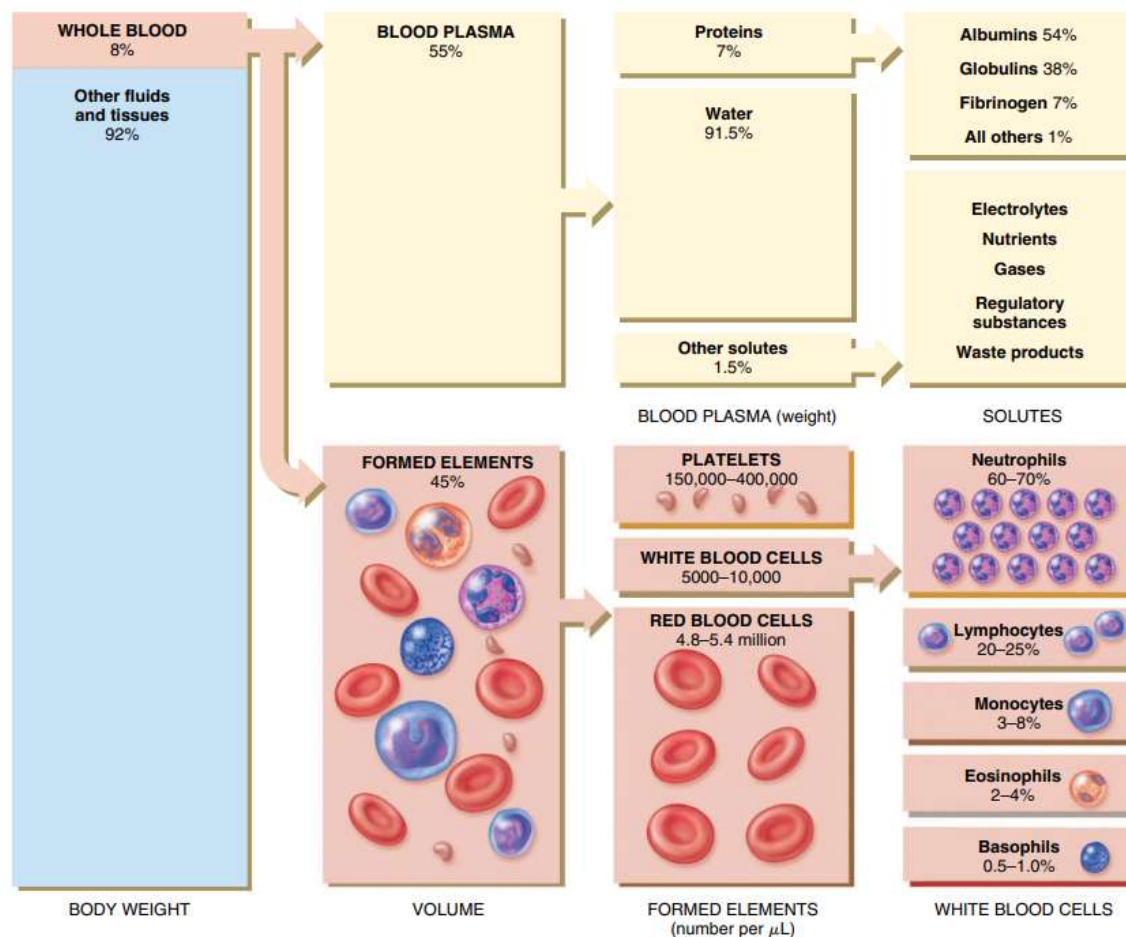
Conforme descrito por Sharma e colaboradores (2015), até o presente, o soro antiofídico não oferece proteção contra o possível efeito oxidante causado pelo ofidismo. A formação de metahemoglobina pode resultar em uma severa metahemoglobinemia, o que poderia levar a um quadro fatal de hipóxia.

1.4 – Componentes do sangue

O sangue humano é dividido em duas porções: uma parte aquosa denominada de plasma que compõem aproximadamente 55% dos componentes totais do sangue, e uma outra porção formada por elementos figurados (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) os quais compõem 45% do sangue total (fig. 4). O plasma humano é formado por água (91,5%) e solutos (8,5%), dentre esses 7% são formados por proteínas como albumina, globulina e fatores de coagulação e os demais 1,5% são constituídos por eletrólitos, nutrientes (glicose, ácido graxo), gases (oxigênio, dióxido de carbono), substâncias reguladoras (vitaminas,

hormônios, enzimas) e produtos residuais. Aproximadamente 99% dos elementos figurados são representados por eritrócitos e, menos de 1% por leucócitos e plaquetas (TORTORA; DERRICKSON, 2016).

Figura 4 – Componentes totais do sangue.



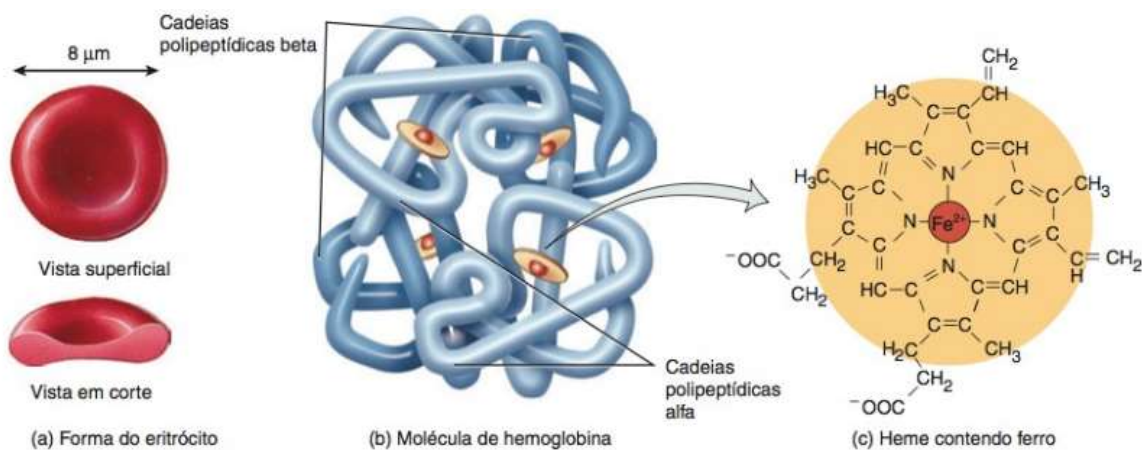
Componentes presente no sangue total que está dividido entre 55% de plasma e 45% de Elementos figurados Fonte: TORTORA G. J., DERRICKSON B., 2016, p.683.

Os eritrócitos, também conhecidos como glóbulos vermelhos, representam as células principais do sistema circulatório. São células anucleadas, bicôncavas e discoides, caracterizadas pela sua função primordial de transporte de oxigênio (fig. 5). O transporte de oxigênio é realizado por uma proteína transportadora chamada de hemoglobina. Cada eritrócito contém aproximadamente 280 moléculas de hemoglobina (SPRAGUE et al., 2007; TORTORA; DERRICKSON, 2016; FARAG; ALAGAWANY, 2018).

As hemoglobinas (Hb) são proteínas globulares, presentes em altas concentrações nos eritrócitos (fig. 5a). Em humanos, são responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e, também transportam CO_2 e H^+ dos tecidos para os

pulmões. A molécula de hemoglobina é tetramérica, composta por duas cadeias polipeptídicas α (141 aminoácidos) e duas β (146 aminoácidos) ($\alpha_2\beta_2$) e cada cadeia está associada a um grupo prostético heme (fig. 5b). O grupo heme apresenta uma forma heterocíclica derivada da porfirina, consistindo em quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de meteno. A porfirina do grupo heme é conhecida como protoporfirina IX e por apresentar um átomo de ferro em seu centro o qual é responsável pela cor avermelhada do sangue. Nas hemoglobinas funcionais o ferro encontra-se no estado ferroso (Fe^{2+}) (fig. 5c) e interage com o O_2 , transportando-o pelo organismo (DEVLIN; 2007; VOET; VOET, 2013; DAVID; COX, 2014).

Figura 5 – A forma do eritrócito e a molécula de hemoglobina



(a) Formato do Eritrócito em duas vistas diferentes. (b) Esquemática da molécula de hemoglobina e de suas cadeias polipeptídicas alfa e beta. (c) Estrutura da hemoglobina com o íon ferro (Fe^{2+}).
 Fonte: TORTORA G. J., DERRICKSON B., Fundamentos de Anatomia e Fisiologia, 2016, p.688.

1.5 – Oxidação de hemoglobina

Os eritrócitos possuem um alto teor de ácidos graxos em sua membrana e, em seu interior, uma alta quantidade de hemoglobina e oxigênio, o que o torna susceptíveis ao efeito oxidante (BILTO et al, 2012). O Fe^{2+} (em seu estado ferroso) quando é oxidado a Fe^{3+} (estado férrico), forma a metemoglobina ou metahemoglobina (mHb). A mHb é incapaz de se ligar ao O_2 , pois o Fe^{3+} interage octaedricamente com uma molécula de H_2O . A mHb é responsável pela coloração marrom no sangue seco. (VOET; VOET, 2011).

Embora a autooxidação de hemoglobina aconteça espontaneamente no corpo humano, os eritrócitos possuem a enzima metemoglobina-redutase a qual reduz o Fe^{3+} de volta ao seu estado ferroso (VOET; VOET, 2011).

A concentração normal de metahemoglobina em eritrócitos humanos pode variar de 0,5 a 1% da quantidade total de eritrócitos (MAL; CHATTERJEE, 1991). Quando a taxa

de oxidação é maior que a velocidade enzimática de redução, resulta-se em um quadro patológico denominado de metahemoglobinemia (MURINELLO et al., 2001; VOET; VOET, 2011).

Segundo William et al. (2018), no ofidismo, as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser geradas por duas vias: metabólito (H_2O_2) da desaminação da L-aminoácidos via svLAAOs ou pela peroxidação de lipídeos causados pela ação das fosfolipases A_2 . Contudo, a oxidação da hemoglobina pode estar associada tanto a atividade catalítica das fosfolipase A_2 s presentes na peçonha causa lise celular (eritrócito) que expõe a oxihemoglobina como aos demais componentes presentes na peçonha, como as svLAAOs interagem com a oxihemoglobina oxidando-a.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar (*in vitro*) e comparar a taxa de formação de metahemoglobinas causadas pela presença das peçonhas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre soluções de hemoglobinas humanas provenientes de sangue venoso do tipo O, Rh positivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar, *in vitro*, a taxa de formação de metahemoglobina causada pela presença da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* sobre humanas provenientes, tanto de sangue total humano, quanto de um concentrado de hemácias.
- Investigar, *in vitro*, a oxidação de hemoglobinas causada pela presença da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre solução de hemoglobinas humanas provenientes, tanto de sangue total humano, quanto de um concentrado de hemácias.
- Avaliar, *in vitro*, a taxa de metahemoglobina formada devido a presença da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em uma solução de hemoglobinas humanas provenientes, tanto de sangue total humano, quanto de um concentrado de hemácias.
- Comparar a taxa de formação de metahemoglobinas humanas devido a presença de peçonhas brutas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Peçonha Bruta

Os pools das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* foram cedidos pela Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, de acordo com o “Acordo de cooperação técnica e científica entre a UFPB e a UCDB” e segundo os “Termos de origem dos venenos de serpentes”.

Foram utilizadas cinco quantidades diferentes (1, 5, 10, 50 e 100µg) das peçonhas brutas de *B. alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, solubilizados em PBS 10x, pH 7,4.

3.2 Eritrócitos, sangue total e aspectos éticos

O sangue do tipo sanguíneo O, Rh positivo foi coletado de voluntários sadios por meio de punção venosa (não traumática) na veia do antebraço, utilizando tubos de coleta contendo citrato de sódio (1:9). Para a coleta, os doadores permaneceram em jejum por, no mínimo, quatro horas e não fizeram uso de nenhum tipo de medicação nos dez dias anteriores.

O armazenamento e a utilização do sangue humano foram realizados de acordo com a Resolução No 441 de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde. A coleta de material biológico e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley CEP/HULW sob o número CAAE 61023116.3.0000.5183, de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional no 001/2013 das Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução 466/12 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

3.3 Preparação da solução de hemoglobina e ensaio oxidante

O potencial efeito oxidante das peçonhas brutas de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre soluções de hemoglobinas (SolHb), provenientes tanto do sangue total humano, como de um concentrado de hemácias foi avaliado *in vitro*.

Para a obtenção de uma SolHb a 10% proveniente do sangue total (SolHb-ST) foi utilizado sangue total, glicose a 10% e Tampão Fosfato Salina (do inglês, PBS 10x, pH 7,4). Utilizou-se triton X-100 para lisar as células e expor a hemoglobina. A SolHb a 5%

proveniente do concentrado de eritrócitos (SolHb-CE) foi obtida após a lavagem das hemácias com PBS por 3 vezes, a 3.000 RPM por 5 minutos.

Após o preparo, diferentes quantidades das peçonhas brutas avaliadas foram adicionadas separadamente as SolHb-ST e SolHb-CE em uma placa de 96 poços e foram incubadas por 20 minutos a ~25°C. O controle negativo foi composto somente de SolHb enquanto que no controle positivo foi adicionado fenilhidrazina, um reconhecido agente oxidante. Para obtenção taxa de oxidação das hemoglobinas foram realizadas leituras nos comprimentos de ondas de 540 e 630nm em um leitor de microplacas (Multiskan GO), de hora em hora, por 72 horas de experimentação. O cálculo da taxa de metahemoglobina (mHb) formada, foi realizado de acordo com a equação #1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

$$\%metHb = 100x \frac{D.O.(630nm)}{D.O.(630nm) + D.O.(540nm)} \quad \text{Equação \#1}$$

3.4 Análise estatística

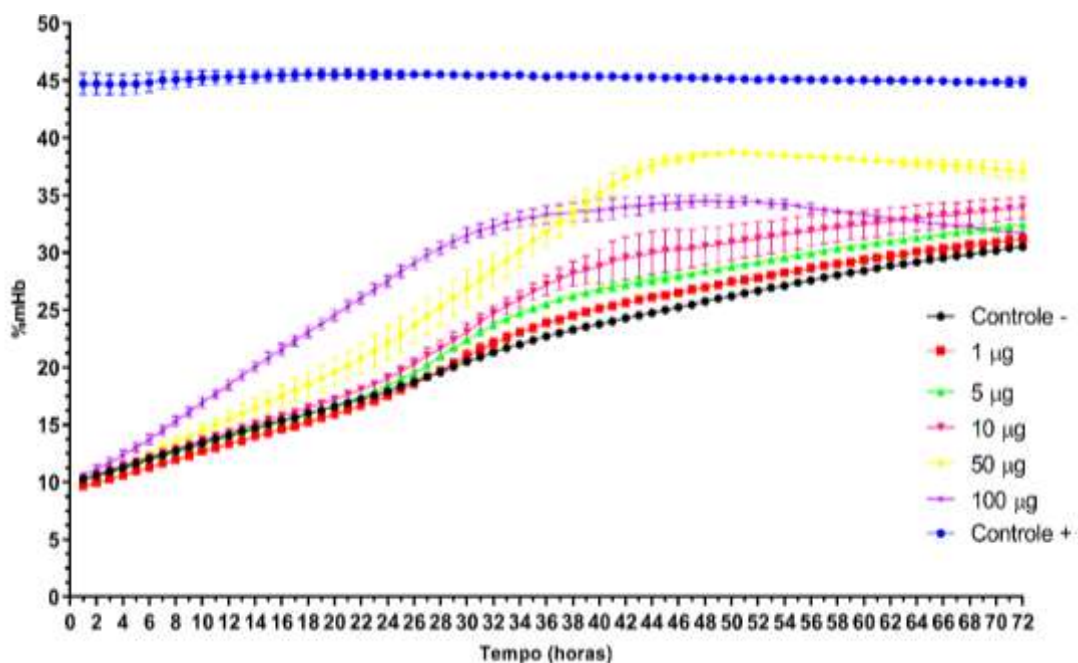
Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente utilizando o teste Two-way ANOVA no software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Softwar Inc., San Diego CA, E.U.A). Os valores de p<0,05 foram considerados significantes (ns: valor de p>0,05; *: valor de p<0,01; **: valor de p<0,001; ***: valor de p<0,0001 e ****: valor de p<0,00001).

4. RESULTADOS

4.1. *Bothrops alternatus*

O efeito oxidante observado na solHb-CE a 5% causado pela presença da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi significativo e de forma dose dependente inversamente proporcional ao tempo (maior a quantidade de peçonha em menor tempo), com exceção da quantidade de 1µg (Fig. 6).

Figura 6 – Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos humano do tipo O+ (solHb-CE) a 5%.



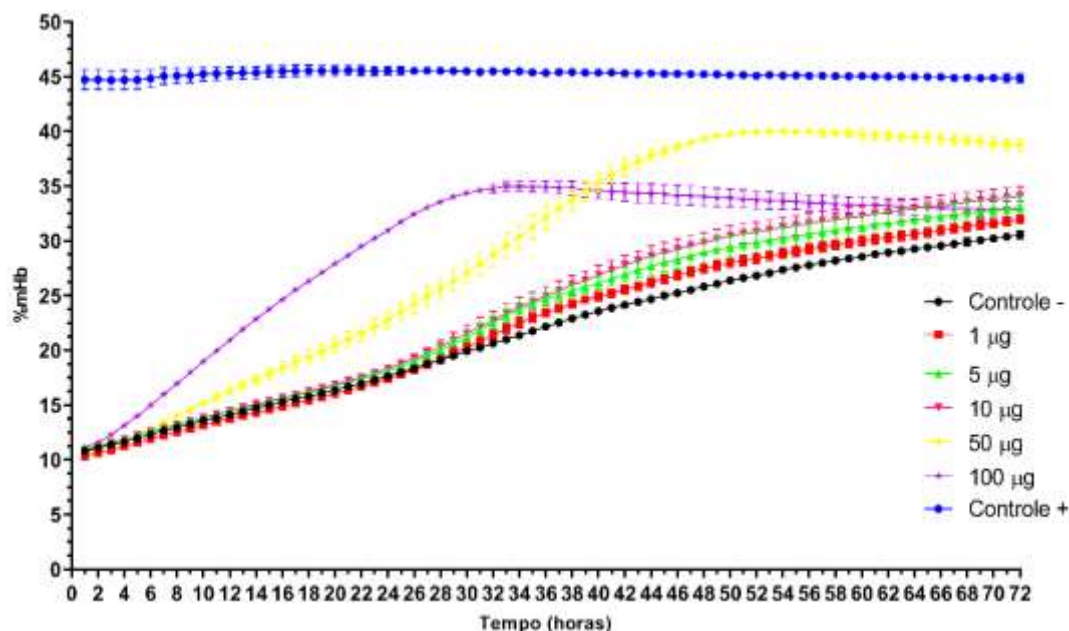
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

A taxa de metahemoglobina (%mHb) formada espontaneamente, e pela presença das diferentes quantidades da peçonha de *Bothrops alternatus*, foram similares durante as primeiras sete horas de experimentação (fig.6). A quantidade de 100µg, após a 8ª hora, causou um aumento significativo na taxa de formação de mHb (%mHb ~15% e controle negativo: %mHb ~12%) e seguiu aumentando nas horas seguintes. A quantidade de 50µg, na 17ª hora, apresentou uma taxa significativa ~17% de formação de mHb e continuou aumentando nas leituras subsequentes. As quantidades de 10µg e 5µg provocaram aumentos significativos na taxa de oxidação da hemoglobina durante as 29ª (~22%) e 32ª (~21%) horas de experimentação, respectivamente. Complementarmente, durante a 38ª hora, as

quantidades de 100µg e 50µg da peçonha bruta avaliada apresentaram a mesma porcentagem de formação %mHb (~33%). Nas horas seguintes, a quantidade de 100µg apresentou menor taxa de formação de mHb que a quantidade de 50µg, a qual atingiu o valor máximo de oxidação na 50ª hora, com 38% de formação de mHb, sendo esse valor o mais aproximado do controle positivo, que se manteve em ~45% durante todo o experimento.

O perfil de oxidação de uma solHb-ST a 10% devido de diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre foi semelhante ao observado para solHb-CE a 5% (fig.7).

Figura 7– Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de sangue total humano do tipo O+ (solHb-ST) a 10%.



Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

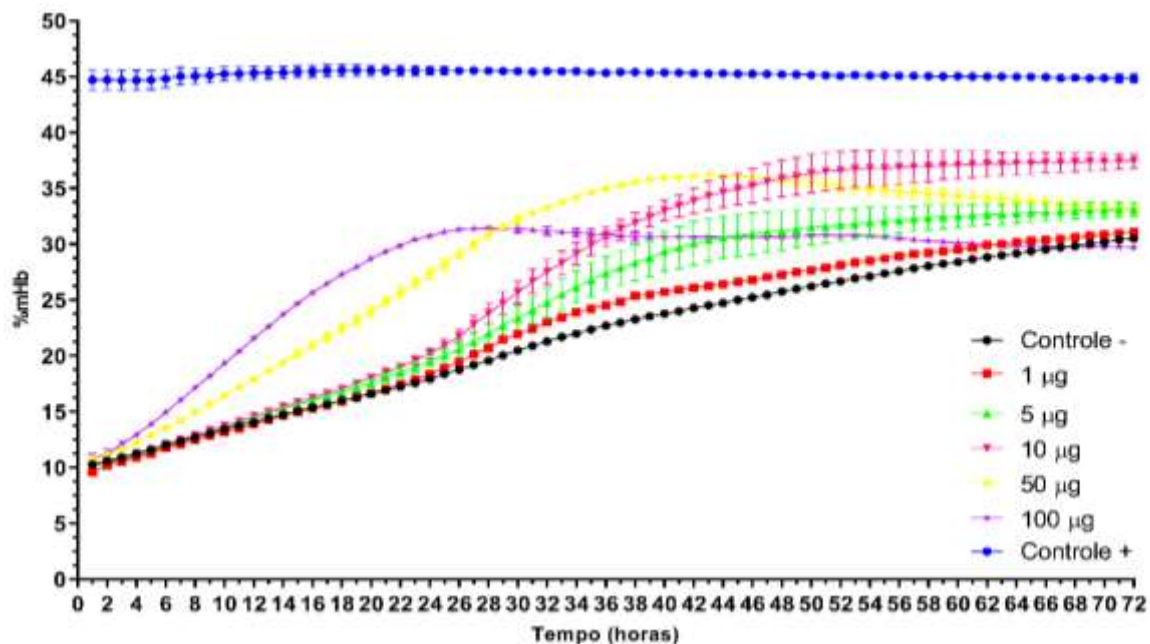
A taxa de formação de mHb na solHb-ST devido a presença das diferentes quantidades da peçonha foram iguais ao controle negativo durante as primeiras 5 horas de experimentação. A quantidade de 100µg apresentou atividade oxidante significativa (~15%) na 6ª hora de avaliação, aumentando gradativamente nas horas seguintes. A quantidade de 50µg expressou uma taxa de formação de mHb significativa (~16%) a partir da 12ª hora, aumentando no decorrer do experimento. As quantidades de 5µg e 10µg provocaram um aumento significado na taxa de formação de mHb (ambos ~23%) somente após a 32ª e 33ª horas de experimentação, respectivamente. Complementarmente, durante a 38ª hora, as quantidades de 100µg e 50µg apresentaram a mesma taxa de formação de mHb (~35%). Nas

leituras subsequentes, a quantidade de 50µg atingiu a taxa máxima de ~40% na 50ª hora de oxidação da hemoglobina, sendo a taxa que mais se aproximou do valor obtido no controle positivo, o qual se manteve em ~45% durante todo o experimento.

4.2. *Bothrops jararacussu*

A taxa de oxidação da hemoglobina observada na solHb-CE a 5% causado pela presença da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* foi significante em todas quantidades avaliadas e de forma dose dependente inversamente proporcional ao tempo, com exceção da quantidade de 1µg que não apresentou valores significativos durante o experimento. (fig. 8)

Figura 8– Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos humano do tipo O+ (solHb-CE) a 5%.



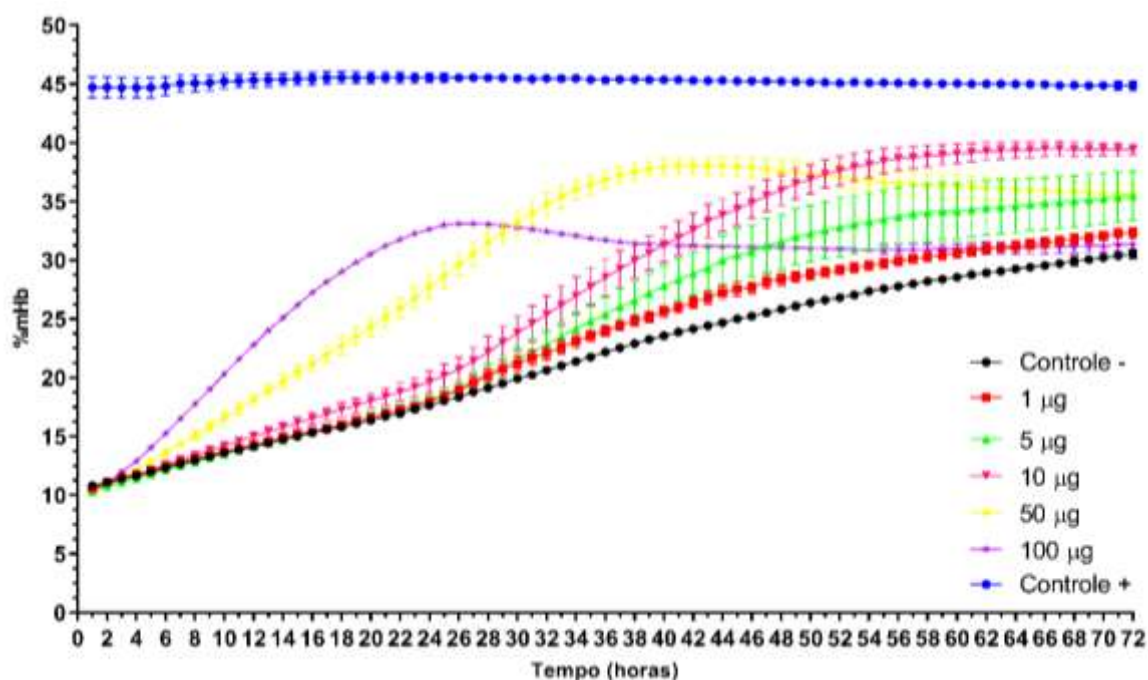
Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

A %mHb formada espontaneamente e pela presença das diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. jararacussu* foram similares até a 4ª hora de experimentação. A quantidade de 100µg causou um aumento significativo de 2,33% (%mHb 13.88%, e controle negativo: %mHb 11.5) na taxa de formação de mHb, durante a 5ª hora, seguido de um considerável aumento nas horas posteriores. A quantidade de 50µg apresentou uma significativa taxa de formação de mHb (~16%) na 9ª hora, estabilizando após 66ª hora com 33%. A quantidade de 10µg provocou uma oxidação de hemoglobina significante (~20%) durante a 24ª hora e atingindo a maior %mHb (~38%), dentre todas as quantidades

observadas, na 66^a hora. A quantidade de 5 μ g mostrou um valor significativo na 28^a hora (~22%), estabilizando em 33%, após a 60^a hora.

O perfil do efeito oxidante causado pela peçonha bruta de *B. jararacussu* sobre 10% de solHb-ST foi semelhante ao observado para solHb-CE (fig.9), com exceção da quantidade de 1 μ g que não apresentou valores significativos durante todo o experimento.

Figura 9– Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre hemoglobinas provenientes do sangue total humano do tipo O+ (solHb-ST) a 10%.



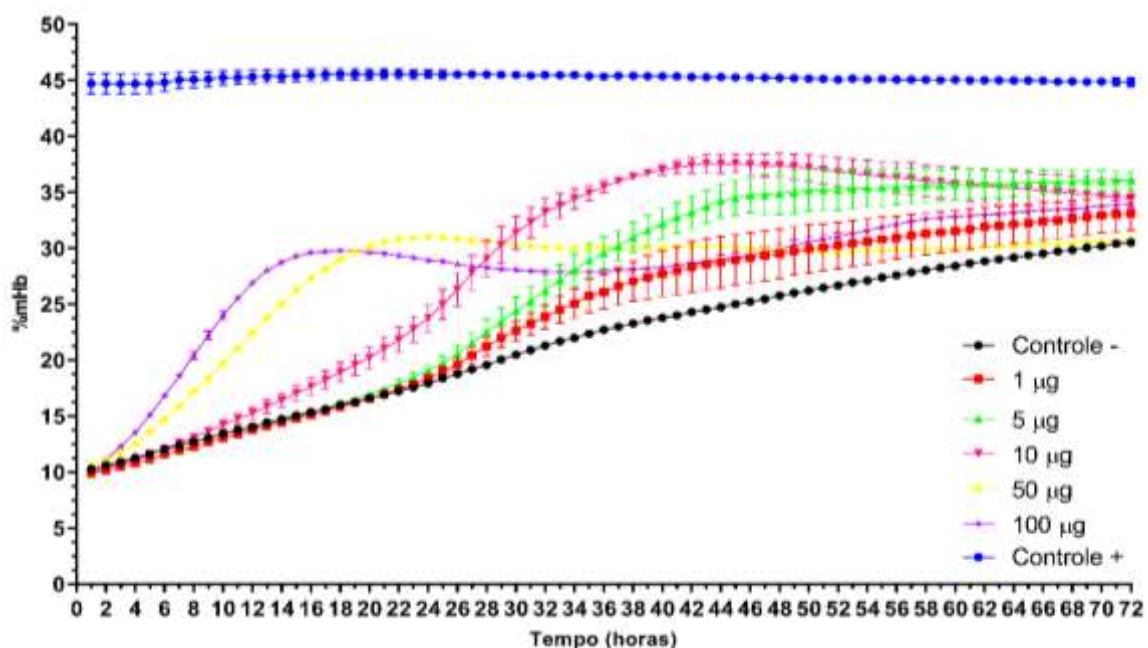
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

A taxa de %mHb do controle negativo e das quantidades de peçonhas foram semelhantes até a 6^a hora de experimentação. A quantidade de 100 μ g causou um aumento significativo após a 7^a hora (%mHb ~16%) e continuou aumentando nas horas seguintes. A quantidade de 50 μ g apresentou formação de mHb significativa (~17%) após 11^a hora, aumentando a taxa de oxidação da hemoglobina nas horas subsequentes até atingir 35% na hora 66. As quantidades de 10 μ g e 5 μ g demonstraram valores significativos durante a 29^a (~23%) e 36^a (~25%) hora de experimentação, respectivamente e aumentaram a %mHb até a hora 63, quando a taxa de oxidação estabilizou em 35%, para a quantidade de 5 μ g, enquanto a quantidade de 10 μ g, atinge o valor máximo de de %mHb (~40%), mantendo-se estável até o fim do experimento.

4.3. *Bothrops moojeni*

A atividade oxidante causada pela presença da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* sobre uma solHb-CE a 5% foi significativa e de forma dose dependente inversamente proporcional ao tempo em todas quantidades avaliadas (fig. 10)

Figura 10– Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos humano do tipo O+ (solHb-CE) a 5%.

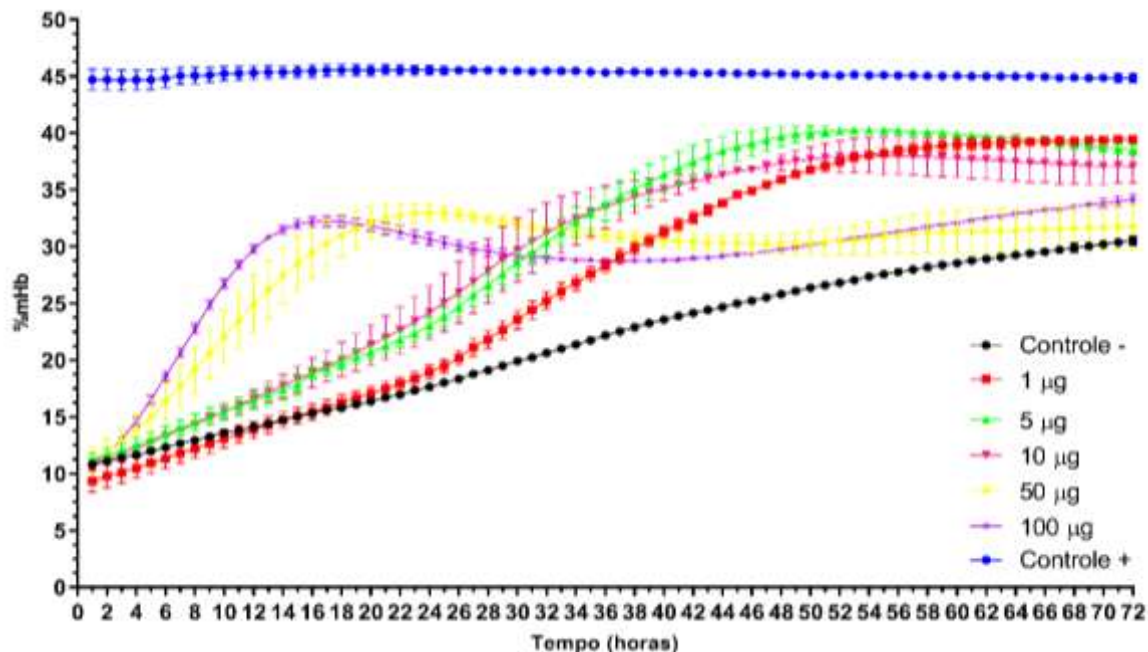


Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

A presença da quantidade de 100µg da peçonha bruta de *B. moojeni* sobre uma solHb-CE apresentou uma formação de mHb significativa (%mHb: ~15%) na 5ª hora de experimentação, estabilizando após a hora 67ª (%mHb: ~33%). A quantidade de 50µg atingiu o valor de 16% de %mHb na 7ª hora de experimentação, estabilizando após a hora 60 (%mHb: ~30%). A quantidade de 10µg, provocou uma oxidação de hemoglobina significativa (~20%) durante a 19ª hora, atingindo o valor máximo de oxidação da hemoglobina na hora 43ª (%mHb: ~38%). As demais quantidades de 5µg e 1µg causaram um aumento de formação de mHb significativo durante as horas 29ª (~24%) e 35ª (~26%), respectivamente, estabilizando após as horas 60 (%mHb: ~35%), e 64 (%mHb: ~34%), respectivamente.

A avaliação da atividade oxidante da peçonha bruta de *B. moojeni*, em todas as quantidades avaliadas, sobre uma solHb-ST a 10% apresentou valores significativos (fig. 11) seguindo o perfil de forma dose dependente inversamente proporcional ao tempo.

Figura 11 - Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* sobre hemoglobinas provenientes do sangue total humano do tipo O+ (solHb-ST) a 10%.



Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

A presença das quantidades de 100µg e 50µg causaram um aumento significativo na formação de metahemoglobina em relação ao controle negativo durante a 5ª e 6ª hora, respectivamente (ambos apresentando ~15), estabilizando após a hora 69ª (%mHb: ~34%) e 60ª hora (mHb: ~31%), respectivamente. A presença das quantidades de 10µg e 5µg ocasionaram uma taxa de formação de mHb significativa (ambos com ~20%) durante a 17ª hora, estabilizando após a hora 60ª (%mHb: ~37% e 38%, respectivamente). Ainda, a A quantidade de 5µg, atinge o pico máximo de oxidação na 55ª hora (%mHb: ~40%). A quantidade de 1µg avaliada induziu uma formação de mHb significativo (~28%) na 35ª hora, seguido de um aumento na taxa de formação de mHb até a hora 72ª, quando também atingiu o valor máximo de ~40% de formação de mHb.

5. DISCUSSÃO

Todos os resultados obtidos apresentaram pequenas diferenças na taxa de formação de mHb sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos (solHb-CE) e do sangue total (solHb-ST). A presença de pelo menos uma das quantidades de peçonha utilizadas nas três espécies de serpentes do estudo causou ~40% de oxidação da hemoglobina proveniente do sangue total após a 50ª hora. Enquanto a taxa de formação de mHb de uma solução de hemoglobinas proveniente de um concentrado de hemácias manteve em aproximadamente 38%, porém, o valor máximo de oxidação foi observado após a 50ª hora em *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* ou mais antecipadamente em *B. moojeni*, após a 43ª hora de experimentação.

O sangue humano total apresenta 55% de plasma (parte aquosa) composto por diversas substâncias e os outros 45% são formados pelas células ou fragmentos de células chamados de elementos figurados - formados 99% por eritrócitos. Quando o sangue total é centrifugado, as células por serem mais densas se depositam na parte inferior do tubo, enquanto que o plasma forma o sobrenadante (TORTORA; DERRICKSON, 2016).

Peçonhas ofídicas são compostas por uma combinação complexa de substâncias farmacológicas e bioquimicamente ativas sintetizadas e armazenadas em glândulas especializadas que se ligam às presas através de dutos (ALAPE-GIRÓN et al., 2008; CALVETE et al., 2009; ZAQUEO, 2011). Cerca de 90 a 95% do peso seco de peçonhas ofídicas é composta por proteínas, as quais são maiores responsáveis pelos efeitos tóxicos e farmacológicos desencadeados pelo ofidismo (KOH et al., 2006). Dentre os componentes que exercem papel central na sintomatologia dos acidentes ofídicos podem ser citadas proteínas das classes das metaloproteases (svMP), fosfolipases A₂ (svPLA₂), L-aminoácido oxidases (svLAAO), hialuronidases, acetilcolinesterases, aminotransferases, ativadores de fator X, serinoproteases (svSP), nucleotidases e fosfodiesterases. Os compostos não-enzimáticos englobam as miotoxinas sem atividade de fosfolipase, lectinas tipo C, fatores de crescimento, desintegrinas, e proteínas secretórias ricas em cisteínas (CAŁKOSIŃSKI et al., 2010).

Foi observado uma discreta maior formação de mHb provenientes do sangue total, o que pode ser atribuído à presença de substâncias plasmáticas e a interação de proteínas presentes na peçonha ofídica com substâncias presentes no plasma sanguíneo, causando o aumento da taxa de oxidação da hemoglobina em relação a solução de

hemoglobina proveniente de um concentrado de hemácias, pois a interação da peçonha ofídica com componentes do plasma é conhecida (MEIER; STOCKER 1991; BRAUD et al., 2000; MATSUI et al., 2000) e diversos estudos já descreveram os efeitos da peçonha botrópica na hemostasia (LU et al., 2005; PERCHUC et al., 2005).

A oxidação da hemoglobina em metahemoglobina causada pela presença das três peçonhas botrópicas avaliadas apresentaram resultados semelhantes, com pequenas diferenças. Comparando-se o tempo no qual as diferentes quantidades da peçonha de *B. moojeni* apresentaram oxidação da hemoglobina tanto na solHb-ST a 10% como na solHb-CE a 5%, a atividade oxidante causada pela presença da peçonha bruta de *B. moojeni* foi observada antecipadamente (5ª hora), seguido da peçonha de *B. jararacussu* (6ª hora) e da peçonha de *B. alternatus* (7ª hora). Contudo, a presença da peçonha *B. alternatus* causou maior oxidação na 50ª hora, seguido da peçonha de *B. moojeni* na 57ª hora e da peçonha de *B. jararacussu* na 64ª hora. A presença da peçonha de *B. alternatus* apresentou maior taxa de formação de mHb na quantidade de 50µg, enquanto as demais peçonhas, apresentaram a maior formação de mHb, nas quantidades de 10µg (*B. jararacussu* e *B. moojeni*) e em 1µg (*B. moojeni*). Os acidentes ofídicos com *B. alternatus* não costumam a ser fatais, enquanto o mesmo não se aplica ao ofidismo observados com *B. moojeni* e *B. jararacussu* (SHUPE, 2013; O'SHEA, 2018). Contudo, a variação da composição do veneno já foi relatada, podendo isso, ter ocasionado as diferenças nos resultados obtidos (CHIPPAUX et al., 1991; FURTADO et al., 1991; ÖHLER et al., 2010; CORREA-NETO et al., 2010; MAMEDE et al., 2016), podendo justificar a discreta, porém diferente taxa de formação de mHb observada pela presença das diferentes as peçonhas avaliadas

Sharma e colaboradores (2015) avaliaram e compararam a formação de metahemoglobina devido a presença das peçonhas das serpentes da família Viperidae (*Daboia russelli* e *Echis carinatus*), e da família Elapidae (*Naja naja* e *Ophiophagus hannah*) sobre uma solução de sangue total durante 24 horas e observaram que houve maior formação de metahemoglobina na presença peçonhas das serpentes da família Viperidae, corroborando com os resultados aqui descritos, pois as serpentes do gênero *Bothrops* (UETZ, 2019; SANTOS 2018) compõem a mesma família avaliada no estudo de Sharma e colaboradores (2015)

Em 2017, Meléndez-Martínez e colaboradores avaliaram o estresse oxidativo em uma solução de eritrócitos humanos causado pela presença da peçonha da serpente *Crotalus molossus nigrescens* e observaram que as maiores concentrações de peçonha (40 -

640µg/mL) utilizada induziram um aumento na formação de metahemoglobina. Nossos resultados corroboram com os resultados descritos por Meléndez-Martínez (2017); deve-se ressaltar que o gênero *Crotalus* também está classificado na família Viperidae (UETZ, 2019).

Recentemente, em 2018, Williams e colaboradores avaliaram a atividade oxidante causada pela presença da peçonha de *Naja nigricollis* na oxidação de eritrócitos ovinos. Ainda avaliaram o efeito oxidante da hemoglobina ovina causado pela presença da peçonha de serpentes de 47 espécies diferentes, sendo elas 30 da família Viperidae, e 17 da família Elapidae. Os resultados obtidos ressaltaram que a oxidação da hemoglobina foi recorrente para peçonhas das espécies da família Viperidae, incluindo a peçonha da serpente *Bothrops asper*, o que está de acordo com significativo efeito oxidante observado na presença das peçonhas avaliadas aqui no presente estudo.

O efeito oxidativo causado por peçonhas ofídicas ainda é pouco descrito e as interações entre as peçonhas ofídicas e a hemoglobina não são completamente compreendidas (SUNHITA et al., 2015; WILLIAM et al., 2018). Contudo, estudos apontam que o efeito oxidante de hemoglobina causado pela presença de peçonhas ofídicas pode ser atribuído à ação da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) e/ou peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o subproduto da catálise enzimática das LAAOs (MELÉNDEZ-MARTINEZ et al., 2017).

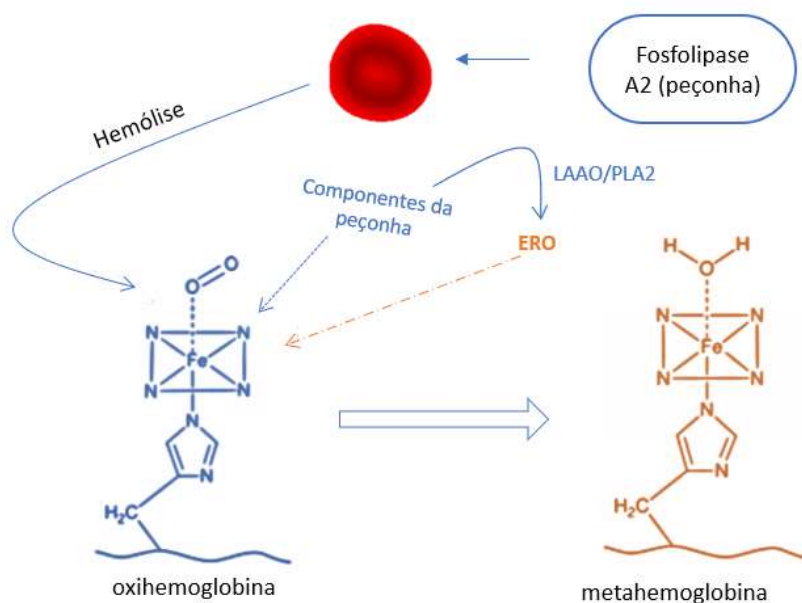
As LAAOs são descritas como flavoenzimas diméricas, glicosiladas, pertencentes a classe das óxido-redutases; essas enzimas catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de diversos L-aminoácidos, formando alfacetoácidos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (IZIDORO et al. 2014; PAIXÃO JÚNIOR, 2017). Essas flavoenzimas estão distribuídas em diversos organismos como insetos, bactérias e serpentes (*svLAAOs*) (DU; CLEMETSON, 2002; IZIDORO et al., 2014). As *svLAAOs* compõem a peçonha de diversas espécies de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae; geralmente representam de 1 a 9% da composição proteica total da peçonha, podendo variar entre as espécies (GUO et al. 2012; IZIDORO et al., 2014). Devido as diversas atividades biológicas desempenhadas pelas *svLAAOs*, essas enzimas são alvos de diversos estudos que avaliam diversos efeitos tóxicos farmacológicos como citotoxicidade e atividades antiparasitária, antiviral e bactericida (IZIDORO et al., 2014).

Meléndez-Martínez e colaboradores (2017) descreveram que o H₂O₂ gerado pela catálise das *svLAAOs* pode causar um estresse oxidativo na hemoglobina, oxidando-a em

metahemoglobina. Complementarmente, estudos já relataram uma correlação da peçonha ofídica com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SUNITHA et al., 2015; SANTHOSH *et al.*, 2013a, SANTHOSH et al., 2013b; SANTHOSH *et al.* 2016). Santhosh e colaboradores (2012a), descreveram que os eritrócitos são altamente susceptíveis a oxidação mediada pelo H₂O₂. A presença de svLAAOs na composição das peçonhas botrópicas já foram relatadas (STÁBELI et al., 2004; FRANÇA et al., 2007).

William e colaboradores (2018), inferiram que o H₂O₂ pode interagir com o ferro (Fe²⁺) presente na hemoglobina e gerar outras EROs pela reação de Fenton; contudo, em seus estudos com a peçonha de *N. nigricollis* foi evidenciado que a peçonha dessa serpente não apresenta svLAAO, porém, foi observado uma abundância da enzima Fosfolipase A₂ (PLA₂), permitindo que os autores inferissem que a atividade desempenhada pelas PLA₂s pode estar indiretamente relacionada com o efeito oxidativo observado (fig. 12). De acordo com a teoria descrita por William et. Al (2018), a presença e ação das PLA₂s podem também estar contribuindo para a oxidação da hemoglobina observada nos nossos estudos.

Figura 12 – Oxidação da hemoglobina causado pela peçonha ofídica



A fosfolipase A₂ presente na peçonha provocaria lise celular, expondo a oxihemoglobina. Os componentes presentes na peçonha interagem com a oxihemoglobina oxidando-a. As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser gerada por duas vias, como um metabolito da desaminação da L-aminoácido oxidase (via da LAAO) ou pela peroxidação de lipídeos causado pela fosfolipase A₂ (via da PLA₂). Fonte: Adaptado de William et al. (2018)

6. CONCLUSÃO

A presença de diferentes quantidades das peçonhas bruta de *Bothrops alternatus*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, em soluções de hemoglobinas provenientes tanto de um concentrado de hemácias como o de sangue total, causaram aumento na taxa formação de metahemoglobina de forma dose dependente inversamente proporcional ao tempo, possibilitando inferir que essas peçonhas possam desencadear um processo de oxidação da hemoglobina. Os estudos atuais que avaliam o efeito oxidante de peçonhas ofídicas sobre a hemoglobina são escassos e não permitem compreender ou mesmo inferir como ocorre esse efeito oxidativo, a compreensão deste efeito se torna necessário, como relatado por Sharma (2015), o soro antiofídico não apresenta proteção contra os efeitos oxidantes causado pela peçonha. Hipóteses indicam a possibilidade desses efeitos estarem relacionados com a presença da L-aminoácido oxidase, ou mesmo, da Fosfolipase A₂. Estudos mais aprofundados necessitam ser realizados para que possa ser entendido o mecanismo de interação entre componentes ofídicos com a hemoglobina para causar a formação significativa de metahemoglobina observada.

7. REFERÊNCIAS

ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. J. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothropsasper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **J Proteome Res.**, 7:3556-71, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, **Acidente por Animais Peçonhentos**, disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>, Acessado 5 de setembro, 2019.

BRAUD, Sandrine; BON, Cassian; WISNER, Anne. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, 2000.

CALDERON, Leonardo A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

CAŁKOSIŃSKI, I.; SEWERYN, E.; ZASADOWSKI, A.; MAŁOLEPSZA-JARMOŁOWSKA, K.; DZIERZBA, K.; BRONOWICKA-SZYDEŁKO, A.; MIERZCHAŁA, M.; CEREMUGA, I.; ROSIŃCZUK-TONDERYS, J.; DOBRZYŃSKI, M.; GAMIAN, A. The Composition biochemical properties and toxicity of snake venoms. **Postepy higieny i medycyny doswiadczałnej.**, 28:262-72, 2010.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M., Venom, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, 583:1763-91, 2009.

CHIPPAUX, J.-P.; WILLIAMS, Vaughn; WHITE, Julian. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330-341, 2009

CORREA-NETTO, Carlos et al. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, 2010.

COSTA, Tássia R. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 23, 2014.

DAS, Tanaya et al. Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. **Toxicon**, v. 57, n. 7-8, p. 1065-1072, 2011.

DAVID, L. Nelson; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **6ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora**, 2014.

DEVLIN, Thomas M.; TOMA, Leny. **Manual de bioquímica: com correlações clínicas**. 2007.

DU, Xiao-Yan; CLEMETSON, Kenneth J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

FARAG, Mayada Ragab; ALAGAWANY, Mahmoud. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-biological interactions**, v. 279, p. 73-83, 2018.

FERREIRA, Sarah de Sousa et al. Estudos bioquímicos e toxinológicos comparativos entre as peçonhas de machos e fêmeas de *Bothrops matogrossensis*. 2017.

FRANÇA, Suzelei C. et al. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* l-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 355, n. 2, p. 302-306, 2007.

FURTADO, Ma FD et al. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991.

GUO, Chunmei et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 302-311, 2012.

GUO, Chunmei et al. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 302-311, 2012.

HAFFOR, A. S. A.; AL-SADOON, M. K. Increased antioxidant potential and decreased free radical production in response to mild injection of crude venom, *Cerastes cerastes gasperetti*. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 18, n. 1, p. 11-16, 2008.

IZIDORO, Luiz Fernando M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

JULIANA, C. et al. Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A2 from Bothrops brazili snake venom. **International journal of biological macromolecules**, 2017.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, Kenneth John. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1791-1799, 2005.

MAL, Asoke; CHATTERJEE, I. B. Mechanism of autoxidation of oxyhaemoglobin. **Journal of biosciences**, v. 16, n. 1-2, p. 55-70, 1991.

MAMEDE, Carla Cristine Neves et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, p. 37-45, 2016.

MATSUI, Taei; FUJIMURA, Yoshihiro; TITANI, Koiti. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1-2, p. 146-156, 2000.

MEIER, Juerg; STOCKER, Kurt. Effects of snake venoms on hemostasis. **Critical reviews in toxicology**, v. 21, n. 3, p. 171-182, 1991.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, David et al. Rattlesnake *C. m. nigrescens* venom induces oxidative stress on human erythrocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 24, 2017.

MURINELLO, António de et al. Meta-hemoglobinemia. *Medicina Interna*, v. 8, n. 4, p. 210-2016, 2001.

NASCIMENTO CANHAS, Isabela et al. Antibacterial activity of different types of snake venom from the Viperidae family against *Staphylococcus aureus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, 2017.

ÖHLER, Michaela et al. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2422-2437, 2010.

O'SHEA, Mark. **The Book of Snakes: A life-size guide to six hundred species from around the world**. University of Chicago Press, 2018.

PAIXÃO JÚNIOR, Otacílio Benício da et al. Estudos comparativos da composição proteica e dos efeitos citotóxico, oxidante, antioxidante e coagulante causados pelas peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*. 2017.

PERCHUC, Anna Maria et al. The Potential of *Bothrops moojeni* Venom in the Field of Hemostasis. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, v. 34, n. 4-5, p. 241-245, 2005.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

SANTHOSH, M. Sebastin et al. Propensity of crocin to offset *Vipera russelli* venom induced oxidative stress mediated neutrophil apoptosis: a biochemical insight. **Cytotechnology**, v. 68, n. 1, p. 73-85, 2016.

SANTHOSH, M. Sebastin et al. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 721-731, 2013b.

SANTHOSH, M. Sebastin et al. *Vipera russelli* venom-induced oxidative stress and hematological alterations: Amelioration by crocin a dietary colorant. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 1, p. 41-50, 2013a.

SANTOS, Cleiton Jose Costa et al. Análise espacial da ocorrência de acidentes ofídicos no Brasil e seus determinantes ambientais e socioeconômicos. 2018.

SHARMA, Rachana D. et al. Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: a novel and strategic neutralization by melatonin. **Journal of pineal research**, v. 59, n. 2, p. 240- 254, 2015.

SHUPE, Scott (Ed.). **Venomous snakes of the world: a manual for use by US Amphibious Forces**. Skyhorse Publishing Inc., 2013.

SILVA, Diana Pontes da et al. Análise comparativa da composição proteica e dos efeitos hemolítico, oxidante, antioxidante e coagulante das peçonhas brutas de machos e fêmeas da serpente *Bothrops leucurus*. 2017.

SPRAGUE, Randy S.; STEPHENSON, Alan H.; ELLSWORTH, Mary L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 9, p. 350-355, 2007.

STÁBELI, Rodrigo G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *B. alternatus* snake venom. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2881-2886, 2004.

STOCKER, K. F. Composition of snake venoms. In: **Medical use of snake venom proteins**. CRC Press Boca Raton, FL, 1990. p. 33-56.

SUHR, Sung-Min; KIM, Doo-Sik. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 224, n. 1, p. 134-139, 1996.

SUNITHA, K. et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. *Toxicon*, v. 98, p. 89-97, 2015.

TORTORA, Gerard J.; DERRICKSON, Bryan. **Corpo Humano-: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. Artmed Editora, 2016.

UETZ, Peter; HOŠEK, Jirí. The reptile database. Disponível: Acesso: 30/07/2019

VOET, Donald; VOET, Judith G. **Bioquímica**. Artmed Editora, 2013.

WHA. World Health Assembly, 71. (2018). “**Addressing the burden of snakebite envenoming.**” World Health Organization. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/279476>> Acesso em: 31 ago. 2019

WHO. World Health Organization. **Snake envenoming.** Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>> Acesso em: 31 ago 2019.

WILLIAMS, Harry et al. Impact of *Naja nigricollis* Venom on the Production of Methaemoglobin. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 539, 2018.

YAMASAKI, Simone Cristina et al. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 445-454, 2008.

ZAQUEO, K.D. **Purificação e caracterização parcial de uma serinoprotease inédita do veneno da serpente *Bothrops pirajai*.** 2011. 111f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2011.