



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba  
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900  
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



**LAYSSA GUALBERTO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* SOBRE EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

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

**João Pessoa – PB**

**2022**



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba  
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900  
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



**LAYSSA GUALBERTO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* SOBRE EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Priscila Marchi-Salvador

Co-orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

**João Pessoa – PB**

**2022**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586a Silva, Layssa Gualberto da.

Avaliação dos efeitos tóxicos da peçonha de Bothrops jararacussu sobre embriões e larvas de peixe-zebra (Danio rerio) / Layssa Gualberto da Silva. - João Pessoa, 2022.

85 f. : il.

Orientação: Daniela Priscila Marchi Salvador.

Coorientação: Davi Felipe Farias.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Neurotoxicidade. 2. Estresse oxidativo. 3. Toxicidade. 4. Proteínas ofídicas. I. Salvador, Daniela Priscila Marchi. II. Farias, Davi Felipe. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.8-026.86(043)



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba  
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900  
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



**LAYSSA GUALBERTO DA SILVA**

Dissertação de mestrado avaliada em 25/03/2022

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof.ª Dr.ª Daniela Priscila Marchi Salvador  
Universidade Federal da Paraíba  
Orientadora



---

Dr.ª Paula Helena Santa-Rita  
Universidade Católica Dom Bosco  
Examinador Externo



---

Prof.ª Dra. Glaucia Verissimo Faheina Martins  
Universidade Federal de Campina Grande  
Examinador Interno

## AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus e todo céu, pelo fim dessa etapa. “Devo a Ele (Deus) a oportunidade de chegar onde cheguei. Muitos tem a capacidade, mas não tem a oportunidade. Ele a deu para mim, não sei o porquê. Só sei que não poderia desperdiçá-la”. Ayrton Senna.

A minha mãe do céu, a santíssima Virgem Maria, por me acompanhar em cada momento da construção desse trabalho. Obrigada por estar comigo, principalmente nos momentos de dificuldade extrema. Quando acreditei que não havia motivos para continuar, o seu carinho maternal me conduziu pela mão para chegar ao fim. Obrigada minha querida mãe.

Aos meus pais José e Lúcia, minha irmã, Liane, meu esposo Iury e minha filha Cecília. Gratidão pela compreensão em todos esses anos para que essa dissertação chegasse ao fim. Tudo ofertado a vocês, com muito amor.

A minha Tia Maria do Carmo e Luzineide, meus sogros Maria de Jesus e Antônio e meu cunhado Dennis, uma imensa gratidão. Sem a ajuda de vocês com Cecília teria sido impossível concluir este trabalho. Obrigada por cada tempo que vocês disponibilizaram em me ajudar.

A Pedro Gabriel, Ana Luiza, Maria Caroline, Lucemberg e Pamela, amigos que levarei para toda a vida. Vocês são grandes presentes que pude receber nessa caminhada.

A ir. Priscila e Joyce Hanna por estarem sempre comigo em cada momento de alegria e de dificuldade. Agradeço o suporte que me deram para que eu pudesse chegar até aqui.

A Dra. Daniela Priscila, pelo acolhimento em seu laboratório e toda a equipe do CPR-LabTox (Pierri, Erica, Micaela) por todos os trabalhos desenvolvidos juntos. Passamos por muitos desafios, mais como todo ciclo, chegamos ao fim. Gratidão por todo aprendizado, que foi muito além do conteúdo. Foi um aprendizado de humanidade. Desejo que todos façam grandes progressos.

A Dr. Davi Felipe e equipe do LabRisco (Juliana, Igor, Rafael, Eduardo), por quem terei uma eterna dívida de gratidão. Como aprendi com vocês! Não as palavras que expressem o sentimento de cumplicidade, respeito e principalmente dedicação desempenhada por essa equipe maravilhosa. Gratidão pelo acolhimento.

A Dra. Gláucia e Dra. Paula por prontamente e gentilmente aceitarem participarem da banca da dissertação. Tenho certeza que levarei sempre comigo o aprendizado recebido de vocês durante esse momento.

## RESUMO

O ofidismo é uma doença negligenciada responsável por atingir aproximadamente 2,7 milhões de pessoas no mundo, afetando principalmente países tropicais e subtropicais. No Brasil, 90% dos casos notificados e identificados destes acidentes são causados por serpentes do gênero *Bothrops*. A *Bothrops jararacussu* apresenta relevância clínica, sendo sua peçonha composta por substâncias capazes de desencadear efeitos locais e sistêmicos culminando no desenvolvimento de morbidades e/ou mortalidade do indivíduo acometido. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos desencadeados pela presença da peçonha sobre o sistema modelo embrião e larvas de peixe-zebra. A estabilidade da peçonha de *B. jararacussu* sob as condições utilizadas nos experimentos de toxicidade em embriões e larvas de peixe-zebra foi avaliada através da mensuração dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada do plasma humano citratado na presença de diferentes quantidades da peçonha e em distintos tempos de exposição. Complementarmente, foram avaliadas a taxa de mortalidade, alterações morfológicas, movimentos espontâneos e batimentos cardíacos, de embriões, bem como determinados parâmetros de toxicidade e alterações no perfil bioquímico das enzimas biomarcadoras de toxicidade (glutathione-S-transferase, catalase, lactato desidrogenase, e acetilcolinesterase) das larvas de peixe-zebra após a exposição à peçonha de *B. jararacussu*. A toxicidade aguda foi avaliada por exposição semi-estática de embriões e larvas de peixe-zebra à peçonha durante 96 horas. Nossos resultados indicaram que a peçonha de *B. jararacussu* causa toxicidade em embriões e larvas de peixe-zebra, causando mortalidade de embriões nas primeiras 24 horas de exposição, além de alterar o número de movimentos espontâneos da cauda e a atividade de acetilcolinesterase. Também foi verificada alterações nas atividades das demais enzimas antioxidantes avaliadas. A avaliação destes resultados nos permite sugerir que os efeitos tóxicos causados pela presença da peçonha nos estágios iniciais do desenvolvimento do peixe-zebra são mediados, por ação neurotóxica, indução de estresse oxidativo e metabólico possivelmente causados por componentes de baixa massa molecular e/ou proteínas que compõe a peçonha. Avaliações toxinológicas utilizando o peixe-zebra como modelo são escassas, no entanto, este estudo apresentou resultados promissores que fomentaram o desenvolvimento de futuras pesquisas em toxinologia ofídica usando este animal como organismo modelo.

**Palavras-chaves:** neurotoxicidade, estresse oxidativo, toxicidade, proteínas ofídicas.

## ABSTRACT

Ophidism is a neglected disease responsible for affecting approximately 2.7 million people worldwide, mainly affecting tropical and subtropical countries. In Brazil, 90% of the reported and identified cases of these accidents are caused by snakes of the *Bothrops* genus. *Bothrops jararacussu* has clinical relevance, and its venom is composed of substances capable of triggering local and systemic effects, culminating in the development of morbidities and/or mortality in the affected individual. The present study aimed to evaluate the toxic effects triggered by the presence of the venom on the zebrafish embryo and larvae model system. The stability of *B. jararacussu* venom under the conditions used in the toxicity experiments in zebrafish embryos and larvae was evaluated by measuring the prothrombin and activated partial thromboplastin times of citrated human plasma in the presence of different amounts of the venom and in different exposure times. In addition, the mortality rate, morphological alterations, spontaneous movements and heart beats of embryos were evaluated, as well as certain parameters of toxicity and alterations in the biochemical profile of the biomarker enzymes of toxicity (glutathione-S-transferase, catalase, lactate dehydrogenase, and acetylcholinesterase) of zebrafish larvae after exposure to *B. jararacussu* venom. Acute toxicity was assessed by semi-static exposure of zebrafish embryos and larvae to the venom for 96 hours. Our results indicated that *B. jararacussu* venom causes toxicity in zebrafish embryos and larvae, causing embryo mortality in the first 24 hours of exposure, in addition to altering the number of spontaneous tail movements and acetylcholinesterase activity. Changes in the activities of the other antioxidant enzymes evaluated were also verified. The evaluation of these results allows us to suggest that the toxic effects caused by the presence of the venom in the early stages of zebrafish development are mediated, by neurotoxic action, induction of oxidative and metabolic stress possibly caused by low molecular weight components and/or proteins that makes up the venom. Toxinological evaluations using zebrafish as a model are scarce, however, this study presented promising results that encouraged the development of future research in snake toxinology using this animal as a model organism.

**Keywords:** neurotoxicity, oxidative stress, toxicity, ophidian proteins.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |                                              |
|------------------|----------------------------------------------|
| AChE             | Acetilcolinesterase                          |
| BPPs             | Peptídeos Potencializadores de Bradicinina   |
| BthA-I           | Bothropstoxina A – I                         |
| BthTX-I          | Bothropstoxina – I                           |
| BthTX-II         | Bothropstoxina – II                          |
| CAT              | Catalase                                     |
| CEUA             | Comitê de Ética de Animais em Pesquisa       |
| CriSP            | Proteína Secretora Rica em Cisteína          |
| CTL              | Lectina do Tipo C                            |
| DIS              | Desintegrina                                 |
| E.C.             | Comissão de Enzimas                          |
| FDP              | Produto de Degradação do Fibrinogênio        |
| FET              | Teste de Toxicidade em Embriões de Peixes    |
| GST              | Glutathione S-transferase                    |
| HPF              | Horas Pós a Fertilização                     |
| INR              | Razão Normalizada Internacional              |
| IRA              | Insuficiência Renal Aguda                    |
| kDa              | Kilo Dalton                                  |
| LAAOs            | L-aminooxidase                               |
| LC <sub>50</sub> | Concentração Letal Média                     |
| LDH              | Lactato Desidrogenase                        |
| LOAEL            | Nível Mais Baixo de Efeito Adverso Observado |
| M                | Molar                                        |
| mM               | Milimolar                                    |
| MVC              | Componentes Menores de Veneno                |
| NIP              | Peptídeo Natiurético                         |
| NGF              | Fator de Crescimento Nervoso                 |
| NOAEL            | Nível de Efeito Adverso Observado            |

|                    |                                                             |
|--------------------|-------------------------------------------------------------|
| OEDC               | Organisation for Economic Co-operation and Development      |
| OMS                | Organização Mundial da Saúde                                |
| PBS                | Tampão Fosfato Salina                                       |
| pH                 | Potencial Hidrogeniônico                                    |
| PLA <sub>2</sub> s | Fosfolipases A <sub>2</sub>                                 |
| RPM                | Rotação Por Minuto                                          |
| SAB                | Soro Antibotrópico                                          |
| SABC               | Soro Antibotrópico-Crotálico                                |
| SABL               | Soro Antibotrópico-Laquélico                                |
| SAC                | Soro Anticrotálico                                          |
| SAE                | Soro Antielapídico                                          |
| SAL                | Soro Antilaquélico                                          |
| SVMP               | Metaloproteinase da Peçonha de Serpente                     |
| SVSP               | Serinoproteinase da Peçonha de Serpente                     |
| T                  | Tempo                                                       |
| TP                 | Tempo de Protrombina                                        |
| TTPa               | Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada                     |
| UNIPOM             | Unidade de Produção de Organismos Modelos Não Convencionais |
| VEGF               | Fator de Crescimento Vascular Endotelial                    |
| WHO                | World Health Organization                                   |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Características morfológicas de serpentes peçonhentas e não peçonhentas...                                                                                                                                                                                                             | 13 |
| <b>Figura 2</b> – Anatomia bucal e glândula produtora de peçonha das serpentes solenóglifas                                                                                                                                                                                                              | 15 |
| <b>Figura 3</b> – <i>Bothrops jararacussu</i> e sua distribuição no Brasil.....                                                                                                                                                                                                                          | 17 |
| <b>Figura 4</b> - Percentual de acidentes ofídicos por serpentes notificados em 2019.....                                                                                                                                                                                                                | 22 |
| <b>Figura 5</b> – Distribuição de animais utilizados em pesquisas científicas.....                                                                                                                                                                                                                       | 24 |
| <b>Figura 6</b> – Espécimes adultos de peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ).....                                                                                                                                                                                                                           | 24 |
| <b>Figura 7</b> – Ciclo de vida do peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ).....                                                                                                                                                                                                                               | 25 |
| <b>Figura 8</b> – Atividade coagulante do plasma citratado humano na presença da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), solubilizada em solução PBS. Experimento realizado em triplicata. TP (Tempo de Protrombina) e TTPA (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada)..... | 34 |
| <b>Figura 9</b> – Avaliação da atividade coagulante em plasma citratado humano na presença da peçonha de <i>B. jararacussu</i> após 96 horas de incubação nas condições do teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra.....                                                                     | 35 |
| <b>Figura 10</b> – Efeitos tóxicos em embriões de peixe-zebra expostos a peçonha de <i>B. jararacussu</i> por 96 horas.....                                                                                                                                                                              | 39 |
| <b>Figura 11</b> – Contrações espontâneas da cauda de embriões de peixe-zebra com 24-26 hpf na presença de concentrações crescentes da peçonha de <i>B. jararacussu</i> : A atividade neurotóxica foi observada ao comparar os grupos controle e o tratado nas concentrações subletais da peçonha.....   | 43 |
| <b>Figura 12</b> – Frequência dos batimentos cardíacos de embriões de peixe-zebra, com aproximadamente 48 hpf, expostos a concentrações crescentes da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> : Atividade cardiotoxica não foi identificada.....                                                          | 46 |
| <b>Figura 13</b> - Efeito da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> na atividade de biomarcadores em larvas de peixe-zebra após exposição de 96 h.....                                                                                                                                                   | 48 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Sintomatologia clínica e soroterapia específica para tratamento de ofidismo..... | 23 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## SUMÁRIO

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                               | <b>12</b> |
| 1.1 Serpentes.....                                                                     | 12        |
| 1.2 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .....                                          | 14        |
| 1.2.1 <i>Bothrops jararacussu</i> .....                                                | 16        |
| 1.3 Principais constituintes proteicos da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> ..... | 17        |
| 1.4 Epidemiologia e fisiopatologia do ofidismo.....                                    | 21        |
| 1.5 Peixe-zebra como organismo modelo experimental.....                                | 23        |
| 1.6 Utilização do peixe-zebra em estudos com peçonhas ofídicas.....                    | 26        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                | <b>27</b> |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                                | 27        |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                                         | 27        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                      | <b>28</b> |
| 3.1 Obtenção das amostras biológicas e aspectos éticos.....                            | 28        |
| 3.1.1 Peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> .....                               | 28        |
| 3.1.2 Plasma humano citratado.....                                                     | 28        |
| 3.1.3 Embriões e larvas de peixe-zebra.....                                            | 29        |
| 3.1.4 Aspectos Éticos.....                                                             | 29        |
| 3.2 Atividade coagulante da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> .....         | 30        |
| 3.3 Teste de toxicidade aguda.....                                                     | 31        |
| 3.4 Avaliação das funções cardíacas e motoras.....                                     | 31        |
| 3.5 Ensaio enzimáticos.....                                                            | 32        |
| 3.6 Análises estatísticas.....                                                         | 33        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                   | <b>34</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>                                                                | <b>55</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                               | <b>56</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                     | <b>74</b> |
| <b>APÊNDICES.....</b>                                                                  | <b>82</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

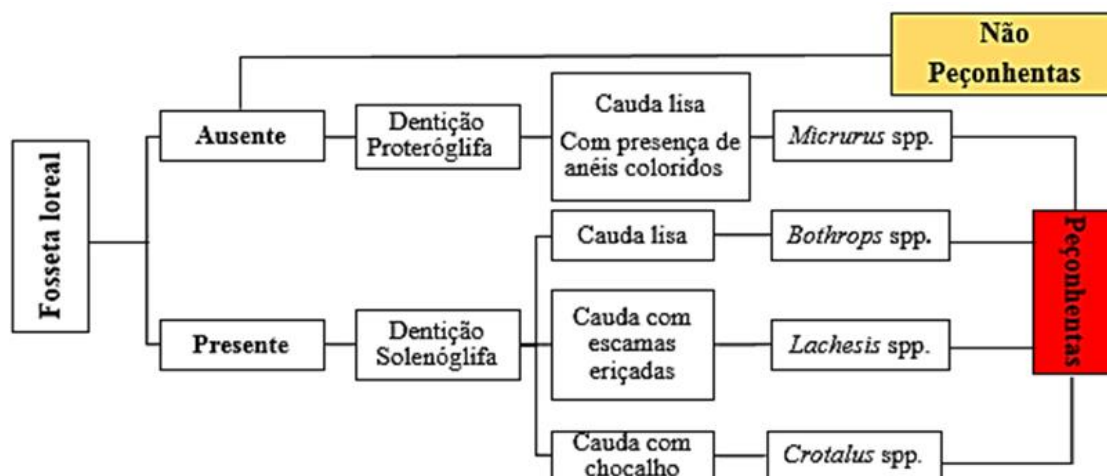
### 1.1 Serpentes

As serpentes são animais pertencentes à classe Reptilia, sendo mundialmente conhecidas 3.921 espécies, que constituem o segundo maior grupo de répteis, apresentando assim, uma ampla diversidade, superando a classe de mamíferos (ZACARIOTTI e GUIMARÃES, 2010; MELLO, 2013, UETZ *et al.*, 2021). Morfologicamente são identificadas pelo formato alongado do corpo, presença de escamas, ausência de pálpebras móveis e ouvido externo, elasticidade dos membros cranianos, ápodas, além de serem ectotérmicas e apresentarem quimiorreceptores. Quanto à reprodução, se classificam como vivíparas (*Bothrops* e *Crotalus*) ou ovíparas (*Micrurus* e *Lachesis*) (SANTOS, 2013; BRAZ, 2013).

Atualmente, o Brasil ocupa a 3ª posição entre os países com a mais rica diversidade de répteis, destes, incluem-se 422 espécies serpentes (COSTA e BÉRNILS, 2018; UETZ *et al.*, 2021). Das espécies de serpentes brasileiras já descritas, 67 apresentam interesse toxinológico, pois são consideradas peçonhentas e estão distribuídas entre as famílias Viperidae e Elapidae. A família Viperidae apresenta 32 espécies alocadas em quatro gêneros: *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* enquanto que a família Elapidae é constituída por 35 espécies catalogadas em um único gênero, *Micrurus* (UETZ *et al.*, 2021).

Algumas características morfológicas são importantes para auxiliar na diferenciação de espécies peçonhentas e não peçonhentas (Figura 1): 1. Presença de fosseta loreal (órgão termorreceptor situado entre o olho e a narina que auxilia na localização de presas endotérmicas); 2. Dentes inoculadores de peçonha; 3. Cauda característica (lisa ou com presença de chocalho ou eriçada presentes nos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, respectivamente). As serpentes do gênero *Micrurus*, apesar de serem peçonhentas, são a exceção a essas características, apresentando dentição opistóglifa imóvel e ausência de fosseta loreal (PINHO e PEREIRA, 2001; FREITAS *et al.*, 2020).

**Figura 1** - Características morfológicas de serpentes peçonhentas e não peçonhentas.



**Fonte:** Adaptado de MINISTERIO DA SAÚDE, 2001; FRANÇA, *et al.*, 2017.

Atualmente, a família Viperidae é composta por 327 espécies distribuída em todos os continentes. Podendo ser encontradas em diferentes tipos de ambientes, terrestres e aquáticos, sendo a Ásia o continente com o maior percentual de espécies desta família (56,2%) (MELLO, 2013; NASCIMENTO, 2014; UETZ *et al.*, 2021). No Brasil, esta família está distribuída em todo território nacional indicando que a evolução adaptativa a esses ambientes favoreceu o desenvolvimento diversificado de aspectos morfofisiológicos destas espécies (ZACARIOTTI e GUIMARÃES, 2010; COSTA e BÉRNILS, 2018).

Segundo Zheng e Wiens (2016), os representantes da família Viperidae do Novo Mundo constituem um táxon monofilético, ou seja, forma um clado que inclui um ancestral comum e todos seus descendentes. Estes descendentes por sua vez, estão associados a outros colubrioides, com base em estudos embriológicos, etológicos, moleculares e morfológicos (SOUZA e ROCHA, 2015).

Em 1999, McDiarmid e colaboradores dividiram a família Viperidae em quatro subfamílias: Azemiopinae, Causinae, Viperinae e Crotalinae. Em 2008, Wüster e colaboradores reformularam esta divisão em três subfamílias: *i.* Azemiopinae – sudeste da Ásia; *ii.* Viperinae – Eurásia e África; *iii.* Crotalinae – Américas, Oceania, sul da Ásia e Europa.

A subfamília Crotalinae constitui a mais diversa e ampla linhagem de serpentes distribuídas mundialmente. Atualmente, essa subfamília é composta por 263 espécies e subdividida em 28 gêneros, dos quais o gênero *Bothrops* se destaca por ser um dos principais causadores de acidentes ofídicos em território nacional (DEBONO *et al.*, 2016; ALENCAR *et al.*, 2016; HAMDAM *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2020; UETZ *et al.*, 2021).

## 1.2 Serpentes do Gênero *Bothrops*

A etimologia da palavra *Bothrops* provém do grego onde “*bothros*” significa fosseta e “*ops*” significa face, referência à presença da fosseta loreal presente em serpentes deste gênero (MACHADO, 2010). Estudos filogenéticos e biogeográficos realizados por Wüster e colaboradores (2008) sugeriram que este gênero chegou na América do Sul constituindo uma linhagem única no mioceno médio, a 13 milhões de anos.

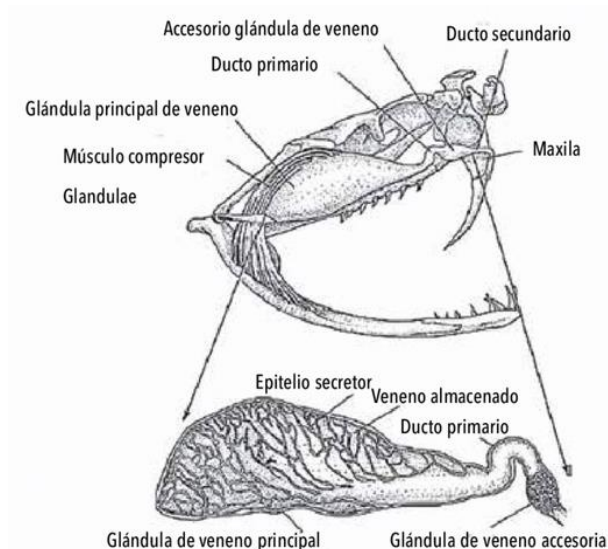
O hábito alimentar generalista das serpentes ancestrais do gênero *Bothrops*, a ausência de nichos ocupados por outros viperídeos e a diversidade de ambiental foram possíveis fatores determinantes para a colonização, diversidade morfológica e taxonômica destes animais na América do Sul (MORAES, 2008).

No Brasil, 28 espécies compõem o gênero *Bothrops* com ampla distribuição geográfica (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pampas, Pantanal, Mata Atlântica e ilhas continentais). Habitam, principalmente, zonas rurais e periferias de grandes cidades, com preferência a ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (LEÃO, 2012; UETZ *et al.*, 2021).

Serpentes do gênero *Bothrops* apresentam aspectos conservados quanto à viviparidade e ciclos reprodutivos sazonais, sofrendo modificação devido à variação climática entre regiões. Um exemplo são os períodos de nascimentos diferenciados: em estações mais 15 quentes em regiões subtropicais e estações chuvosas em regiões tropicais, onde o acasalamento ocorre nos primeiros períodos do ano entre fevereiro e maio (BISNETO e KAEFER, 2019).

A dentição solenóglifa (Figura 2) das serpentes deste gênero é caracterizada pela presença de um par de dentes caniculados móveis na região anterior ao maxilar, conectados com a glândula de veneno, possuindo um canal por onde a peçonha é inoculada. A alta capacidade de inoculação de veneno ocorre através da grande abertura bucal que facilita o posicionamento dos dentes em relação à presa, seja para processos de captura de presas e/ou defesa (LOBO *et al.*, 2014; PAIXÃO-JUNIOR, 2017; EVANS *et al.*, 2019). Portanto, o envenenamento ofídico ocorre quando a serpente consegue inocular o conteúdo de suas glândulas venenosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

**Figura 2** - Anatomia bucal e glândula produtora de peçonha das serpentes solenóglifas.



**Fonte:** Adaptado de KARDONG *et al.* (2009).

Nos últimos anos, estudos farmacológicos e estruturais de compostos bioativos isolados de peçonhas ofídicas têm sido realizados e o êxito destes resultados já foi aplicado na produção de diversos fármacos. Um exemplo clássico de um fármaco desenvolvido com base na observação do desencadeamento do efeito sistêmico causado pelo empeçonhamento é o Captopril® (Capoten), um dos medicamentos mais vendidos no mundo e eficaz no controle da hipertensão. Este medicamento possui como princípio ativo um oligopeptídio 16 (piroglutamil) rico em prolina isolado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* (HAYASHI e CAMARGO, 2005). O captopril® age como um inibidor da enzima de conversão da angiotensina I em angiotensina II (potente vasoconstritor), produzindo vasodilatação periférica e diminuindo a pressão arterial.

Diversos outros fármacos fundamentados em observações de efeitos causados pelo ofidismo já foram desenvolvidos e estão sendo produzidos e/ou utilizados para o tratamento de diversas doenças: 1. Tirofibana (Aggrastat®), medicamento inibidor de glicoproteína plaquetária (GP) IIb/IIIa, criado a partir de desintegrinas presentes na peçonha de *Echis carinatus*. Este medicamento foi produzido no intuito de reduzir taxas de eventos trombóticos cardiovasculares, como o ataque cardíaco (EL-AZIZ *et al.*, 2019); 2. Eptifibatide (Integrilin®), medicamento antiplaquetário heptapeptídeo sintético derivado da desintegrina Barburin isolada de *Sistrurus miliarius barbouri*. Interage com as glicoproteínas (IIb/IIIa), sendo a ativação destas a principal responsável pela agregação plaquetária, sendo este medicamento, utilizado para tratamento de síndromes coronárias agudas (LAZAROVICI *et al.*, 2019); 3. Cenderitide,

peptídeo natiurético e hipotensivo em estudo presente na peçonha de *Dendroaspis angusticeps* que apresenta efeito hipotensivo com baixos efeitos colaterais tendo como alvo Receptor B de Peptídeo Natiurético, sendo um possível candidato para de desenvolvimento de fármacos para tratamento de insuficiência cardíaca (WAHEED *et al.*, 2017; ICHIKI *et al.*, 2020); 4. Cobratide (Cobrotoxina), uma  $\alpha$ -neurotoxina purificada da peçonha de *Naja naja atra*, aprovada como analgésico na China pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos em 1940. Atualmente, estudos sugerem a utilização da Cobrotoxina para prevenção e alívio dos sintomas da COVID-19, através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, inibição da proliferação de células T CD8, além de possível atividade antiviral (LIN *et al.*, 2020).

### 1.2.1 *Bothrops jararacussu*

A espécie *Bothrops jararacussu* (Figura 3) é comumente encontrada na Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (BA, MG, ES, RJ, SP, MS, PR, SC e RS), sendo esta uma serpente de grande porte que pode exceder 1,8 m de comprimento (CAMPBELL e LAMAR, 1989; PUZZI *et al.*, 2008; CORREA-NETO *et al.*, 2010). Apresenta dimorfismo sexual, sendo as fêmeas de coloração amarelada e maiores que os machos, enquanto que os machos 17 apresentam coloração cinza, com manchas triangulares marrom-escuras (MELGAREJO, 2009).

Esta espécie é terrícola e apresenta atividade tanto diurna como noturna, com reprodução vivípara, o que ocorre na segunda metade e final de estações chuvosas, gerando entre 13 a 73 filhotes. Para favorecer a captura de presas ectotérmicas como anuros e lagartos, as serpentes mais jovens utilizam a tática de engodo caudal, que consiste na atração de presas que se alimentam de animais semelhantes a vermes, através de movimentos ondulatórios com cauda (COSTA *et al.*, 2010; GIOZZA, 2020). As serpentes adultas compõem sua alimentação não apenas de animais ectotérmicos, mais também de roedores (COSTA *et al.*, 2010).

**Figura 3** - *Bothrops jararacussu* e sua distribuição no Brasil. **A.** Espécime de *B. jararacussu* fêmea adulta; **B.** Espécime de *B. jararacussu* macho adulto; **C.** Mapa de distribuição geográfica da espécie *Bothrops jararacussu* nos estados brasileiros.



Fonte: COSTA (2010); KLIMANATURALI, (2011); AGUIAR *et al.*, (2020).

### 1.3 Principais constituintes proteicos da peçonha *Bothrops jararacussu*

Os constituintes da peçonha bruta de serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pelo espectro observado na sintomatologia pós-acidente ofídico. Por esta razão, muitos desses componentes já foram isolados e tiveram seus mecanismos de ação elucidados (FERRAZ *et al.*, 2019; HATAKEYAMA *et al.*, 2020).

As peçonhas ofídicas, dentre os animais peçonhentos, são as mais complexas devido à ampla diversidade de componentes. Aproximadamente 90% do peso seco da peçonha é constituído por enzimas e toxinas não enzimáticas, proteínas e proteínas não tóxicas e frações não proteicas como carboidratos, lipídios, amins biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (LEMOS *et al.*, 2009).

A peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* é constituída por proteínas das classes das L-aminoxidases (LAAOs), Metaloproteínas, Serinoproteases, Fosfolipase A2 (PLA2), Lectinas do tipo C, Proteínas Ricas em Cisteínas e Fator de Crescimento Nervoso (NGF), entre

outros componentes, os quais são responsáveis pela sintomatologia apresentada pós-acidente ofídico (KASHIMA *et al.*, 2004).

#### 1.3.1 Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>S, E.C. 3.1.1.4)

As Fosfolipases (PLs) são enzimas naturalmente presentes em células animais e vegetais, bactérias e fungos, sendo que cada célula pode ter mais de um tipo de fosfolipases. Considerando sua relevância fisiológica, estas moléculas estão envolvidas em uma diversidade de processos, sendo atribuindo a elas três funções principais: *i.* Enzimas digestivas (para aquisição de nutrientes comum em peçonha de serpentes); *ii.* Homeostases de membrana através de manutenção e remodelação; *iii.* Regulação de mecanismos celulares que geram moléculas bioativas (WAITE, 1987; KÖHLER *et al.*, 2006; ARAUJO, 2018).

As PLs são responsáveis pela ação hidrolítica em glicerofosfolípides, hidrolisando uma ou mais ligações ésteres, enquadradas em duas categorias: Acil-hidrolases (ação sobre ligações éster caboxílicas) e Fosfodiesterases (hidrolisam ligações fosfodiéster). As PLs são classificadas em cinco grupos (A1, A2, B, C e D) de acordo com o sítio de clivagem dos gliceofosfolípides (HARRIS; SCOTT-DAVEY; 2013; MAGALHÃES, 2017).

As Fosfolipases A atuam realizando catálise para remoção da porção de ácidos graxos esterificado ao glicerol, gerando lisolectina, componente tóxico existente na peçonha de serpentes, que podem ocasionar hemólise por destruição de membrana. Esta enzima apresenta duas isoformas PLA<sub>1</sub> e PLA<sub>2</sub>, diferenciadas pelo lisofosfolípídeo formado (NIEWERTH; KORTING 2001; ARAUJO, 2018).

As PLA<sub>2</sub>S estão presentes em 95% das serpentes das famílias Viperidae e Elapidae, o que pode explicar a neutralização cruzada de venenos por soros anti-ofídicos diferentes (TASOULIS e ISBISTER, 2017). A maioria das PLA<sub>2</sub>S botrópicas são básicas, podendo ou não apresentar atividade catalítica (SOARES *et al.*, 2004; LOMONTE *et al.*, 2011). Segundo Sobrinho e colaboradores (2018), os mecanismos fisiopatológicos das PLA<sub>2</sub>S ácidas do gênero *Bothrops* estão pouco descritos. Os efeitos toxinológicos dessas enzimas incluem: neurotoxicidade pré e pós-sináptica, mionecrose, hemólise, alterações renais e coagulação, hipotensão e edema (SPOLAORE *et al.*, 2019).

Outras ações como atividades antibacteriana, antitumorais e antiangiogênicas de algumas PLA<sub>2</sub>S isoladas de peçonhas ofídicas já foram descritas, tendo assim um amplo efeito

farmacológico (ZOUARI-KESSENTINI *et al.*, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2016; MOURA, 2016; CANHAS *et al.*, 2017).

Análise de transcriptômica da peçonha de *Bothrops jararacussu* realizada por Kashima e colaboradores (2004) demonstrou que 35% dos transcritos correspondem as PLA<sub>2</sub>S que pesam entre 12-14 kDa. As PLA<sub>2</sub>S podem ser classificadas como básicas ou ácidas, sendo as básicas BthTX-I (Lys49-PLA<sub>2</sub>S) (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988) e BthTX-II (Asp49-PLA<sub>2</sub>S) (GUTIÉRREZ *et al.*, 1991) representam 91,3% da constituição de PLA<sub>2</sub>S e PLA<sub>2</sub>S ácida BthA-I (Asp49-PLA<sub>2</sub>S) (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002) correspondente a 0,7% da constituição (KASHIMA *et al.*, 2004; CORREA-NETO *et al.*, 2010; PEREIRA DOS REIS *et al.*, 2019).

### 1.3.2 Serinoprotease (E. C. 3.4.2.1.)

As serinoproteases ofídicas são glicoproteínas monoméricas sintetizadas como zimógenos com massa molecular de 26 a 67 kDa. Apresentam região cataliticamente conservada (His57, Asp102 e Ser105) sendo consideradas enzimas multifuncionais por serem capazes de atuar sobre substratos diversos (ISABEL *et al.*, 2016).

As serinoproteases ofídicas são geralmente classificadas como trombina-like (snake venom thrombin-like enzymes, svTLEs), pois essas enzimas apresentam atividade semelhante à trombina devido à sua capacidade de clivar o fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeo A, fibrinopeptídeo B ou ambos (BOROTELO *et al.*, 2002; CARONE *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021).

Complementarmente, a ação pró coagulante das serinoproteases pode ser comparada a atividade das enzimas de coagulação endógenas sanguínea, pois essas interferem na cascata de coagulação promovendo a ativação do plasminogênio, da proteína C e dos fatores V e X, bem como causando fibrinólise e agregação plaquetária (BOROTELO *et al.*, 2002; ULLAH *et al.*, 2012). Boldrini-França e colaboradores (2020) descreveram o efeito inibitório de uma serino protease do tipo trombina-like isolada da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* sobre um canal voltagem-dependente de potássio relatando que esta svTLE apresentou esse mecanismo independente de sua atividade enzimática.

As serinoproteases correspondem a 2% do transcriptoma da peçonha de *Bothrops jararacussu* (KASHIMA *et al.* 2004). Nesta peçonha já foram descritas a Jararacussina-I (BOROTELO *et al.*, 2002), uma serinoprotease do tipo trombina-like que atua na clivagem do fibrinogênio liberando fibrinopeptídeo A e fibrinopeptídeo B e a BjussuSP-I (SANT'ANA *et al.*, 2008), uma enzima semelhante a trombina que apresenta atividade proteolítica sobre

fibronegênio de cadeia A $\alpha$  e atividade catalítica sobre a fibrina, sem atividade miotóxica ou hemorrágica.

### 1.3.3 L-aminooxidase (LAAOs, E.C. 1.4.3.2)

As L-aminooxidases, são flavoproteínas que resultam na coloração amarelada apresentada pela peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, correspondendo a aproximadamente 15% da sua proteômica, com massa molecular de 65 kDa. Até o presente, na peçonha de *Bothrops jararacussu* já foram descritas duas LAAOs, a BjussuLAAO-I (FRANÇA *et al.*, 2007) e BjussuLAAO-II (CARONE *et al.*, 2017) uma LAAO ácida.

Essas enzimas são responsáveis por realizar a desanimanação de l-aminoácidos no  $\alpha$ -cetoácido correspondente, liberando amônia (NH<sub>3</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). As LAAOs ofídicas são responsáveis por desencadear atividades citotóxicas, inibição da agregação plaquetária, hemólise, apoptose e hemorragia (COSTA, 2012, SOUSA *et al.*, 2013; CARONE *et al.*, 2017; ULLAH, 2020, BARBOSA *et al.*, 2021).

### 1.3.4 Metaloproteinases (E.C. 3.4.2.4)

As metaloproteinases são proteases, zinco dependentes, com massa molecular acima de 50 kDa. Apresentam três resíduos de His no seu motivo catalítico, sendo esta uma característica estruturalmente conservada apresentada por essas enzimas (PALACIO *et al.*, 2017).

As metaloproteinases ofídicas (svMP) são classificadas de acordo com a composição dos seus domínios em: *i.* svMP-I: contém apenas um domínio catalítico zinco dependente para pode ter ação enzimática; *ii.* svMP-II: são mais complexas apresentando domínio desintegrina; *iii.* svMP-III: classe estruturalmente mais variada, contendo domínios de metaloproteinases, semelhantes a desintegrinas e ricos em cisteína (ZYCHAR *et al.*, 2020; OLAOBA *et al.*, 2020). Atuam no de sistema circulatório facilitando a dispersão de moléculas de com baixa massa molecular, como as fosfolipases, auxiliando na amplificação dos demais componentes tóxicos da peçonha (BICKLER, 2020). Apresentam também atividades fibrinogenolítica (clivagem das fibrinogenases  $\alpha$  ou  $\beta$ ), fibrinololítica, trombolítica e hemorrágica (MACÊDO e FOX, 2014; ASEGA *et al.*, 2020).

Até o presente, na peçonha de *Bothrops jararacussu* já foram descritas duas metaloproteínases, a BjussuMP-I (MAZZI *et al.* 2004) com ação hemorrágica inibida pela presença de EDTA, atividade de lise em coágulos de fibrina, além de apresentar atividade proteolítica sobre o fibrinogênio e a BjussuMP-II pertencente a classe de svMP-I (MARCUSI *et al.* 2007), com baixa atividade proteolítica sobre fibrinogênio, baixa ou nenhuma atividade hemorrágica e atividade inibitória sobre a agregação plaquetária.

#### 1.3.5 Lectinas do Tipo-C

São proteínas dependentes de íons  $\text{Ca}^{2+}$  presentes nas peçonhas ofídicas capazes de reconhecer carboidratos, sendo exclusivamente homodímeros ou homooligodímeros. Podem atuar como anticoagulante, agregante eritrocitário e como agonista de agregação plaquetária. (MORITA, 2005; OGAWA *et al.*, 2011). Até o presente momento, foi descrita na peçonha de *Bothrops jararacussu*, a BjcuL (PEREIRA-BITTENCOURT *et al.*, 1999), uma lectina do tipo C com especificidade para a ligação de unidades  $\beta$ -D-galactose capaz de induzir edema, aumentar a permeabilidade vascular e gerar atividade hemaglutinante, causada pela ligação com as frações de lactose eritrocitária (ELÍFIO-ESPOSITO *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2017).

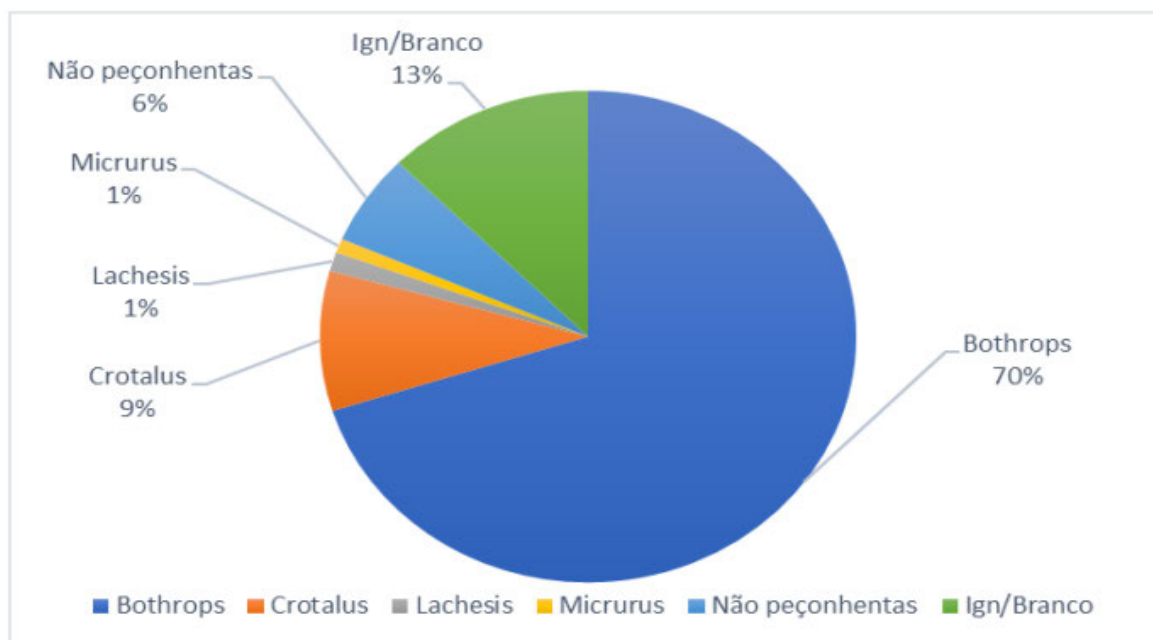
### 1.4 Epidemiologia e fisiopatologia do ofidismo

Segundo estudos epidemiológicos realizados por Chippaux e Goyffon (2008) e Gutiérrez (2011), os animais peçonhentos são os principais responsáveis por acidentes de emergência clínica, sendo as áreas rurais de países tropicais e subtropicais as zonas mais atingidas (FREITAS *et al.*, 2020).

Dentre os acidentes causados por estes animais, o ofidismo se destaca por ser considerado um importante problema de saúde pública (ALMEIDA e MACEDO, 2015). Desde junho de 2017, o ofidismo foi inserido na lista de doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO). Estima-se que aproximadamente de 4,5 a 5,4 milhões de pessoas sofrem este tipo de acidente a cada ano, o que resulta, aproximadamente, em 1,8 a 2,7 milhões de casos de envenenamento e, destes, aproximadamente 81.000 a 138.000 pessoas morrem das complicações (WHO, 2021).

No Brasil, em 2021, 175.671 casos de acidentes por animais peçonhentos foram notificados, destes, 24.509 foram causados por serpentes sendo 80,5% dos casos identificados relacionados às serpentes da família Viperidae, com ênfase para os gêneros *Bothrops* (70,0%) (Figura 4) (BRASIL, 2021).

**Figura 4** - Percentual de acidentes ofídicos por serpentes notificados em 2019.



**Fonte:** Adaptado de BRASIL (2021).

A gravidade do acidente ofídico está associada a alguns fatores como o tempo entre o acidente e o atendimento, quantidade de peçonha inoculada, região anatômica atingida e grupo de risco da pessoa acometida (gestantes, crianças e idosos) (MELLO *et al.*, 2011). De acordo com Ferreira (2017), as manifestações clínicas pós-envenenamento são determinantes para o quadro clínico do paciente, podendo indicar o tipo de acidente e o tratamento adequado. Atualmente, o único tratamento recomendado é a administração endovenosa do soro antiofídico específico para cada serpente envolvida no acidente, imprescindíveis para reverter à maioria dos efeitos dos acidentes ofídicos minimizando a mortalidade e morbidade nos indivíduos acometidos (WHO, 2022) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Sintomatologia clínica e soroterapia específica para tratamento de ofidismo.

| <b>Tipo de Acidente</b> | <b>Sintomatologia clínica</b>                                                                                                                                                 | <b>Antiofídico específico</b>                             | <b>Ampolas</b>                          |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Botrópico</b>        | Dor e inchaço no local da picada, edema e equimose, hemorragia local e sistêmica, infecção, necrose e insuficiência renal                                                     | SAB <sup>1</sup> , SABL <sup>2</sup> ou SABC <sup>3</sup> | Leve: 2-4<br>Moderado: 4-8<br>Grave: 12 |
| <b>Crotálico</b>        | Local da picada não apresenta dor ou lesão evidente apenas sensação de formigamento, face miastênica, visão turva ou dupla, dores musculares generalizadas, náusea e cefaléia | SAC <sup>4</sup> ou SABC                                  | Leve: 5<br>Moderado: 10<br>Grave: 20    |
| <b>Laquético</b>        | Dor abdominal, vômitos, diarreia, bradicardia, tontura e hipotensão arterial.                                                                                                 | SABL ou SAL <sup>5</sup>                                  | Moderado: 10<br>Grave: 20               |
| <b>Elapídico</b>        | Dor de intensidade variável, visão borrada ou dupla, pálpebras caídas e aspecto sonolento, paralisia dos músculos respiratórios.                                              | SAE <sup>6</sup>                                          | Grave: 10                               |

SAB<sup>1</sup>: Soro antibotrópico, SABL<sup>2</sup>: Soro antibotrópico-laquético, SABC<sup>3</sup>: Soro antibotrópico-crotálico, SAC<sup>4</sup>: Soro anticrotálico, SAL<sup>5</sup>: Soro antilaquético e SAE<sup>6</sup>: Soro antielapídico.

**Fonte:** Adaptações de ALMEIDA *et al.* (2012) e BRASIL (2017).

### 1.5 Peixe-zebra como organismo modelo experimental

O desenvolvimento das pesquisas biomédicas é dependente da utilização de animais para conhecimento de efeitos biológicos em áreas como a farmacologia, fisiologia, bioquímica, genética, patologia, toxicologia entre outras (LIESCHKE e CURRIE, 2007; MENDES e SOUZA, 2017).

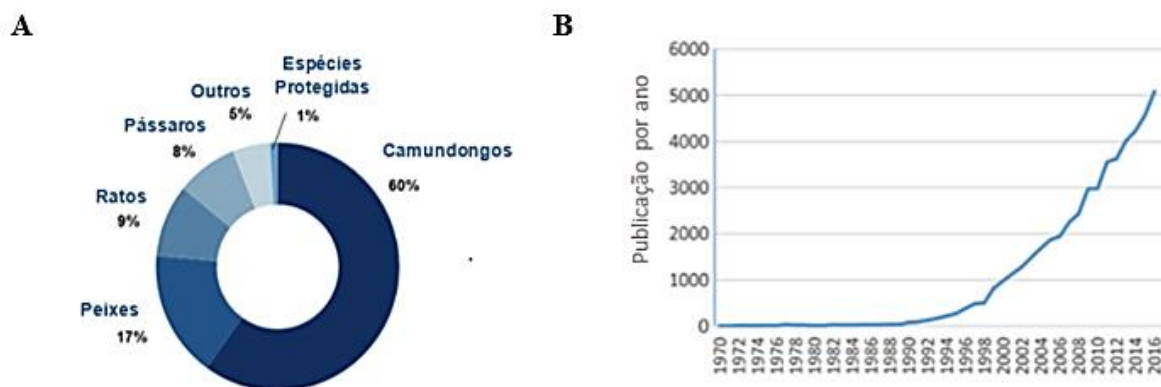
Os modelos animais utilizados na pesquisa podem ser divididos em dois grupos: *i.* Convencionais – modelos mais comuns, como os camundongos e ratos, e *ii.* Não convencionais – modelos que normalmente não são utilizados em rotinas experimentais, como por exemplo, primatas não-humanos e o peixe-zebra (*Danio rerio*) (VANDAMME, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; ZOUPA e MACHERA, 2017; ANDERSEN e WINTER, 2019).

Os mamíferos ainda são os animais mais utilizados em pesquisas, com ênfase na utilização de roedores (camundongos e ratos) (Figura 5A). Apesar de tais modelos serem bastante utilizados, apresentam alto custo de manutenção, necessitando de grandes espaços e consumo de grande quantidade de alimento (ZON e PETERSON, 2005; CAMPOS, 2016).

Como proposta de substituição da utilização dos mamíferos, os peixes vêm sendo empregados em pesquisas de diversas áreas. Nos últimos 40 anos, observou-se a crescente utilização do peixe-zebra em experimentos científicos como organismos-modelo não convencional (Figura 5B) (ZON e PETERSON, 2005; KHAN e ALHEWAIRINI, 2019;

TEAME *et al.*, 2019). Em 2018 na Grã-Bretanha, a maioria dos procedimentos experimentais (86%) utilizou roedores (camundongos e ratos) e peixes (Figura 6A).

**Figura 5** – Distribuição de animais utilizados em pesquisas científicas. **A.** Percentual de animais mais utilizados em experimentos científicos. **B.** Utilização do peixe-zebra como organismo modelo não convencional.



Fonte: GREAT BRITAIN (2018); MEYERS, (2018).

O *Danio rerio* (Figura 6) conhecido popularmente como peixe-zebra ou paulistinha é um peixe teleosteo de espécie monofilética da família Cyprinidae (SCHNEIDER *et al.*, 2009). São peixes tropicais de água doce encontrados em rios, córregos e canais, sendo nativo da região sul da Ásia, incluindo Índia, Mianmar, Bangladesh e Nepal (HOLTZMAN *et al.*, 2016).

**Figura 6** - Espécimes adultos de peixe-zebra (*Danio rerio*)



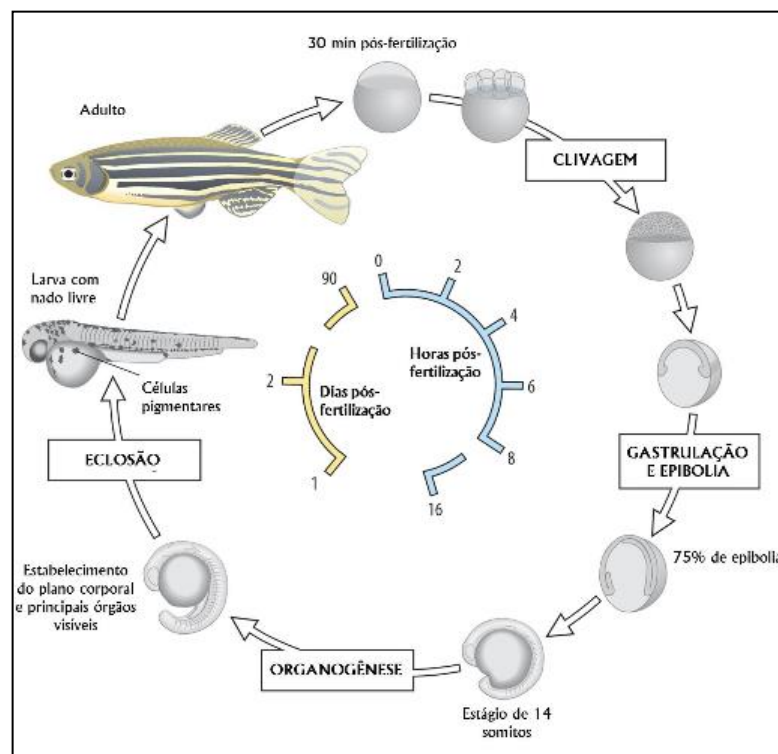
Fonte: AQUÁRIOS PEIXES (2020).

O peixe-zebra foi introduzido como organismo-modelo a partir de 1981, em estudos realizados por George Streisinger e colaboradores. Posteriormente, a análise do sequenciamento do genoma do peixe-zebra em 2013 indicou que 71% dos seus genes codificam proteínas no genoma humano, sendo 84% destes associados a patologias humanas (HOWE *et al.*, 2013).

Dentre as vantagens de utilização do peixe-zebra na pesquisa podemos citar que é um animal de pequeno porte (3-5 cm os adultos), com baixo custo de manutenção, grande prole (50 a 200 ovos em condições de reprodução otimizadas), ovos translúcidos (permitem acompanhamento do período de embriogênese) e rápido desenvolvimento (Figura 7) até a fase adulta (2 a 3 meses aproximadamente) (DAHM e GEISLE, 2006; QUADROS, 2016).

A fecundação do peixe-zebra é externa. A fêmea libera os ovos, os quais são imediatamente fecundados pelo macho, possuindo rápido período de desenvolvimento a partir de um zigoto (KIMMEL *et al.*, 1995). A fase de gastrulação começa aproximadamente seis horas pós-fertilização (hpf) e dois dias depois já é observada natação livre das larvas. Esses animais atingem a maturidade sexual por volta dos três meses de idade e podem viver até cinco anos (HILL *et al.*, 2005; SILVA, 2019).

**Figura 7 – Ciclo de vida do peixe-zebra (*Danio rerio*)**



**Fonte:** Adaptado de D'COSTA e SHEPHERD (2009).

## 1.6 Utilização do peixe-zebra em estudos com peçonhas ofídicas

A utilização do modelo peixe-zebra em estudos de toxinologia ofídica ainda é escasso. Carvalho e colaboradores (2017) utilizaram este modelo para avaliar efeitos da utilização de drogas na redução dos efeitos do ofidismo causado por *B. alternatus*. Kerkkamp e colaboradores (2018), avaliaram os efeitos citotóxicos, anti-metastáticos, anti-angiogênicos de peçonhas brutas de quatro serpentes da família Elapidae (*Naja annulifera*, *Naja kaouthia*, *Ophiophagus hannah* e *Echis carinatus*) sobre células de câncer de pâncreas, utilizando embriões de peixe-zebra transgênicos. Os resultados sobre a utilização das peçonhas demonstraram ser promissores, uma vez que estas apresentaram propriedades citotóxicas em células malignas. Estudo realizado por Zannoty e colaboradores (2019) avaliaram o efeito cardiotóxico causado pela proteína isolada Mutacytin-1 de *Lachesis muta muta* em larvas de peixe-zebra

Até o presente, ainda não existem estudos utilizando o sistema modelo peixe-zebra para a compreensão do empenhamento causado pela serpente *B. jararacussu*. Embora em humanos esses efeitos sejam conhecidos, a complexidade da composição da peçonha ainda continua despertando interesse de pesquisadores que buscam compreender a correlação entre estrutura, propriedades catalíticas das proteínas presentes nas peçonhas e efeitos tóxicológicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vivo*, os efeitos tóxicos da peçonha liofilizada da serpente *B. jararacussu* sobre a sobrevivência, morfologia e marcadores bioquímicos de embriões e larvas de peixe-zebra (*D. rerio*).

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a estabilidade da peçonha liofilizada de *B. jararacussu* às condições do teste de toxicidade em embriões e larvas de peixe-zebra através da mensuração da atividade coagulante;
- ✓ Avaliar a taxa de mortalidade, alterações morfológicas, movimentos espontâneos e batimentos cardíacos em embriões e larvas de peixe-zebra causados pela exposição à peçonha liofilizada de *B. jararacussu*;
- ✓ Determinar parâmetros de toxicidade (LC<sub>50</sub>, NOAL e LOAEL) da peçonha liofilizada de *B. jararacussu* sobre embriões e larvas de peixe-zebra;
- ✓ Analisar alterações no perfil bioquímico das enzimas biomarcadoras de toxicidade: Catalase (CAT), Lactato Desidrogenase (LDH), Acetilcolinesterase (AChE) e Glutathione S-transferase (GST) em larvas de peixe-zebra após exposição à peçonha liofilizada de *B. jararacussu*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das amostras biológicas e aspectos éticos

##### 3.1.1 Peçonha de *B. jararacussu*

Uma mistura (*pool*) da peçonha liofilizada de *B. jararacussu* foi cedida pelo Prof. Dr. Renner de Souza Leite da Unidade Acadêmica de Saúde - UAS da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Cuité, PB.

Para realização dos experimentos de coagulação do plasma citratado humano a peçonha liofilizada foi solubilizada em Tampão Fosfato Salina (8 g de Cloreto de Sódio, 0,2 g de Cloreto de Potássio, 0,7 g de Fosfato de Sódio Dibásico e 0,2 g de Fosfato de Sódio Monobásico - PBS - 10x, pH 7,4) e, para a realização dos demais experimentos, a peçonha foi solubilizada em meio E3 (5 mM de Cloreto de Sódio, 0,17 mM de Cloreto de Potássio, 0,33 mM de Cloreto de Cálcio e 0,33 mM de Sulfato de Magnésio). Seguindo orientações da WHO (2016), a peçonha de *B. jararacussu* liofilizada foi mantida em -20 °C, sendo solubilizada apenas no momento do uso. Durante a realização deste experimento, a peçonha bruta solubilizada foi mantida em gelo para evitar a degradação por temperatura e a proteólise pelos componentes da própria peçonha.

Todos os experimentos foram realizados imediatamente após o preparo das soluções contendo a peçonha de *B. jararacussu*, tanto em PBS como em meio E3. Durante a realização dos experimentos, a peçonha solubilizada foi mantida em banho de gelo para evitar a desnaturação das proteínas constituintes.

##### 3.1.2 Plasma humano citratado

Para obtenção de uma mistura (*pool*) de plasma, foi coletado o sangue de voluntários sadios por meio de punção venosa (não traumática) na veia do antebraço utilizando sistema a vácuo (tubos de ensaio contendo 3,2% (0,109M) de citrato de sódio (1:9). O citrato de sódio age como um quelante, ligando-se aos íons de cálcio e interrompendo a cascata de coagulação (AMORIN *et al.*, 2010). Antes da coleta do sangue venoso, os doadores permaneceram em jejum por, no mínimo, quatro horas e não fizeram uso de medicação nos dez dias anteriores à coleta, além de não possuírem doenças coletadas foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 minutos, conforme “Preparação do Plasma” do kit reagente utilizado (kits Coagulação TP Ref.

730100-1-C (lote 17A130) e Coagulação TTPa Ref. 731200-C (lote 17C171) da Wama Diagnóstica®).

Após centrifugação do sangue total, o plasma foi separado e o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) foram avaliados, uma vez que esses parâmetros são utilizados para avaliar a atividade geral da coagulação, a fim de evitar que fossem incluídos plasmas fora dos tempos de referência para coagulação. Os plasmas que estavam com os valores de referência para TP e TTPa alterados foram descartados. Após a triagem foi formado uma mistura de plasma, o qual foi novamente avaliado e foi imediatamente utilizado para a realização de todos os experimentos de coagulação. Durante a realização dos experimentos, o plasma permaneceu em banho-maria a 37°C para evitar a desnaturação das proteínas plasmáticas envolvidas no processo de coagulação.

### 3.1.3 Embriões e larvas de peixe-zebra

Os embriões e as larvas de peixe-zebra (*D. rerio*) de uma linhagem do tipo selvagem (geração F3) foram fornecidos pela Unidade de Produção de Organismos Modelos Não Convencionais (UniPOM) do Departamento de Biologia Molecular (DBM) da Universidade Federal da Paraíba (João Pessoa, Brasil).

Um dia antes dos experimentos, os embriões foram obtidos utilizando uma armadilha de ovos colocada em um tanque de reprodução utilizando a proporção de 1:1 (machos e fêmeas) de uma cepa de tipo selvagem. Uma hora após o início do fotoperíodo (14 horas claro / 10 horas escuro), os ovos foram coletados e lavados com meio E3. Ovos fertilizados viáveis foram selecionados com o auxílio de um microscópio de luz invertida (aumento de 50x) e utilizados nos experimentos de embriotoxicidade.

### 3.1.4 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais e a coleta de material biológico humano foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Médicas (CCM), com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) sob o número: 39716220.4.0000.8069 (ANEXO 01), de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional nº 001/2013 –Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução nº 466/12 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisado Conselho Nacional de Saúde (CONEP) do Ministério da Saúde.

Os experimentos utilizando embriões e larvas de peixe-zebra foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, certificado pelo número 7605240821 (ANEXO 2).

### **3.2 Atividade coagulante da peçonha de *B. jararacussu***

A avaliação da atividade coagulante do plasma citratado humano na presença da peçonha de *B. jararacussu* foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita por Alvarado e Gutiérrez (1988) com modificações, utilizado plasma humano citratado. A peçonha de *B. jararacussu* foi solubilizada tanto em tampão PBS como em meio E3. Todos os experimentos de atividade coagulante foram realizados em triplicata.

Para a avaliação do Tempo de Protrombina e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada do *pool* de plasma foram utilizados os kits Coagulação TP Ref. 730100-1-C (lote 17A130) e Coagulação TTPa Ref. 731200-C (lote 17C171) da Wama Diagnóstica® adquiridos comercialmente.

Para a avaliação da atividade coagulante foram utilizadas cinco concentrações (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg/µl) da peçonha liofilizada foi solubilizada em PBS (10x, pH 7,4). Alíquotas de plasma citatado humano (100 µl) foram distribuídas em tubos de ensaios de vidro e acondicionadas a 37°C. Em seguida foram adicionadas diferentes concentrações da peçonha em distintos tubos e o cronômetro foi disparado para registrar o tempo de formação do coágulo. O tempo de formação do coágulo foi registrado quando foi observada a formação inicial de uma rede de fibrina.

Uma nova avaliação da atividade coagulante do plasma na presença da peçonha foi realizada para verificar a estabilidade desta quando submetida às mesmas condições de condicionamento dos embriões e larvas de peixe-zebra. Para cada avaliação desse experimento foi utilizada a concentração de 20 µg/µL da peçonha solubilizada tanto em tampão PBS (10x, pH 7,4) quanto em meio E3. Para a verificação da estabilidade da peçonha, alíquotas da peçonha foram dispostas em placas de 96 poços tampadas, em sala com temperatura ( $26 \pm 1$  °C) e fotoperíodo (14 h claro e 10 h escuro) controlados durante 96 horas. A cada 24 h foram retiradas alíquotas (cinco alíquotas, tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas) para mensuração da atividade coagulante.

### 3.3 Teste de toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (teste FET) foi realizado em embriões de peixe-zebra recém-fertilizados (menor que 6 hpf) de acordo com o protocolo n° 236 da OECD (2013). A realização da toxicidade aguda da peçonha liofilizada de *B. jararacussu* em embriões teve por objetivo observar alterações morfológicas a partir do surgimento dos sinais indicadores de letalidade até 96 horas do início do experimento para determinar a concentração que foi capaz de matar 50% dos embriões (CL50), bem como a maior concentração em que não se observou nenhum efeito adverso (NOAEL) e a menor concentração em que ainda foi possível se observar efeitos adversos (LOAEL).

Para a realização do FET, a peçonha de *B. jararacussu* foi solubilizada em meio E3 nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 µg/mL. Para cada concentração foram utilizados 20 poços de uma placa de 96 poços, sendo 1 embrião por poço com volume final de 300 µL. Em cada placa, foram preparados quatro poços com embriões expostos somente ao meio E3 que funcionaram como controle interno. Por sua vez, foi preparada uma placa contendo 20 poços com embriões expostos somente ao meio E3 (controle negativo externo).

As exposições foram semi-estáticas (com renovação das soluções diárias) e tiveram duração 96 horas, onde a cada 24 horas foi avaliada à presença de sinais de letalidade: *i.* coagulação do embrião; *ii.* não desenvolvimento dos somitos; *iii.* não desprendimento da base da cauda e *iv.* ausência de batimentos cardíacos. Complementarmente, foram observadas, em comparação com o controle, todas as diferenças ou alterações morfológicas visíveis. As observações foram realizadas utilizando um microscópio de luz invertida (Zeiss Televal 31, Japão) num aumento de 50 x. A partir do número de mortos em cada concentração foi determinada a taxa de mortalidade e a CL50 através de análise *probit* (FINNEY, 1971). A partir todas as observações de efeitos foram ainda determinados o NOAEL e o LOAEL.

### 3.4 Avaliação das funções cardíacas e motoras

Para avaliação das funções motoras e cardíacas, embriões de peixe-zebra com até 6 hpf foram expostos a três concentrações subletais (3,1; 6,2 e 12,5 µg/mL) da peçonha de *B. jararacussu* nas mesmas condições descritas no item anterior.

A contagem de movimentos espontâneos de cauda de embriões de peixe-zebra com 26 a 28 hpf, expostos a xenobióticos, funciona como um excelente marcador de neurotoxicidade, devido aos efeitos destes sobre a função motora do peixe-zebra (MUNIZ *et al.*, 2021). Dessa

forma, 10 embriões com 26 hpf foram expostos a cada concentração subletal da peçonha avaliada. Dez embriões em meio E3 foram utilizados como controle negativo. Os embriões tanto do tratado, quanto do controle foram analisados individualmente quanto ao número de movimentos da cauda durante um minuto, por contagem manual utilizando o aplicativo gratuito para Android BPM Counter. Para observação dos embriões, foi utilizado um microscópio de luz invertida, em aumento de 50 x.

Quando os embriões atingiram 48 hpf foi possível visualizar com facilidade os batimentos cardíacos, o que, segundo Muniz e colaboradores (2021) tem servido como um bom marcador para investigação de efeitos cardiotóxicos de substâncias químicas. Assim, 10 embriões expostos a cada concentração subletal da peçonha avaliada e 10 embriões utilizados como controle (meio E3) com 48 hpf foram analisados individualmente quanto ao número de batimentos cardíacos por minuto. Para análise, foi utilizado um microscópio de luz invertida, em aumento de 50x, para observação dos batimentos cardíacos e os batimentos foram contados utilizando o aplicativo gratuito para Android BPM Counter para contagem manual.

Os batimentos cardíacos por minuto e os movimentos de cauda foram contabilizados e os resultados foram expressos como média e desvio padrão e avaliados estatisticamente utilizando o programa computacional GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A).

### 3.5 Ensaaios enzimáticos

Grupos de embriões ( $n = 20$  por concentração) de peixe-zebra foram expostos às concentrações subletais de 3,1; 6,2 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  da peçonha de *B. jararacussu* solubilizada em meio E3 durante 96 horas para determinação de enzimas biomarcadores de estresse oxidativo (Catalase, CAT e Glutathione-S-Transferase, GST) e metabólico (Lactato desidrogenase, LDH) e atividade neurotóxica (Acetilcolinesterase, AChE). As exposições foram semi-estáticas (com renovação do meio - peçonha). Ao término da exposição, as larvas foram transferidas para microtubos contendo água destilada na proporção de uma larva para 50  $\mu\text{L}$  de solvente. Posteriormente, as larvas foram maceradas mecanicamente e centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 20 minutos para obtenção de sobrenadante, o qual foi utilizado para medir o teor de proteínas solúveis e a atividade das enzimas selecionadas através de leituras espectrofotométricas (Multiskan GO, Thermo Fischer, EUA).

A quantificação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada de acordo com o método de Ellman e colaboradores (1961). Em microplaca UV de 96 poços foram

adicionados 50 µL do homogenato (amostra) e 250 µL da solução de reação de Ellman (0,075 M de acetilcolina e 0,01 M de ácido 5,5'-ditiobis- [2-nitrobenzóico] [DTNB]). A leitura de tiocolina, produto da degradação da acetilcolina, foi determinada a 414 nm, durante 5 minutos e a cada 30 segundos a 25 °C. Toda a quantificação da atividade de AChE foi realizada em quadruplicata, sendo a coloração da reação modificada de amarelo-claro para amarelo-intenso.

Para determinar a atividade da catalase (CAT) foi empregada a metodologia descrita por Domingues e Gravato (2018). Em uma microplaca UV de 96 poços, foram adicionadas 10 µL do sobrenadante larval (amostra) e incubado com 150 µL de tampão de reação da catalase (37,2 µL de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> misturado com 15 mL de 0,05 M Solução Tampão Fosfato de Potássio (pH = 7,0, a 25 ° C)) e 140 µL de Solução Tampão Fosfato de Potássio (0.05 M, pH 7,0). A atividade da CAT foi mensurada de acordo com a decomposição do substrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de leitura realizada em quadruplicata a 240 nm durante dois minutos, a cada 20 segundos.

A atividade de glutathione-S-transferase (GST) foi realizada de acordo com metodologia proposta por Domingues e Gravato (2018). Foram incubados 50 µL do sobrenadante larval com 250 µL de solução de reação (10 mM de glutathione reduzida e 60 mM de 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno). O ensaio foi realizado em quadruplicata e a atividade da GST foi medida imediatamente após adição da solução da reação a cada 20 segundos durante cinco minutos. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 340 nm.

A Lactato desidrogenase (LDH) foi determinada seguindo a metodologia proposta por Domingues e colaboradores (2010). Na microplaca foram adicionados 40 µL da amostra do sobrenadante larval, 250 µL NADH (0,24 mM) e 40 µL de piruvato (10 mM). Agitação por 10 segundos foi realizada. Posteriormente, a atividade enzimática foi avaliada a 340 nm, sendo monitorada constantemente a cada 20 segundos por cinco minutos para determinar a diminuição da absorbância a partir da oxidação de NADH. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

### 3.6 Análise estatística

Os dados dos experimentos foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism 8 e foram representados como média ± desvio padrão. Os resultados foram testados para normalidade e homogeneidade de variâncias usando o Shapiro-Wilk e Testes de Levene. Posteriormente, os dados que atenderam a essas condições foram analisadas por ANOVA de uma via e teste post-hoc de Tukey (p <0,05). Dados que não paramétricos, do teste de contração espontânea da cauda, foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn. (p <0,05).

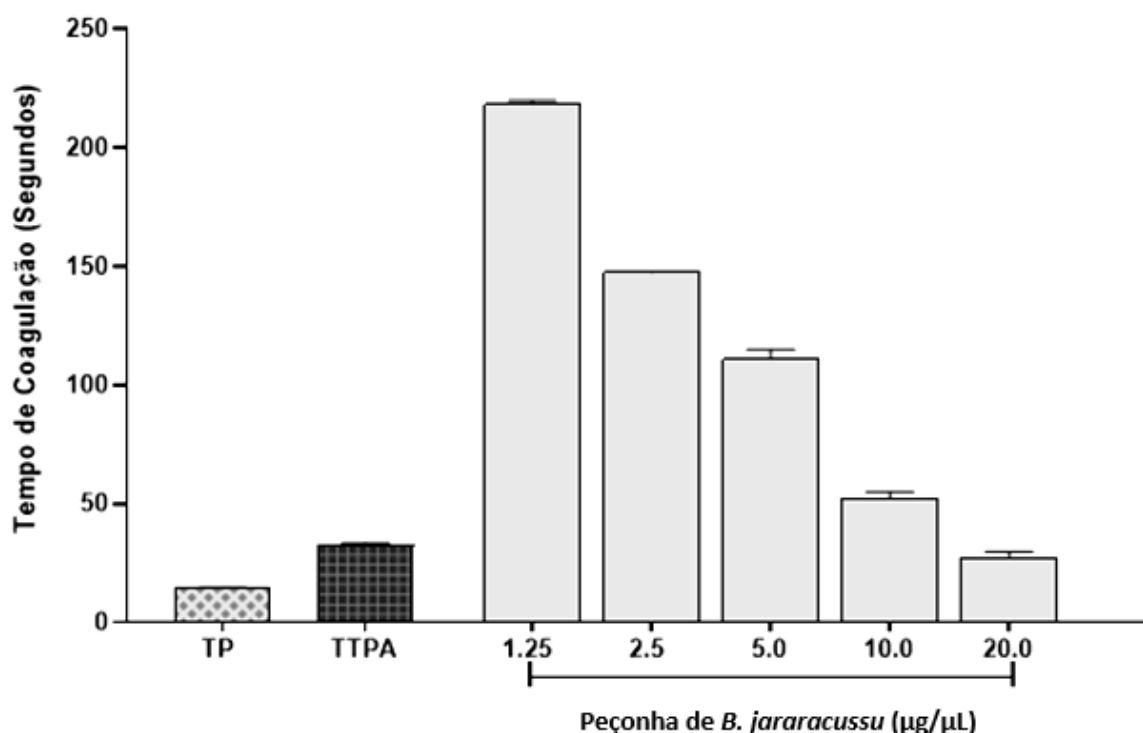
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da atividade coagulante do plasma citratado humano na presença da peçonha de *B. jararacussu*

A atividade coagulante da peçonha de *B. jararacussu* solubilizada em tampão PBS (10x, pH 7,4) foi avaliada sobre o plasma citratado humano nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10 e 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Os tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada (TP e TTPa) foram aferidos como controle para verificar se o *pool* de plasma utilizado estava dentro dos tempos de referência (TP entre 13 – 15 segundos e TTPa entre 24 – 39 segundos, de acordo com instruções do fabricante Wama Diagnóstica®).

A análise dos resultados obtidos nos permitiu inferir que o tempo de coagulação foi de forma concentração dependente (Figura 8), uma vez que quanto maior a quantidade de peçonha avaliada mais rápido foi observada a formação do coágulo.

**Figura 8.** Atividade coagulante do plasma citratado humano na presença da peçonha de *Bothrops jararacussu* ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), solubilizada em solução PBS. Experimento realizado em triplicata. TP (Tempo de Protrombina) e TTPa (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada).

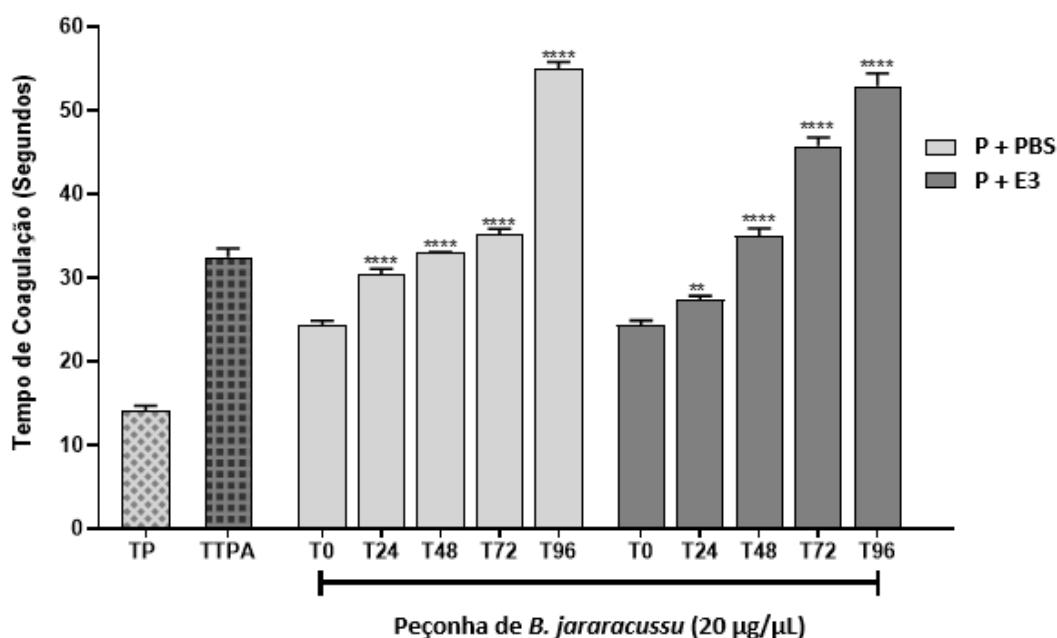


Normalmente, as peçonhas ofídicas têm como veículo de solubilização o fosfato salino (PBS). O PBS é uma solução isotônica que se iguala a concentração salina presente no corpo humano, caracterizado como atóxico para as células, além de evitar a variação de pH, sendo, portanto, o diluente ideal (MARTIN *et al.*, 2014).

O meio embrionário E3 é utilizado para controle dos parâmetros de contaminação e melhoramento de condições microambientais para desenvolvimento de embriões e larvas (MARCH, 2018). Portanto, nos experimentos utilizando o modelo peixe-zebra, foi seguido o protocolo OEDC 236 (2013), o qual preconiza que tanto a lavagem dos embriões desses animais como as substâncias a serem analisadas estejam em meio embrionário E3. Para verificar se a modificação da atividade da peçonha se solubilizada no meio E3 e avaliar sua estabilidade nas condições de manutenção do peixe zebra, um novo experimento de coagulação foi realizado.

A concentração de 20 µg/µL da peçonha foi selecionada para avaliar sua estabilidade quando submetida às mesmas condições de condicionamento dos embriões e larvas de peixe-zebra até 96 horas de exposição, sendo diluída tanto no meio E3 como em PBS (Figura 9).

**Figura 9.** Avaliação da atividade coagulante em plasma citratado humano na presença da peçonha de *B. jararacussu* após 96 horas de incubação nas condições do teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra. TP (Tempo de Protrombina) e TTPA (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada). P + PBS (Peçonha em PBS) e P + E3 (Peçonha em meio E3). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n =3). \*p< 0,05, \*\*p< 0,01, \*\*\*p< 0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.



A avaliação do tempo de formação de coágulo plasmático desencadeado tanto pela presença da peçonha solubilizada em meio E3 como da solubilizada em tampão PBS (10x pH 7,0) e mantidas a  $26 \pm 1$  °C, foi realizada a cada 24 horas, e a peçonha solubilizada no dia (T0) foi comparada com as peçonhas solubilizadas de T24 a T96 para avaliar se a diferença no tempo de formação do coágulo (Figura 9). Nos nossos resultados, o tempo de coagulação apresentou-se de maneira tempo dependente e estão de acordo com os dados descritos por Paixão-Júnior e colaboradores (2020).

A atividade coagulante desencadeada pelo ofidismo botrópico é massivamente relatada na literatura (EAGLE, 1937; SILVA e PARDAL, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2018; DUARTE *et al.*, 2019; LOTTO *et al.*, 2021).

Sousa e colaboradores (2018) descreveram que os efeitos coagulopáticos causados pela peçonha botrópica são oriundos principalmente da ação das proteases (metaloproteinase e serinoproteinase), porém também podem ser causados pela ação de fosfolipases A2 e lectinas do tipo C. Kini e colaboradores (2001) e Kini e Koh (2016) relataram que as proteínas prócoagulantes de peçonha de serpentes (como por exemplo, as proteases) atuam na clivagem específica dos zimogênios dos fatores de coagulação resultando na formação do coágulo. De modo mais específico, as proteases ofídicas clivam seletivamente algumas proteínas envolvidas na cascata de coagulação, como o Fator X e a protrombina podendo causar agregação plaquetária e conduzir a ativação e / ou desativação de proteínas envolvidas na hemostasia secundária (KINI; KOH, 2016; SOUSA *et al.*, 2018). A peçonha de *B. jararacussu* apresenta em sua composição diversas proteases que atuam sobre a hemostasia secundária (LARRÉCHÉ *et al.*, 2021).

As serinoproteases de serpentes apresentam tríade catalítica clássica conservada, His57, Asp102 e Ser195, em posição análoga às serinoproteases de mamíferos (BOROTELO *et al.*, 2002). Esta mesma tríade catalítica está presente no sítio ativo da trombina (fator II), sendo importante para o desempenho da sua função como pró ou anticoagulante (KOH *et al.*, 2011).

A Jararacussina-I foi descrita por Borotelo e colaboradores (2002) como sendo uma serinoprotease do tipo trombina-like (“snake venom thrombin-like enzymes, svTLEs”) que atua na clivagem do fibrinogênio liberando fibrinopeptídeo A e fibrinopeptídeo B, resultando na formação de coágulos de fibrina anormais, formados por polímeros curtos (BOROTELO *et al.*, 2002; ULLAH *et al.*, 2012).

A trombina difere da svTLEs, pois a trombina, além de clivar ambas as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  do fibrinogênio, também atuam ativando os fatores V, VIII e XIII. Nenhuma das svTLEs exibiu atividade de ativação desses fatores (ULLAH *et al.*, 2018) e, por não ativarem o fator XIII, as

svTLEs produzem coágulos instáveis que são rapidamente eliminados, o que leva ao rápido esgotamento do fibrinogênio circulante in vivo e contribui para amplificação dos efeitos hemorrágicos (MACKESSY, 2010; SUN *et al.*, 2017). A incapacidade da heparina de inibir a atividade esterase causada pela Jararacussina-I pode indicar que existem diferenças estruturais significativas entre essa enzima e a trombina (BOROTELO *et al.*, 2002).

A BjussuSP-I, outra serinoprotease glicosilada semelhante à trombina presente na peçonha de *B. jararacussu* descrita por Sant'ana e colaboradores (2008a) apresentou atividade 40 proteolítica sobre o fibrinogênio de cadeia A $\alpha$  e não sobre a cadeia B $\beta$  e atividade catalítica sobre a fibrina. Essa enzima apresentou estabilidade coagulante a diferentes temperaturas (-70 a 37 °C) e pHs (4,5 a 8,0), além ter exibido alta atividade coagulante sobre o plasma humano (SANT'ANA *et al.*, 2008a). Complementarmente, Sant'ana e colaboradores (2018b) descreveram que além da atividade pró-coagulante, a BjussuSP-I apresentou atividade semelhante a calicreína, mas foi incapaz de atuar sobre plaquetas e plasmina.

A BjussuMP-I foi descrita por Mazzi e colaboradores (2004) como sendo uma metaloproteinase de classe P-III de alta massa molecular com atividade hemorrágica, totalmente inibida por EDTA, o que demonstrou a importância da presença do metal zinco na composição desta proteína para exercer sua função. Ainda, essa enzima apresentou atividade proteolítica sobre o fibrinogênio degradando ambas as cadeias A $\alpha$  e cadeia B $\beta$  (MAZZI *et al.*, 2004) e, de acordo com Freitas-de-Souza e colaboradores (2020), foi capaz de ativar a protrombina na ausência de íons cálcio (Ca<sup>2+</sup>).

A BjussuMP-II, uma metaloproteinase ácida de baixa massa molecular da classe P-I descrita por Marcussi e colaboradores (2008) apresentou atividade fibrino(geno)lítica sobre fibrinogênio bovino e baixa ou nenhuma atividade hemorrágica. Marcussi e colaboradores (2008) demonstraram que a atividade de degradação do fibrinogênio causada pela BjussuMPII atuou na degradação da cadeia A $\alpha$  e não da cadeia B $\beta$ , sendo que esta atividade foi inibida pela ação do EDTA, EGTA e fenatrolina. Segundo Marcussi e colaboradores (2008), essa metaloproteinase não apresentou atividade coagulante e/ou anticoagulante sobre plasma citratado humano, porém, apresentou efeitos inibitórios sobre agregação plaquetária.

As peçonhas ofídicas também contêm em sua composição uma mistura de íons inorgânicos e, dentre eles, o íon cálcio (Ca<sup>2+</sup>) (CARVALHO *et al.* 2013). Este íon atua como um importante cofator para manutenção da hemostasia secundária, sendo essencial para ativação do fator X, para a conversão da pró-trombina em trombina e para a ativação do fator XIII (SINGH *et al.*, 2019; BARMORE *et al.*, 2020). No entanto, em serpentes do gênero *Bothrops*, os íons cálcio, ferro, cloreto e bromo são encontrados em níveis ligeiramente baixos,

enquanto que os íons sódio e potássio são encontrados em maiores concentrações (METAIRON *et al.*, 2016).

Ao adicionarmos a peçonha de *B. jararacussu* solubilizada em ambos os meios (E3 e PBS) e mantidas a 26 °C ( $\pm 1$  °C) ao plasma humano citratado, verificamos uma variação significativa de tempo para a formação de coágulo no período de realização do experimento. A peçonha solubilizada no dia do experimento (T0) apresentou rápida formação do coágulo quando comparada as peçonhas solubilizadas acima do T24. Tal diferença, pode ser explicada porque a peçonha T0 apresentou ação sinérgica entre as proteases descritas e a presença de íon cálcio, o que induz a rápida formação do coágulo de fibrina. Enquanto que as peçonhas solubilizadas e avaliadas acima de T24 podem ter apresentado alteração dos seus constituintes por proteólise como descrito pela WHO (2016) e essa alteração pôde ser observada pelo aumento do tempo de formação do coágulo. No entanto, ainda foi observado a formação de coágulos acima de T24, que pôde ter ocorrido pela ação da BjussuSP-I, proteína a qual, de acordo com Sant'ana e colaboradores (2008a) foi capaz de manter sua atividade coagulante em condições de temperaturas e pHs variáveis. Deste modo, estes resultados reforçam a orientação de que a peçonha deve ser utilizada imediatamente após a sua solubilização e mantida em baixa temperatura durante a realização de experimentos.

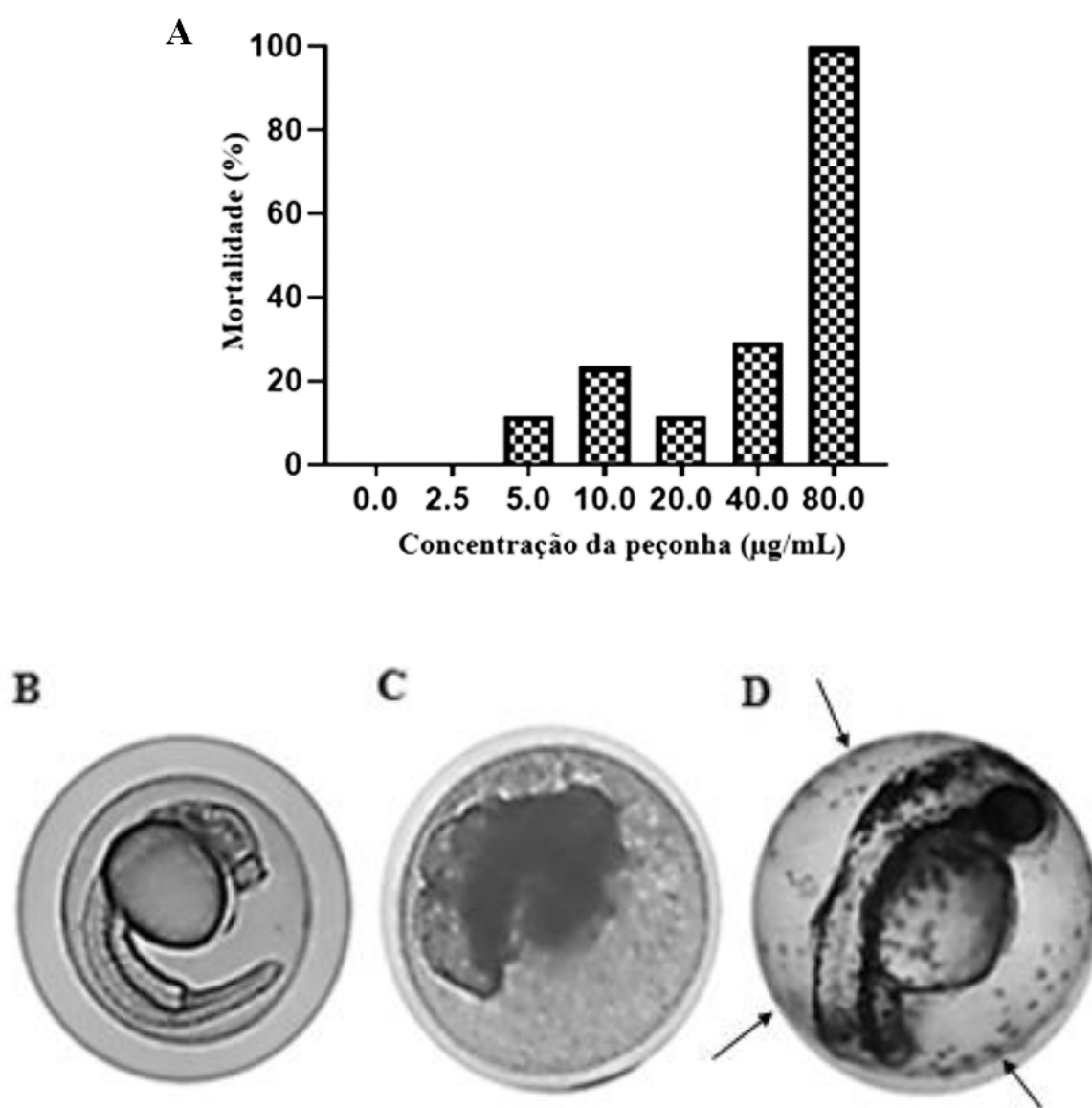
Os resultados acima descritos foram importantes para definir a realização do protocolo de manutenção da amostra semi-estática, ou seja, renovando a peçonha solubilizada em meio E3 a cada 24 horas, nos ensaios enzimáticos com larvas de peixe-zebra, evitando assim a degradação das proteínas e a perda de atividades enzimáticas dos componentes da peçonha de *B. jararacussu*.

#### **4.2 Avaliação da toxicidade aguda da peçonha bruta de *B. jararacussu* em embriões de peixe-zebra**

Os resultados demonstraram, que os componentes presentes na peçonha de *B. jararacussu* são capazes de induz embriotoxicidade em fases iniciais do desenvolvimento do peixe-zebra. Observamos que a peçonha de *B. jararacussu* induziu a mortalidade embrionária ou induziu agregação de proteínas no córion do animal. A taxa de mortalidade observada foi concentração-dependente, ou seja, diretamente proporcional ao aumento das concentrações utilizadas. A concentração de 80 µg/mL causou a mortalidade de 100% dos indivíduos em

estudo (Figura 10A). Embriões expostos somente ao meio E3 (controle) não apresentaram mortalidades ou modificações morfológicas observadas (Figura 10B).

**Figura 10.** Efeitos tóxicos em embriões de peixe-zebra expostos a peçonha de *B. jararacussu* por 96 horas: **A.** Percentual de mortalidade de embriões expostos a concentrações crescentes da peçonha (2,5 – 80,0  $\mu\text{g/mL}$ ). **B.** Embrião normal (controle) com 24 hpf, exposto apenas ao meio embrionário E3. **C.** Embrião coagulado com 24 hpf após introdução da peçonha a microplaca. **D.** Presença de grânulos no córion (setas) e espaço perivitelínico de embrião com 48 hpf exposto as menores concentrações da peçonha (2,5; 5,0 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ).



A coagulação embrionária foi o único indicador de letalidade observado no decorrer de 24 horas após a peçonha ser adicionada na microplaca contendo o embrião; esse processo foi

visualizado em todas as concentrações da peçonha avaliada (FIGURA 10C). Não foi observada a ruptura do córion, a membrana que reveste o embrião até o momento da eclosão (SOUDER; GORELIK, 2017), porém foi observado o acúmulo de proteínas da peçonha ao redor do córion, e possivelmente, no espaço perivitelínico nos embriões acondicionados nas concentrações 2,5; 5,0 e 10 µg/mL da peçonha (Figura 10D). Segundo Braubeck e colaboradores (2015) o acúmulo de proteínas ao redor do córion ocorre devido à alta massa molecular dos constituintes presentes na substância tóxica.

Com base ainda na avaliação morfológica é possível identificar a concentração mais baixa capaz de produzir efeito adverso observado da substância em análise, denominada de LOAEL (Lowest Observable Adverse Effect Level - Nível Mais Baixo de Efeito Adverso Observado). Estes efeitos causados pela substância podem ser observados no peixe-zebra através de anormalidade estruturais e/ou funcionais e/ou letalidade (BRANNEN *et al.*, 2010). A análise dos nossos resultados permitiu determinar o LOAEL para concentração de 5,0 µg/mL da peçonha bruta, onde ainda foi observado apenas um indicador de letalidade, a coagulação embrionária.

Nem todas as concentrações avaliadas apresentaram efeitos adversos como alterações morfológicas, funcionais ou letalidade. Para determinar a concentração utilizada sem observarmos efeitos adversos, foi determinado o NOAEL (No Observed Adverse Effect Level - Nível de Efeito Adverso Observado) (BAMBINO e CHU, 2017). A análise dos nossos resultados permitiu determinar o NOAEL para a concentração de 2,5 µg/mL da peçonha bruta, na qual nenhum dos efeitos descritos foi observado, mantendo assim os embriões com as mesmas características morfofuncionais observadas nos embriões do grupo controle.

A Concentração Letal (CL50) é um ensaio utilizado para avaliar a concentração de determinada substância que causa a mortalidade da metade dos indivíduos de uma população (SILVA *et al.* 2020). A mortalidade dos embriões de peixe-zebra nas concentrações avaliadas foi submetida à análise do *probit*, onde foi determinada a CL50, concentração na qual foi capaz de causar a morte de 50% dos indivíduos como sendo 27,051 (19,282-37,893) µg/mL da peçonha.

Segundo Hamm e colaboradores (2019) e Ali e colaboradores (2017), apesar do córion ser fenestrado por poros, estes demonstraram bloquear a passagem de moléculas que apresentaram massa molecular superior a 3kDa. Desta forma, o córion atuaria como uma barreira contra entrada de microrganismos e toxinas durante o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (CHEN *et al.*, 2020). Porém, a avaliação da mortalidade embrionária observada nos

permitiu sugerir que algum(s) do(s) componente(s) da peçonha foi capaz de penetrar os poros presentes na membrana externa do córion e causar toxicidade.

Como demonstrado na SDS-PAGE realizada por Paixão-Júnior e colaboradores (2020), as proteínas presentes na peçonha de *Bothrops jararacussu* provavelmente não apresentam tamanho adequado para atravessar a membrana do córion do peixe-zebra, uma vez que estas apresentam massas superiores a 13 kDa. Como consequência do não ingresso ao interior do córion, essas moléculas presentes no extrato bruto da peçonha se agrupam formando grânulos ao redor do córion dos embriões de peixe-zebra como demonstrado na figura 10D.

Além da presença de proteínas, as peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* apresentam uma variedade de peptídeos identificados e farmacologicamente ativos (ALBERTO-SILVA, 2020). Caldeira e colaboradores (2021) identificaram sete peptídeos por espectrometria de massa na peçonha de *Bothrops jararacussu*, com massas moleculares na faixa de 443,17-1356,73 Da, apresentando sequências correspondentes entre 3-13 resíduos de aminoácidos. Dentre estes peptídeos, um deles já foi determinado como sendo um Peptídeo Potenciador de Bradicinina (PPB) e outro um tripeptídeo inibidor endógeno de metaloproteinase.

Freire e colaboradores (2021), relataram também que esta peçonha apresenta um peptídeo dimérico não tóxico (pBthTX-I) derivado da região C-terminal da fosfolipase A2 BThTX-I (Bothropstoxina I) e seus análogos, apresentaram atividade antiviral contra o SARS-CoV-2 e baixa atividade citotóxica.

O Peptídeo Potenciador de Bradicina (PPB) presente na peçonha de *B. jararacussu* foi descrito primeiramente em um estudo realizado por Ferreira e colaboradores (1992). Os PPBs encontrados em peçonhas de serpentes atuam inibindo a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) impedindo a conversão de angiotensina I em angiotensina II, sendo caracterizados desta forma, como hipotensores. Estes PPBs agem também, potencializando a bradicina, causando vasodilatação, o que contribui para o efeito hipotensivo (XU et al, 2015; SCIANI e PIMENTA, 2017). Desta forma, os PPBs culminam na difusão das tóxicas da peçonha, induzindo a um choque hipotensivo, uma das causas de óbitos após ofidismo (PINHEIRO-JÚNIOR et al., 2018).

A bradicinina participa do processo de desencadeamento da inflamação, via dois receptores, BR1 e BR2 (SILTARI et al., 2016). O BR1 é sensibilizado em células da micróglia, astrócitos, neurônios e após lesão tecidual e é induzido e regulado conforme a evolução dos quadros infecciosos, inflamatórios e/ou traumáticos (JÚNIOR et al., 2016; MARCEU et al., 2020). O BR2 é expresso pelos tecidos periférico e central, sendo encontrado em condições

normais em vários tipos celulares, sendo contribuinte para a resposta inflamatória aguda e nociceptiva (JÚNIOR et al., 2016; MARCEU et al., 2020). Desta forma, a bradicinina, juntamente com as prostaglandinas e a histamina, induz a vasodilatação, o que causam o calor e rubor característicos desse evento. Complementarmente, a bradicinina participa da formação da dor junto com a prostaglandina E2 por atuar na sensibilização das terminações nervos sensoriais (CHOI e HWANG, 2018).

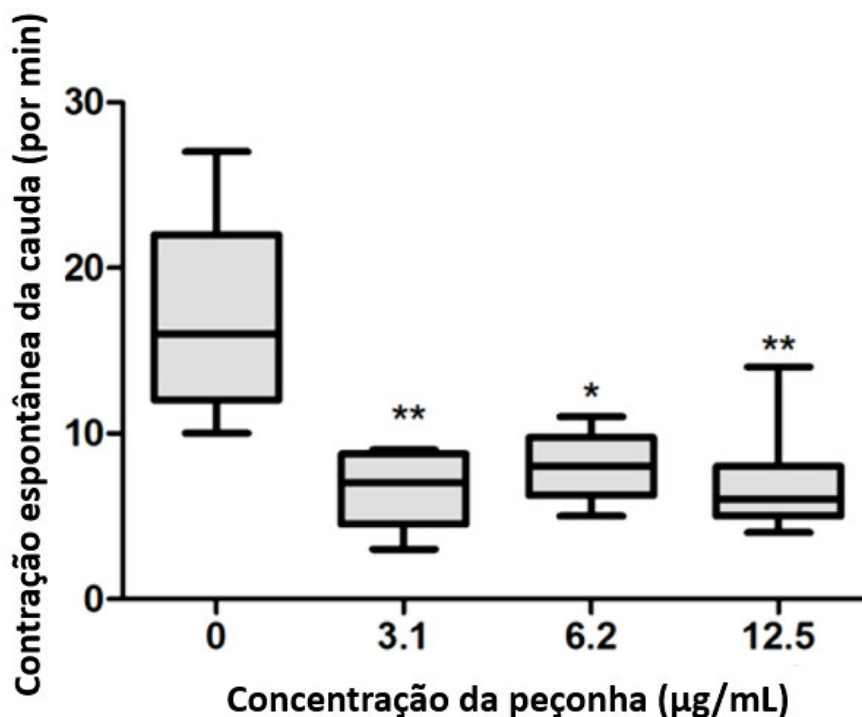
Bromée e colaboradores (2006), identificaram no peixe-zebra a presença de genes de cópia única para os receptores BR1 e BR2. Também identificaram neste estudo, um receptor ortólogo a BR1 de mamíferos. Dunner e colaboradores (2002) havia anteriormente identificado distribuição de RNAm dos receptores BR1 e BR2 foram detectados no olho, cérebro, músculo e trato gastrointestinal do peixe-zebra.

Como sugerido por Bromée e colaboradores (2006), a expressão do receptor BR1 e seu RNAm podem ser induzidas por desencadeamento de processo inflamatório em tecidos dos peixes. Isto, poderia justificar o processo de coagulação observado nos embriões de peixe-zebra (Figura 11 C) quando tratados com diferentes concentrações da peçonha de *B. jararacussu*. Podemos sugerir que a coagulação embrionária possa ser desencadeada pela ação de PPBs presentes na peçonha. Estes peptídeos poderiam atravessar o córion do peixe-zebra por apresentarem tamanho molecular inferior a 3 kDa e através de induzir a expressão do gene do receptor BR1 possa desenvolver o processo inflamatório e causar a mortalidade nesses animais.

#### **4.3 Avaliação de atividade neurotóxica e cardiotoxica em peixe-zebra pela peçonha de *B. jararacussu***

Os resultados demonstraram que a presença da peçonha de *B. jararacussu* causa hipoatividade locomotora da cauda de embriões de peixe-zebra (Figura 11), quando comparado o grupo controle e os grupos tratados com as concentrações subletais da peçonha. Não foi identificada diferença significativa entre os grupos tratados com as diferentes concentrações subletais da peçonha.

**Figura 11** – Contrações espontâneas da cauda de embriões de peixe-zebra com 24-26 hpf na presença de concentrações crescentes da peçonha de *B. jararacussu*: A atividade neurotóxica foi observada ao comparar os grupos controle e o tratado nas concentrações subletais da peçonha. Houve diferença significativa (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). Os box pots mostram terceiro quartil, mediana e primeiro quartil, e as barras de erro mostram os maiores e menores valores observados.



O peixe-zebra de acordo com d'Amorá e Giordani (2018), apresenta um alto grau de homologia genética e morfofisiologia com seres humanos. Com isso, apresentam, por exemplo, mecanismos do Sistema Nervoso Central (SNC) bem conservados e semelhança no desenvolvimento da barreira hematoencefálica com outros vertebrados (ZENG *et al.*, 2017; CASSAR *et al.*, 2020). Kiper e Freeman (2019) descreveram que a semelhança observada entre o neurodesenvolvimento do peixe-zebra e os mamíferos levou-os a inferir que estudos com substâncias neurotóxicas neste modelo, peixe-zebra, pode ser correlacionado para humanos.

A neurotoxicidade em peixe-zebra é amplamente estudada em compostos como xenobióticos (BERTOTTO *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2021). Estudos, porém, da atividade neurotóxica neste modelo, desencadeado por componentes de peçonhas de serpentes, são escassos na literatura (SWINBURNE *et al.*, 2015; SCHIMIDT *et al.*, 2019).

Estágios iniciais da vida humana e selvagem são particularmente sensíveis e susceptíveis a ação de tóxicos. Os efeitos causados por agentes tóxicos de origem química, física ou biológica, podem desencadear efeitos neurotóxicos, que podem produzir mudanças comportamentais visíveis ou epigenéticas, sendo base para surgimento de efeitos a longo prazo (LEGRADI *et al.*, 2018). Uma forma prática de rastrear a neurotoxicidade de alguma substância é através da contagem dos movimentos espontâneos da cauda no peixe-zebra, que tem início 17 hpf (ZINDLER *et al.*, 2019; GONZÁLEZ-FRAGA *et al.*, 2019). Segundo Ogungbemi e colaboradores (2021), o enrolamento espontâneo de cauda é a primeira atividade motora observadas nesses animais, a partir do desenvolvimento da rede neural.

A atividade locomotora inicial da cauda de embriões do peixe-zebra ocorre através de sinapses elétricas impulsionadas pelos interneurônios espinhais caudais ipsilaterais do marcapasso. Estes neurônios ipsilaterais determinam uma periódica despolarização, uma vez que são responsáveis por exibirem endogenamente correntes persistentes de sódio. Isso ocorre devido à imaturidade da medula espinhal do animal que apresenta nas 17 hpf apenas quatro tipos de motoneurônios (SELDERSLAGHS *et al.*, 2010; ROSSUEL *et al.*, 2021).

Os processos de movimentação originados da despolarização evoluíram para surgimento de sinapses eletroquímicas híbridas que geram movimentos mais complexos nesses animais. A partir de 21 hpf, as contrações começam a ser mediadas por neurotransmissores, aqui pode ser identificada a presença de sinalizações glicinérgicas, sendo a glicina o neurotransmissor inibitório do tronco cerebral e medula espinhal, regulando assim o sistema motor (KNOGLER *et al.*, 2014; OGINO e HIRATA, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Algumas PLA2s já foram descritas presentes na peçonha bruta de *B. jararacussu*, BthTX-I (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.* 1988), BthTX-II (GUTIÉRREZ *et al.* 1991) e BthA-I (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002). Dessas PLA2S, a BthTX-II, uma Asp49-PLA2 básica com massa molecular de 14 kDa (CORREA *et al.*, 2008) apresentou atividade neurotóxica, baixa atividade catalítica e miotóxica (BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2007; DESIMONE *et al.*, 2013). Esta atividade neurotóxica está associada à alta afinidade entre a PLA2s e seu sítio de ligação presente na membrana de proteínas neuronais (ROUAULT *et al.*, 2006; CORRÊA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010). No entanto, apesar da BthTX-II, desencadear neurotoxicidade, provavelmente não poderíamos associar os efeitos desta proteína a atividade de hipoatividade de cauda, pois esta PLA2 não conseguiria atravessar o córion do peixe-zebra, devido a sua massa molecular ser superior a 3 kDa.

Munawar e colaboradores (2011) identificaram a presença de um peptídeo curto neurotóxico na peçonha de *B. jararacussu*, homólogo a um peptídeo presente na peçonha da

serpente Elapidae *Naja haje anulifera*. No entanto, o mecanismo de ação, deste peptídeo curto neurotóxico presente na peçonha *B. jararacussu* ainda não está claro.

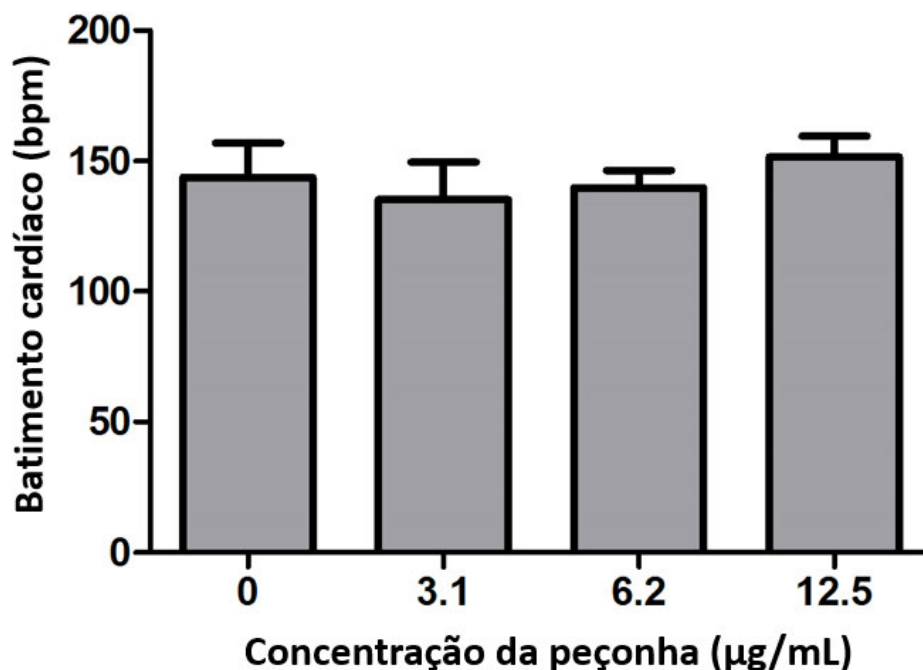
A avaliação de nossos resultados nos possibilitaram inferir que possivelmente a presença de peptídeos poderiam atuar realizando hipoatividade de cauda em todas as concentrações subletais avaliadas, demonstrando, desse modo, exercer alguma atividade neurotóxica em embriões de peixe-zebra. Pode-se ainda inferir que essa possível atividade neurotóxica observada possa estar relacionada à estimulação de sinalizações glicinérgicas de neurônios caudais do peixe-zebra. No entanto, estudos complementares devem ser realizados para identificar especificamente o possível componente da peçonha que possa desencadear essa hipoatividade.

A resposta a estímulos externos pode ser identificada a partir das fases iniciais do desenvolvimento de larvas do peixe-zebra, uma vez que, as respostas comportamentais já são controladas pelo cérebro (SUBENDRAN *et al.*, 2021). A clareza óptica é um fator importante apresentado por embriões e larvas desse animal, o que possibilita analisar, de modo não invasivo, órgãos como o coração e consequentemente os batimentos cardíacos e de cauda, frente à introdução de agentes externos (SAMPURNA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

O peixe-zebra tornou-se o modelo ideal para estudo do sistema cardiovascular, sendo esse modelo relativamente simples, apresentando conservação anátomo-funcional e morfogênese de vasos semelhante à de vertebrados superiores. O coração é um dos primeiros órgãos a ser formado, com desenvolvimento funcional após 24 hpf. Em seres humanos, a cardiotoxicidade pode ser avaliada frente à variabilidade da frequência cardíaca. Em embriões de peixe-zebra é possível analisar os efeitos cardiotóxicos e neurotóxicos quando estes são expostos a compostos farmacológicos, desta forma, este é um modelo perfeito para avaliar estas funções com peçonha de serpente (LUCA *et al.*, 2014; GIERTEN *et al.*, 2020).

O batimento cardíaco foi avaliado no controle e nas três concentrações subletais da peçonha de *B. jararacussu* 3,1; 6,2 e 12,5 µg/mL (Figura 12). Não houve diferença significativa entre o grupo e o grupo tratado com as concentrações subletais da peçonha.

**Figura 12.** Frequência dos batimentos cardíacos de embriões de peixe-zebra, com aproximadamente 48 hpf, expostos a concentrações crescentes da peçonha de *Bothrops jararacussu*: Atividade cardiotoxica não foi identificada.



Nossos resultados de avaliação do efeito cardiotoxico em peixe-zebra causado pela peçonha de *B. jararacussu* diferiram de estudos realizados em mamíferos. Em estudo realizado por Sinfuentes e colaboradores (2008) a peçonha de *B. jararacussu* apresentou cardiotoxicidade em ratos por causar depressão cardíaca dependente de tempo de experimentação e concentração da peçonha avaliada, bem como extra-sístole supra e ventriculares que levaram à parada cardíaca dos animais em experimentação. Em concordância com Sinfuentes e colaboradores (2008), Ricardo e colaboradores (2012) também relataram que a peçonha de *B. jararacussu* causou depressão da tensão cardíaca em ratos, sendo este efeito reduzido frente a utilização de heparina.

A divergência de resultados observados entre os modelos (peixe-zebra e ratos) pode ser explicada pela diferença de metodologia aplicada. Em ratos, a peçonha foi introduzida por meio de perfusão cardíaca, o que permitiu o surgimento dos efeitos observados possivelmente causados por proteínas miotóxicas como as PLA2S BThTX-I e BThTX-II (SINFUENTES *et al.*, 2008; RICARDO *et al.*, 2012). Já para avaliar a cardiotoxidade em embriões de peixezebra, a peçonha foi introduzida na microplaca. A presença do córion, possivelmente impediu 50 a

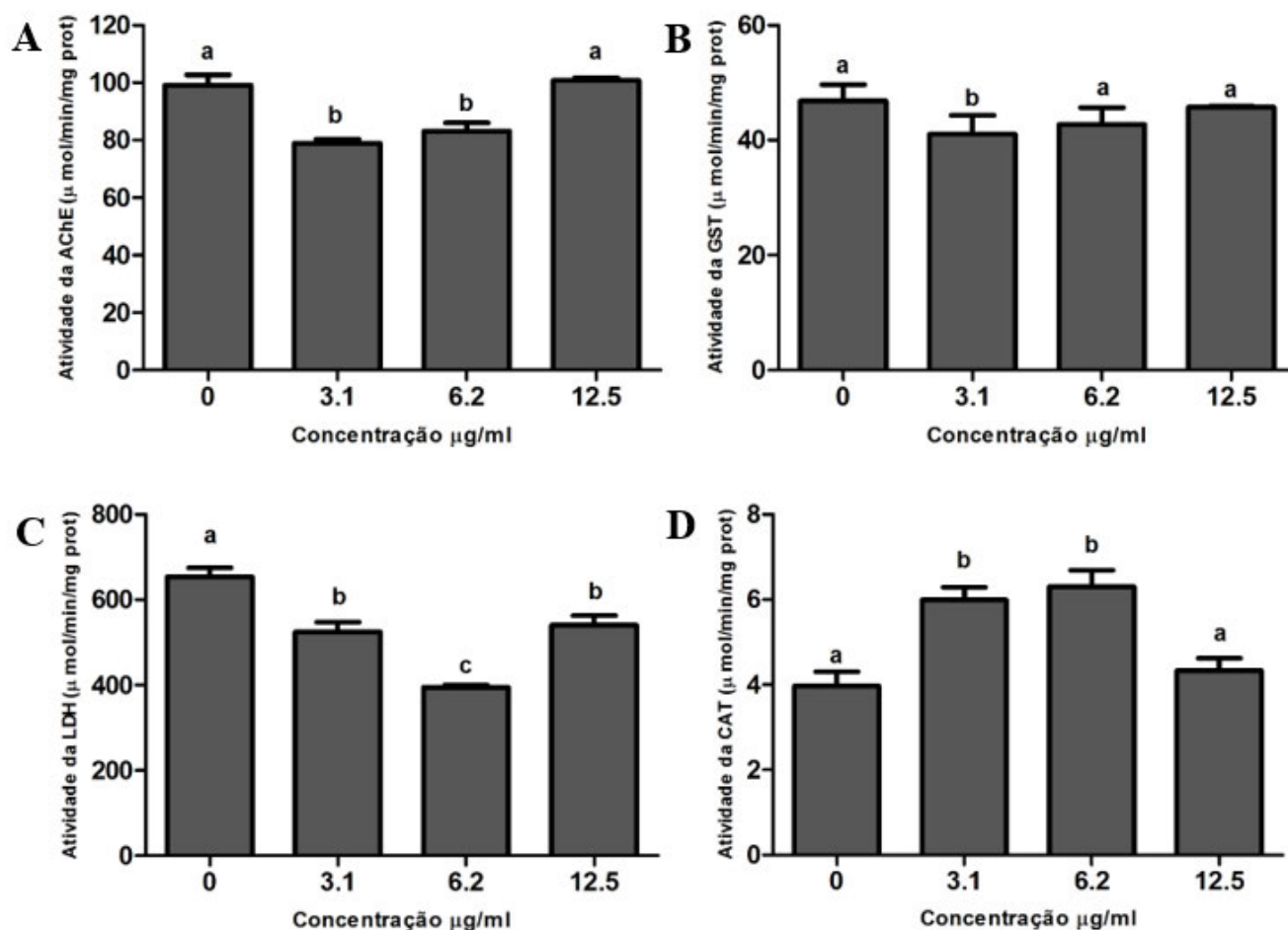
passagem dessas proteínas miotóxicas presentes na serpente, o que possivelmente resultou na preservação da função cardíaca observada.

#### **4.4 Determinação de enzimas biomarcadoras de toxicidade em larvas de peixe-zebra expostas à peçonha de *Bothrops jararacussu***

A avaliação da atividade destas enzimas biomarcadoras foi realizada em larvas de peixe-zebra, utilizando concentrações subletais (3,1; 6,2 e 12,5 µg/mL) da peçonha de *B. jararacussu* após 96 horas de exposição (Figura 13). OS resultados obtidos da quantificação das enzimas biomarcadores permitiu inferir que a peçonha de *B. jararacussu* causa neurotoxicidade, estresse oxidativo e metabólico em larvas de peixe-zebra.

Após a ruptura do córion, o peixe-zebra dá início a fase larval o que expõe facilmente o animal a presença de tóxicos (SILVA *et al.*, 2021). Frente à exposição dos agentes tóxicos, biomarcadores podem ser utilizados para determinar alterações de estruturas ou funções de componentes celulares ou moleculares (DALZUCHIO *et al.*, 2016). O peixe-zebra é um vertebrado comumente utilizado em estudos toxicológicos, uma vez que demonstram sensibilidade nos seus estágios de vida a agentes estressores, sendo possível analisar o efeito destes, através da quantificação da atividade enzimática de enzimas como AChE, CAT, GST e LDH (KARAMI *et al.*, 2017; MAHARAJAN *et al.*, 2018).

**Figura 13** - Efeito da peçonha de *Bothrops jararacussu* na atividade de biomarcadores em larvas de peixe-zebra após exposição de 96 h. **A.** Acetilcolinesterase (AChE), **B.** Glutathione-S - Transferase (GST), **C.** Lactato Desidrogenase (LDH) e **D.** Catalase (CAT). Os dados foram analisados por ANOVA oneway e teste post-hoc de Turkey. OS resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. n = 20, por grupo. **a:** não significativa. **b, c:** diferença significativa do controle ( $p < 0,05$ ).



A quantificação da enzima biomarcadora de neutotoxicidade, acetilcolinesterase (AChE), em larvas de peixe-zebra, expostas as menores concentrações, 3,1 e 6,2  $\mu$ g/mL, respectivamente, da peçonha de *Bothrops jararacussu*, demonstrou que a atividade desta enzima foi reduzida de modo significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle. No entanto, a maior concentração, 12,5  $\mu$ g/mL, apresentou níveis similares ao do controle, como pode ser visto na Figura 13A. Desta forma, a peçonha de *Bothrops jararacussu* nas menores concentrações analisadas, demonstrou reduzir a atividade da AChE.

A AChE é uma enzima colinérgica presente em junções neuromusculares pós-sinápticas responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina, encerrando assim, a transmissão neuronal (MCHARDY *et al.*, 2017). Normalmente, os níveis de atividade da AChE em peixe-zebra aumentam aproximadamente em 75 vezes do 1 ao 6 dia pós-fertilização (KOENIG *et al.*, 2016). Koenig e colaboradores (2016) descreveram a presença da AChE em peixe-zebra e relataram que a estrutura primária da AChE de peixe-zebra é 62% compatível com a sequência de aminoácidos da AChE humana, tornando assim este animal um bom modelo para analisar a atividade desta enzima.

A inibição da atividade da AChE, já foi anteriormente descrita em estudos realizados com pesticidas, induzindo a neurotoxicidade, bem como a atividade desta enzima já foi completamente abolida em embriões de peixe-zebra expostos a bloqueadores colinérgicos como a  $\alpha$ -bungarotoxina, uma  $\alpha$ -neurotoxina presente na peçonha da serpente elapidae *Bungarus multicinctus* (MINOVSKI *et al.* 2019; GUZMAN *et al.*, 2021).

De acordo com Cavalcante e colaboradores (2011), serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* geralmente não apresentam sinais de neurotoxicidade aparente pós ofidismo, no entanto, estudos demonstraram que peçonha de serpentes deste gênero, produziram bloqueio neuromuscular em preparações neuromusculares de anfíbios, aves e mamíferos, *in vitro*.

Em estudo *in vitro* realizado por Borja-Oliveira e colaboradores (2003), a peçonha de *Bothrops neuwiedii pauloensis* demonstrou bloquear a ação neuromuscular sem deprimir a ação da acetilcolina, indicando deste modo que esta peçonha pode ter ação neurotóxica pré-sináptica. Liesener e colaboradores (2007), em estudos realizado *in vitro*, baseado em triagem rápida utilizando Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray, relataram que as frações F33 e F34 identificadas da peçonha *Bothrops moonjeni*, indicou perda da atividade de AChE, sendo estas frações um possível inibidor da atividade desta enzima.

Ferraz e colaboradores (2014) identificaram a atividade neurotóxica causada pela PLA<sub>2</sub>-BthTX-I, presente na peçonha de *Bothrops jararacussu*, sobre o músculo do diafragma de camundongos, causando bloqueio neuromuscular irreversível. A ação desta fosfolipase está relacionada à ação pré-sináptica antes de causar despolarização de membrana (FERRAZ *et al.*, 2014).

De acordo com Melaré e colaboradores (2016), o bloqueio da atividade neuromuscular observado, causado pela peçonha de *Bothrops jararacussu*, pode estar relacionado a uma ação bifásica da peçonha de Viperidae. Inicialmente, a facilitação da atividade neuromuscular causada pela liberação de cálcio intracelular proveniente do retículo sarcoplasmático que sofreu danos na sua estrutura. Posteriormente, ocorre o bloqueio das respostas musculares o que seria

resultado da destruição de terminais nervosos e axônios por meio de enzimas apoptóticas devido o influxo de cálcio anterior (MELARÉ *et al.*, 2016).

Os nossos resultados, no entanto, sugerem que a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* atua como um possível inibidor ou redutor da atividade da AChE, sendo identificada deste modo, ação neutotóxica *in vivo*. O bloqueio desta enzima resulta em uma maior presença da ACh e consequentemente sua ligação com receptores pós-sinápticos (ARAÚJO *et al.*, 2016). O acúmulo de ACh na junção neuromuscular do peixe-zebra aumenta a estimulação de neurônios colinérgicos, podendo resultar em uma resposta alterada na motilidade do peixe-zebra (RICHETTI *et al.*, 2011; NAYAK *et al.*, 2020).

A atividade de glutathione-S-transferase (GST) foi reduzida ( $p < 0,05$ ) apenas na concentração de 3,1 µg/mL da peçonha de *Bothrops jararacussu* (Figura 13B). As demais concentrações (6,2 e 12,5 µg/mL) no entanto, não apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) do grupo controle. As GSTs são uma família de enzimas responsáveis por realizar a detoxificação de compostos xenobióticos através da fase II do processo de biotransformação, onde catalisam a reação do nucleófilo GSH com o substrato eletrófilo, resultando na síntese de um produto mais hidrofílico e excretável (GLISIC *et al.*, 2015; TIERBACH *et al.*, 2018). A atividade da GST indica uma importante ação antioxidante em resposta da célula a substâncias exógenas e ao estresse oxidativo (MASSARSKY *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2020; SINGH e REINDL, 2021).

Estudos já relataram que a peçonha de serpentes pode induzir ao aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (AL-ASMARI *et al.*, 2016; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2019; ABDELGLIL *et al.*, 2021). A produção dessas espécies pode estar relacionada com o aumento dos efeitos citotóxicos e necrosantes observados nos acidentes ofídicos (TOYAMA *et al.*, 2021).

Al-Asmari e colaboradores (2016) demonstraram em seus estudos que o efeito tóxico das peçonhas das serpentes *Bitis arietans*, *C. gasperettii*, *E. coloratus* e *Echis pyramidum* pertencentes a família Viperidae, aumentaram a concentração de espécies reativas de oxigênio nas linhas de células cancerígenas HCT-8 (colorretal) e MDA-MB-231 (mama), o que resultou em aumento do processo apoptótico nestas células. A alta expressão de espécies reativas de oxigênio pode estar atribuída a presença de L-amino oxidase (LAAO) nas peçonhas, o que contribui para o aumento no número de radicais livres que induzem o aumento dessas proteínas pró-apoptóticas (IZIDORO *et al.*, 2014; AL-ASMARI *et al.*, 2016).

Machado e colaboradores (2019) demonstraram que a BjuLAAO-II (CARONE *et al.*, 2017), uma L-amino oxidase presente na peçonha de *Bothrops jararacussu*, aumentou os

níveis de espécies reativas de oxigênio na linhagem de célula cancerígena hepática humana (HepG2), o que induziu a alterações como danos no DNA e morte celular, o que corrobora com os estudos anteriores sobre os efeitos da LAAOs ofídicas.

Os efeitos citotóxicos produzidos pela LAAOs ofídicas estão possivelmente relacionados com a ação catalítica desta enzima sobre a desaminação de L-aminoácidos em seus  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes, além de gerar peróxido de hidrogênio e amônia a partir de intermediários de aminoácidos (MACHADO *et al.*, 2019). No entanto, a produção de radicais livres causados pelo empenhamento não se limitam apenas a atuação dessas proteínas.

A Asp-49 PLA<sub>2</sub> BThTX-II (GUTIÉRREZ *et al.* 1991) de *Bothrops jararacussu* além de causarem danos ao tecido muscular, aumentam a produção de mediadores pró-inflamatórios como ácido araquidônico, que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio através da estimulação de NADPH oxidase (TOYAMA *et al.*, 2021). A NADPH oxidase na presença de metais como Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>+</sup>, reduz o peróxido de hidrogênio e dá origem ao radical hidroxila que vão causar lipoxidação de membrana, modificando assim, a estrutura e a fluidez de membrana celular (POSPÍŠIL *et al.*, 2019; SACHDEV *et al.*, 2021). O radical hidroxila pode causar também a oxidação do ácido araquidônico o que resulta em morte celular (ADIBHATLA E HATCHER, 2003).

A importância da atividade antioxidante da glutathione (GSH) sobre a proteína BThTX-II (GUTIÉRREZ *et al.* 1991), foi relatada em estudos realizados por Toyama e colaboradores (2020), resultando na redução a resposta inflamatória causada por esta PLA<sub>2</sub>. Isso acontece, possivelmente, devido a presença de GSH, um cofator necessário para aumentar a especificidade da GST pelo segundo substrato, para tornar o produto da reação de catálise menos tóxico e mais solúvel para ser excretado (TANG *et al.*, 2006).

Daukantiené e colaboradores (2014) e Fujitani e colaboradores (2019) demonstram em seus estudos que a redução ou silenciamento da enzima GST, está relacionada ao aumento de radicais livres, e consequentemente, do estresse oxidativo. Em estudo realizado por Marchi (2018), o autor relata que a inibição da atividade de GST pode resultar em maiores efeitos tóxicos de endotoxinas e xenobióticos, aumentando assim, o risco de formação de espécies reativas de oxigênio sendo estas responsáveis pelo desenvolvimento de estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra.

A redução da atividade de GST analisada em nosso estudo induziu ao aumento de espécies reativas de oxigênio que possivelmente podem aumentar o estresse oxidativo em larvas de peixe-zebra. Possivelmente, a redução da atividade antioxidante de GST observada, pode estar relacionada ao subjugamento da defesa antioxidante natural devido produção excedente

de radicais livres, conforme sugerido por Ighodato e Akinloye (2018). Consequente, o ambiente oxidativo resulta na oxidação de biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios) (IGHODATO E AKINLOYE, 2018; POSPÍŠIL *et al.*, 2019). Por tanto, a redução da GST e o aumento da atividade da enzima CAT que será posteriormente discutido, embasa que ocorreu desenvolvimento de estresse oxidativo nas larvas analisadas. Este efeito possivelmente pode estar relacionado a atividade de LAAOs presentes nesta peçonha.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima essencial na via de produção de energia anaeróbia responsável por converter piruvato em lactato através da redução de  $\text{NAD}^+$  em NADH, e vice e versa (FARHANA e LAPPIN, 2021). De acordo com Muniz e colaboradores (2021), esta enzima está amplamente distribuída no corpo de peixes, estando esta enzima relacionada ao metabolismo anaeróbico. A atividade desta enzima tem sido amplamente utilizada como marcador de lesão a nível de tecidos e órgãos e alterações na produção de energia em animais estressados (KLEIN *et al.*, 2020; DAR *et al.*, 2020).

Quintaneiro e colaboradores (2017) ao estudarem os efeitos tóxicos do herbicida S-metolachlor em larvas de peixe-zebra, observaram inibição da atividade da LDH nestas larvas por esse xenobiótico. Os autores sugeriram que a inibição da atividade desta enzima pode ser um indicativo de diminuição da capacidade glicolítica das larvas de peixe-zebra, além disso, a inibição poderia induzir necrose celular resultando na exposição desta enzima para o meio extracelular (QUINTANEIRO *et al.*, 2017). A inibição de LDH aumenta a produção de radicais livres o que resulta na destruição da membrana mitocondrial e induz apoptose celular subsequente (LIU *et al.*, 2019; YOUNG *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2020).

No entanto, soro de pacientes acometidos redução de atividade glicolítica por acidente ofídico demonstram aumento nos níveis séricos de LDH (KULKARNI; T, 2016; RANJINI *et al.*, 2021). Zeni e colaboradores (2007), observaram aumento nos níveis de LDH analisados em baço, músculo esquelético, rins, fígado e pulmões de camundongos Swiss que receberam dose subletal (25µg ou 50µg) da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

Alta quantificação desta enzima também foi observada em cultura celular de macrófagos após incubação destas células com as proteínas isoladas BThTX-I (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988) e BThTX-II (GUTIÉRREZ *et al.* 1991) nas concentrações de 5 e 25 µg/mL respectivamente, o que indicou dano celular, em estudo realizado por Pereira dos Reis e colaboradores (2019).

Altos níveis de LDH também foram produzidos em linhagem de células de mioblasto de camundongo, denominadas de C2C12, quando incubadas com 12.5 µg/mL da peçonha de *Bothrops jararacussu* em realizado por Silva e colaboradores (2016). Os resultados sugerem

que da enzima LDH seja um possível indicador de mionecrose, efeito tóxico comumente relacionado a atuação de miotoxinas presentes nesta peçonha (SILVA *et al.*, 2016).

Contudo, nossos resultados divergem dos resultados anteriormente apresentados por Zeni e colaboradores (2007) e Silva e colaboradores (2016). No modelo peixe-zebra, os resultados obtidos permitiram inferir que a peçonha de *Bothrops jararacussu* causou redução da enzima LDH em todas as concentrações analisadas, o que pode culminar nas alterações observadas por Quintaneiro e colaboradores (2017) em larva desses animais.

A atividade da catalase (CAT) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) aumentada nas larvas de peixe-zebra tratadas com a peçonha de *B. jararacussu* nas concentrações subletais 3,1 µg/mL e 6,2 µg/mL (figura 14D), quando comparadas com o controle. A catalase é uma peroxidase presente em quase todos os tecidos vivos que utilizam oxigênio. Esta enzima utiliza o ferro ou manganês como co-fator para degradar ou reduzir o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio molecular, realizando assim, o processo de desintoxicação (IGHODATO E AKINLOYE, 2018).

Aumento da atividade desta enzima já foi descrito em amostras de sangue de pacientes que sofreram acidentes ofídicos, em animais injetados e linhagens celulares analisadas com a peçonha e/ou proteínas isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* (STRAPAZZON *et al.*, 2014; COSTAL-OLIVEIRA *et al.*, 2019; MORÁS *et al.*, 2020; BURIN *et al.*, 2020).

Strapazzon e colaboradores (2015) relataram aumento significativo na atividade de catalase em sangue de pacientes que sofreram ofidismo por serpentes *B. jararacussu* e *B. jararaca*. Esses dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo. De acordo com Agostinetto e colaboradores (2017) e Boriskin e colaboradores (2019) o aumento de atividade desta enzima está relacionado ao aumento da produção de  $H_2O_2$ , substrato específico desta enzima.

Morás e colaboradores (2020) ao analisarem a toxicidade *in vitro* da peçonha bruta de *Bothrops jararaca* sobre diferentes linhagens de células tumorais, identificaram que o aumento significativo da atividade de catalase. A resposta antioxidante desta enzima ocorreu devido ao aumento de  $H_2O_2$  possivelmente causado pela desaminação de L-aminoácidos pela LAAOs presente nesta peçonha. Além de induzir estresse oxidativo, a peçonha desta serpente demonstrou ativar a via apoptótica nas linhagens celulares analisadas devido dano mitocondrial, induzindo deste modo, a citotoxicidade (MORÁS *et al.* 2020).

A presença de LAAOs, presentes e sua ação no empeçonhamento causado pela serpente *Bothrops jararacussu*, como a BjussuLAAO-II, já foi descrita nos resultados anteriores desta pesquisa. Consequente a resposta antioxidante expressada nas larvas de peixe-zebra pela

atividade de GST e CAT podem estar relacionadas ao estresse oxidativo que pode induzir a citotoxicidade desenvolvidas pela BjuusuLAAO-II e Asp-49 PLA<sub>2</sub> BThTX-II desta peçonha.

Hiu e Yap (2020) relatam que PLA<sub>2</sub> e LAAO ofídicas contribuem para um estresse oxidativo elevado devido às suas ações catalíticas, sendo a PLA<sub>2</sub> de produzindo espécies reativas de oxigênio por meio da lipólise e a LAAO partir da atividade catalítica gerando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como produto final, causando desta forma citotoxicidade. Porém, as vias de sinalização de morte celular associadas à exposição a essas toxinas enzimáticas, segundo os autores, ainda não estão totalmente elucidadas (HIU e YAP, 2020).

Além disso, o acidente ofídico causado por serpentes do gênero *Bothrops* induzem a reação inflamatória no tecido lesionado, o que acaba por induzir a quimiotaxia de neutrófilos, para o local, como resposta de defesa (TEIXEIRA *et al.*, 2019; MOREIRA *et al.*, 2021). Estas células produzem espécies reativas de oxigênio para regular o processo inflamatório, demonstrando que a peçonha pode induzir ao estresse oxidativo de muitos modos através do ofidismo (CARONE, *et al.*, 2017; ZULIANI *et al.*, 2020).

## 5 CONCLUSÃO

Nossos estudos demonstraram que a da peçonha de *B. jararacussu* causa toxicidade em embriões e larvas de peixe-zebra. Em embriões, a presença da peçonha causou mortalidade e hipoatividade dos movimentos espontâneos da cauda em embriões tratados com concentrações subletais. Estes resultados nos permitiram inferir que os efeitos tanto de mortalidade embrionária, quanto de hipoatividade de cauda foram possivelmente desencadeados por componentes de baixa massa molecular ( $< 3$  kDa) presentes nesta peçonha. Em larvas de peixe-zebra, a quantificação das enzimas biomarcadores indicou desenvolvimento de efeitos neurotóxicos, indução de estresse oxidativo e metabólico, possivelmente causados pela ação de proteínas como as PLA<sub>2</sub>S e/ou LAAOs presentes na peçonha. Avaliações toxicológicas utilizando o peixe-zebra como modelo são escassas, no entanto, este estudo apresentou resultados promissores que fomentam o desenvolvimento de futuras pesquisas em toxicologia ofídica usando este animal como organismo modelo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGLIL, M.I. *et al.* Evaluation of the Anticancer Potential of Crude, Irradiated *Cerastes cerastes* Snake Venom and Propolis Ethanolic Extract & Related Biological Alterations. **Molecules** v. 26, p. 7057, 2021.
- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. **J Neurosci Res.** v. 73, n. 3, p. 308-315, 2003.
- AGOSTINETTO, D. *et al.* Metabolic activity of wheat and ryegrass plants in competition. **Planta Daninha.** v. 35, p. 1-7, 2017.
- AGUIAR, W. S. *et al.* Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, v. 186, p. 67–77, 2020.
- AL-ASMARI, A. K.; RIYASDEEN, A.; AL-SHAHRANI, M. H. ISLAM, M. Snake venom causes apoptosis by increasing the reactive oxygen species in colorectal and breast cancer cell lines. **Onco Targets Ther.** v. 9, p. 6485–6498, 2016.
- ALBERTO-SILVA, C. *et al.* Novel neuroprotective peptides in the venom of the solitary scoliid wasp *Scolia decorata ventralis*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v. 27, 2021.
- ALENCAR, L. R. V. *et al.* Diversification in vipers: phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 105, p. 50-62, 2016.
- ALI, M. K. *et al.* The Protective Layer of Zebrafish Embryo Changes Continuously with Advancing Age of Embryo Development (AGED). **Revista J Toxic Pharm.** v.1, n. 2, p. 1-8, 2017
- ALMEIDA, A. A. DE L.; MACEDO, M. E. Acidentes ofídicos com serpentes brasileiras em Minas Gerais. **Acervo da Iniciação Científica**, v. 1, p. 1–11, 2015.
- ALMEIDA, J. S. C. B. *et al.* Soroterapia antiveneno: tratamento das reações adversas. **Med Minas Gerais.**, v. 22, p. 40–44, 2012.
- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Revista de Biologia Tropical.** v. 36, n. 2B, p.563-565, 1988.
- ALVES, L. M. C. *et al.* Diagnóstico e tratamento de acidente ofídico por serpente do gênero *Bothrops* em cão. **Vet. Not.**, v. 26, n. 1, p. 22-31, 2020.
- AMORIM, A. M. V. *et al.* Effectiveness of citrate as anticoagulant in continuous veno-venous hemodialysis with 60 hours cycle in intensive care unit. **ConScientiae Saúde.** v.9, n. 2, p. 187-193, 2010.
- ANDERSEN, M. L.; WINTER, L. M. F. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. **An Acad Bras Cienc**, v. 91, p. 1-14, 2019.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. *et al.* Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A 2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 723–732, 2002.

ARAÚJO, C. R. M. *et al.* Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Rev. Virtual Quim.**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

ARAÚJO, L. M. G. **Revisão bibliográfica sobre os aspectos funcionais, estruturais e aplicações terapêuticas de diferentes fosfolipases A2 isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis***. 2018. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado). Curso em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba-MG, 2018.

ASEGA, A. F. *et al.* Cleavage of proteoglycans, plasma proteins and the platelet-derived growth factor receptor in the hemorrhagic process induced by snake venom metalloproteinases. **Scientific Reports**. v.10, n. 12912, 2020.

AZEVEDO, F.V. *et al.* Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 82, p. 671-677, 2016.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Zebrafish at the Interface of Development and Disease Research**, v. 124, p. 331–367, 2018.

BARBOSA, A. M. *et al.* Low-level laser therapy decreases local effects induced by myotoxins isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 470-479, 2010.

BARBOSA, L. G. *et al.* A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjussuLAAO-II and BmooLAAO-II isolated from Brazilian *Bothrops* snake venoms. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 15, n. 167, p. 267-278, 2021.

BARMORE, W. *et al.* Biochemistry, Clotting Factors. **StatPearls [Internet]**, 2020.

BERTOTTO, L. B. *et al.* Exploring interactions between xenobiotics, microbiota, and neurotoxicity in zebrafish. **Neurotoxicology**. v. 76, p. 235–244, 2020.

BICKLER, P. E. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 68, 2020.

BISNETO, P. F.; KAEFER, I. L. Reproductive and feeding biology of the common lancehead *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae) from central and southwestern Brazilian Amazonia. **Acta Amaz.**, v. 49, n. 2, p. 105 – 113, 2019.

BOLDRINI-FRANÇA, J. *et al.* Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4476, 2020.

BORISKIN, P. *et al.* Relationship of catalase activity distribution in serum and tissues of small experimental animals. IOP Conf. Ser.: **Earth Environ. Sci.** 403 012113, 2019.

BORJA-OLIVEIRA, C. R. *et al.* Purification and n-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA2, neuwiedtoxin-I and neuwiedtoxin-II, from *Bothrops neuwied pauloensis* (Jararaca pintada) venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 115, 2007.

- BORTOLETO, R. K. *et al.* Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1307–1312, 2002.
- BRANNEN, K. C. *et al.* Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 66–77, 2010.
- BRAUNBECK, T. *et al.* The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16247–16261, 2015.
- BRAZ, H. B. P. **Evolução da viviparidade nas serpentes da tribo Hydropsini**. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2013.
- BROMÉE, T. *et al.* Uneven evolutionary rates of bradykinin B1 and B2 receptors in vertebrate lineages. **Gene**, v. 373, p. 100–108, 2006.
- BURIN, S. M. *et al.* *Bothrops moojeni* L-amino acid oxidase induces apoptosis and epigenetic modulation on Bcr-Abl<sup>+</sup> cells. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.**, 2020.
- CALDEIRA, C. A. S. *et al.* Antimicrobial peptidomes of *Bothrops atrox* and *Bothrops jararacussu* snake venoms. **Amino Acids**. v. 53, n. 10, p. 1635-1648, 2021.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. **Cornell Univ. Press**. Ithaca, p. 425, 1989.
- CAMPOS, E. G. **Peixe-zebra como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada**. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto- SP, 2016.
- CANHAS, I. N. *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, p. 309-319, 2017.
- CARONE, S. E. I. *et al.* A new l-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities. **Int J Biol Macromol**, v. 103, p. 25-35, 2017.
- CARONE, S. E. I. *et al.* BjSP, a novel serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 357, p. 50-61, 2018.
- CARVALHO, B. M. A. *et al.* Snake Venom PLA2s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2013.
- CARVALHO, J. C. T. *et al.* Effects of *Bothrops alternatus* venom in peixe-zebra: a histopathological study. **Inflammopharmacology**. v. 26, n. 1, p. 273-284, 2017.
- CASSAR, S. *et al.* Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chem. Res. Toxicol.** v. 33, n. 1, p. 95–118, 2020.
- CAVALCANTES, W. L. G. *et al.* Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom. **J Venom Res.** v. 2, p. 37–41, 2011.

- CHANGEUX, J. P. *et al.* Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 67, n. 3, p. 1241-1247, 1970.
- CHEN, Z.-Y. *et al.* The Effect of the Chorion on Size-Dependent Acute Toxicity and Underlying Mechanisms of Amine-Modified Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2864, 2020.
- CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. **Acta Tropical**, v. 107, n. 2, p. 71–79, 2008.
- CHOI, S. I.; HWANG, S. W. Depolarizing Effectors of Bradykinin Signaling in Nociceptor Excitation in Pain Perception. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 26, n. 3, p. 255-267, 2018.
- CORRÊA, L. C. *et al.* Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into  $\text{Ca}^{2+}$ -independent catalytic mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v.1784, n. 4, p. 591–599, 2008
- CORREA-NETTO, C. *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, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 11–42, 2018.
- COSTA, H. C. *et al.* Serpentes do município de Viçosa, Mata Atlântica do sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 354–377, 2010.
- COSTA, N. C. S. **Caracterização parcial e avaliação do potencial antibacteriano e antitumoral de uma L-aminooxidase isolada de *Bothrops jararacussu***. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado)- Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal da Viçosa, Minas Gerais, 2012.
- COSTAL-OLIVEIRA, F. *et al.* L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 781, 2019.
- D’COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish**, v. 6, n. 2, p.169-77, 2009.
- D’ AMORA, M.; GIORDANI, S. The Utility of Zebrafish as a Model for Screening Developmental Neurotoxicity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, 2018.
- DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from Small Fry: The Zebrafish as a Genetic Model Organism for Aquaculture Fish Species. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 329–345, 2006.
- DALZOCHIO, T. *et al.* The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, n. 4, p. 283–298, 2016.
- DAR, O. I.; SHARMA, S.; SINGH, K.; SHARMA, A.; BHARDWAJ, R.; KAUR, A. Biomarkers for the toxicity of sublethal concentrations of triclosan to the early life stages of carps. **Scientific Reports**, v. 10, n. 17322, 2020.
- DAUKANTIENĖ, L. *et al.* The significance of reduced glutathione and glutathione S-transferase during chemoradiotherapy of locally advanced cervical cancer. **Medicina**, v. 50, n. 4, p. 222–229, 2014.

- DEBONO, J. *et al.* Canopy Venom: Proteomic Comparison among New World Arboreal Pit-Viper Venoms. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 210–229, 2016.
- DE-SIMONE, S. G. *et al.* Linear B-cell epitopes in BthTX-1, BthTX-II and BthA-1, phospholipase A2's from *Bothrops jararacussu* snake venom, recognized by therapeutically neutralizing commercial horse antivenom. **Toxicon**, v. 72, p. 90–101, 2013.
- DOMINGUES, I. *et al.* Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 338–345, 2010.
- DOMINGUES, I.; GRAVATO, C. Oxidative Stress Assessment in Zebrafish Larvae. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 1797, p. 477–486, 2018.
- DUARTE, R. C. F. *et al.* Thrombin generation test for evaluating hemostatic effects of Brazilian snake venoms. **Toxicon**, v. 163, p. 36–43, 2019.
- DUNÉR, T. *et al.* Cloning, structural characterization and functional expression of a zebrafish bradykinin B2-related receptor. **Biochemical Journal**, v. 364, n. 3, p. 817–824, 2002.
- EAGLE, H. The coagulation of blood by snake venoms and its physiologic significance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, n. 5, p. 613–639, 1937.
- EL-AZIZ, T. M. A. *et al.* Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 564–589, 2019.
- ELÍFIO-ESPOSITO, S. L. *et al.* A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.13, n. 4, 2007.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.
- EVANS, A. M.; CHOINIERE, J. N.; ALEXANDER, G. J. The cutting-edge morphology of the mole snake's dental apparatus. **PeerJ**, 7, e6943, 2019.
- FARHANA, A.; LAPPIN, S. L. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. **StatPearls Publishing**, 2021.
- FERRAZ, C. R. *et al.* Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. **Front. Ecol. Evol.** v. 7, p. 218, 2019.
- FERRAZ, M. C. *et al.* An Isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is Active against the *in Vitro* Neuromuscular Paralysis of *Bothrops jararacussu* Snake Venom and Bothropstoxin I, and Prevents Venom-Induced Myonecrosis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5790–5805, 2014.
- FERREIRA, L. A. *et al.* Biologically active peptides from *Bothrops jararacussu* venom. **Agents Actions Suppl.** v. 36, p. 209–214, 1992.
- FERREIRA, S. H. *et al.* A new bradykinin-potentiating peptide (Peptide P) Isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu Tapete, Urutu dourado). **Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 33–40, 1992.

FERREIRA, S. S. **Estudos bioquímicos e toxicológicos comparativos entre as peçonhas de macho e fêmea de *Bothrops matogrossensis***. 88 f. Dissertação (Mestrado)– Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa –PB, 2017.

FINNEY, D. J. (1952) **Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve**, 2nd edn. Cambridge University Press, New York, NY, US.

FRANÇA, F. G. R., BRAZ, V. S., ARAÚJO, A. F. B. Selective advantage conferred by resemblance of aposematic mimics to venomous model. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 3, p. 1–5, 2017.

FRANÇA, S. 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.

FREIRE, M. C. L. C. *et al.* Non-Toxic Dimeric Peptides Derived from the Bothropstoxin-I Are Potent SARS-CoV-2 and Papain-like Protease Inhibitors. **Molecules**. v. 26, n. 16, p. 4896, 2021.

FREITAS, D.C.; GOMES, W.P.B.; SILVA, R.C.C.; SEIBERT, C.S. Serpentes: é possível conviver com elas? **Revista Brasileira de Ecoturismo**, v. 13, n.3, p. 572-586, 2020.

FREITAS-DE-SOUSA, L. A. *et al.* Size Matters: An Evaluation of the Molecular Basis of Ontogenetic Modifications in the Composition of *Bothrops jararacussu* Snake Venom. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 791-816, 2020.

FUJITANI, N. *et al.* Silencing of Glutathione S-Transferase Pi Inhibits Cancer Cell Growth via Oxidative Stress Induced by Mitochondria Dysfunction. **Scientific Reports**. v. 9, n. 14764, 2019.

GIERTEN, J. *et al.* Automated high-throughput heartbeat quantification in medaka and zebrafish embryos under physiological conditions. **Revista Sci Rep**. v. 10, n. 1, p. 2046-2058, 2020.

GIOZZA, A. P. **Evolution of caudal luring in Viperidae OPPEL 1811**. 2020. 165 f., il. Dissertação (Mestrado em Zoologia) —Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

GLISIC, B. *et al.* Characterization of glutathione-S-transferases in Zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50–62, 2015.

GONZA´LEZ-FRAGA, J. *et al.* Quantification of Spontaneous Tail Movement in Zebrafish Embryos Using a Novel Open-Source MATLAB Application. **Zebrafish**. v. 16, n. 2, p. 214-216, 2019.

GREAT BRITAIN. **Annual Statistics of Scientific Procedures on Living Animals, Great Britain, 2018**. 2018. Disponível em: <[https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/835935/annual-statistics-scientific-procedures-living-animals-2018.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/835935/annual-statistics-scientific-procedures-living-animals-2018.pdf)>. Acesso em: 05 jul. 2021.

GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina el Caribe: Una vision integral de carácter regional. **Bol. Mal. Salud Amb.**, v. 51, n. 1, p. 1–16, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 55, n. 3, p. 217–229, 1991.

GUZMAN, L. *et al.* Evaluation of the effects of acetylcholinesterase inhibitors in the zebrafish touch-evoked response: quantitative vs. qualitative assessment. **Environmental Sciences Europe**. v. 32, n. 145, p. 1-12, 2020.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S transferases. In: Methods in enzymology. **Academic Press**. p. 398-405, 1981.

HAMDAN, B. *et al.* A complex biogeographic history of diversification in Neotropical lancehead pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 29, n. 2, p. 1–14, 2019.

HAMM, J. T. *et al.* Characterizing sources of variability in zebrafish embryo screening protocols. **ALTEX**. v. 36, n. 1, p. 103-120, 2019.

HARRIS, J. B.; SCOTT-DAVEY, T. Secreted Phospholipases A2 of Snake Venoms: Effects on the Peripheral Neuromuscular System with Comments on the Role of Phospholipases A2 in Disorders of the CNS and Their Uses in Industry. **Toxins**. v. 5, p. 2533- 2571, 2013.

HATAKEYAMA, D. M. *et al.* Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v. 26, p. 1-17, 2020.

HAYASHI, M.A.F.; CAMARGO, A. C. M. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1163–1170, 2005.

HILL, A. J. *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol Sci**. v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HIU, J. J.; YAP., M. K. K. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Biochem Soc Trans**. v. 48, n. 2, p. 719–731, 2020.

HOLTZMAN, N. G. *et al.* Learning to Fish with Genetics: A Primer on the Vertebrate Model *Danio rerio*. **Genetics**. v. 203, n. 3, p. 1069-89, 2016.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. *et al.* Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**. v. 26, p. 615–627, 1988.

HOWE, K. C. *et al.* The peixe-zebra reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HUANG, Y. *et al.* Exposure to Oxadiazon-Butachlor causes cardiac toxicity in zebrafish embryos. **Environmental pollution**, v. 265, n. 114775, p. 1-10, 2020.

ICHIKI, T.; DZHOYASHVILI, N.; JR, J. C. B. Natriuretic Peptide Based Therapeutics For Heart Failure: Cenderitide: A Novel First-In-Class Designer Natriuretic Peptide. **Int J Cardiol**. v. 15, n. 281, p. 166–171, 2019.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**. 2017.

- ISABEL, T. F. *et al.* Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 115, p. 49–54, 2016.
- IZIDORO, L. F. M. *et al.* Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **BioMed Research International**, p. 1-19, 2014.
- JÚNIOR, J. O. O. *et al.* Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Rev Dor**, v. 17, p. 35-42, 2016.
- KARAMI, A. *et al.* Biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) larve exposed to pristine low-density polyethylene fragments. **Environmental Pollution**, v. 223, p. 466–475, 2017.
- KARDONG, K.V. *et al.* Reptile venom glands: form, function and future. In: **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Taylor & Francis Group, LLC, Florence, p. 65-91, 2009.
- KASHIMA, S. *et al.* Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211–219, 2004.
- KERKKAMP, H. *et al.* Whole snake venoms: Cytotoxic, anti-metastatic and antiangiogenic properties. **Toxicon**, V.150, p. 39-49, 2018.
- KHAN, R.; ALHEWAIRINI, S. (2019). Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism. Current Trends in Cancer Management, Liliana Streba, Dan Ionut Gheonea and Michael Schenker, **IntechOpen**, DOI: 10.5772/intechopen.81517.
- KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995.
- KINI, R. M. *et al.* Procoagulant Proteins from Snake Venoms. **Haemostasis** v. 31, p. 218–224, 2001.
- KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 284-311, 2016.
- KIPER, K. G.; FREEMAN, J. L. Zebrafish as a Tool to Assess Developmental Neurotoxicity. **Cell Culture Techniques**, p. 169–193, 2019.
- KLEIN, R. *et al.* Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals. **Veterinary Medicine International**, v. 2020, p. 1-11, 2020.
- KLIMANATUR ALI. **Cobra-Jararacuçu (*Bothrops jararacussu*)**. 2011. Disponível em: <<http://www.klimanaturali.org/2011/05/cobra-jararacucu-bothropsjararacussu.html>> Acesso em: 13 Mar de 2020.
- KNOGLER, L. D. *et al.* A hybrid electrical/chemical circuit in the spinal cord generates a transient embryonic motor behavior. **J Neurosci**, v.34, p. 9644–9655, 2014.
- KOENIG, J. A. *et al.* Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1374, n. 1, p. 68–77, 2016.

- KOENING, J. A. *et al.* Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1374, n. 1, p. 68–77, 2016.
- KOH, C. Y. *et al.* Crystal Structure of Thrombin in Complex with S-Variegain: Insights of a Novel Mechanism of Inhibition and Design of Tunable Thrombin Inhibitors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, e26367, 2011.7
- KÖHLER, G. A. *et al.* Phospholipase A2 and Phospholipase B activities in fungi. **Biochimica Et Biophysica Acta -Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 761, n. 11, p. 1391- 1399, 2006.
- LARRÉCHE, S. *et al.* Bleeding and Thrombosis: Insights into Pathophysiology of *Bothrops* Venom-Related Hemostasis Disorders. **Int J Mol Sci.** v. 22, n. 17, p. 9643, 2021.
- LAZAROVICI, P.; MARCINKIEWICZ, C.; LELKES, P. I. From Snake Venom's Disintegrins and C-Type Lectins to Anti-Platelet Drugs. **Toxins (Basel).** v. 11, n. 5, p. 303, 2019.
- LEÃO, S. M. **História natural, modelagem de distribuição e conservação de *Bothrops itapetiningae* Boulenger, 1907 (Serpentes: Viperidae: Crotalidae), espécie endêmica o Cerrado.** 131 f. Dissertação (Mestrado) –Curso de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília –DF, 2012.
- LEGRADI, J. B. *et al.* An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 1, 2018.
- LEMO, J. C. *et al.* Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG) Paraíba. **Bras Epidemiol.**, v. 12, n. 1, p. 50–59, 2009.
- LERRÉCHÉ, S. *et al.* Bleeding and Thrombosis: Insights into Pathophysiology of *Bothrops* Venom-Related Hemostasis Disorders. **Int J Mol Sci.** v. 22, n. 17, p. 9643, 2021.
- LI, S. *et al.* Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, 2020.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n.5, p. 353–367, 2007.
- LIESENER, A. *et al.* Screening of acetylcholinesterase inhibitors in snake venom by electrospray mass spectrometry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 2339–2349, 2007.
- LIN, F.; REID, P. F.; QIN, Z. H. Cobrotoxin could be an effective therapeutic for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, p. 1258–1260, 2020.
- LIU, Y. J. *et al.* LDHA Suppression Altering Metabolism Inhibits Tumor Progress by an Organic Arsenical. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20, p. 6239, 2019.
- LOBO, L. M. *et al.* Análise comparativa dos diferentes tipos de dentição. **Acta Tecnológica.** v. 9, n. 2, p. 1-8, 2014.
- LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M. Phospholipases A2 From Viperidae Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage? **Acta Chim. Slov.** v. 58, p. 647–659, 2011.

- LOTTO, N. P. *et al.* The absence of thrombin-like activity in *Bothrops erythromelas* venom is due to the deletion of the snake venom thrombin-like enzyme gene. **PLoS One**. v. 16, n. 4, 2021.
- LUCA, E. *et al.* *ZebraBeat*: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. **Sci Rep.**, v. 4, p. 4898-4911, 2014.
- MACÊDO J.K.A.; FOX J.W. *Venom Genomics and Proteomics*. Springer; Dordrecht, The Netherlands: 2014. Biological activities and assays of the snake venom metalloproteinases (SVMPs) pp. 1–24.
- MACHADO, A. R. T. *et al.* Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-inducing effect of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararacussu* venom in a co-culture model of HepG2 and HUVEC cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 127, p. 425-432, 2019.
- MACHADO, T. **Filogenia molecular das espécies de Bothrops do grupo neuwiedi (Serpentes, Viperidae)**. 104 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- MACKESSY, S. P. Evolutionary trends in venom composition in the Western Rattlesnakes (*Crotalus viridis* sensu lato): Toxicity vs. tenderizers. **Toxicon**, v. 55, n. 8, p. 1463–1474, 2010.
- MAGALHÃES, A. E. L. A. **Panorama Atual dos Acidentes Crotálicos e Laquéticos no Brasil: perfil epidemiológico e padrão de distribuição espacial**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado). Curso em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.
- MAHARAJAN, K. *et al.* Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquatic Toxicology**, 196, 132–145, 2018.
- MARCEAU, F. *et al.* Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. **International Immunopharmacology**, v. 82, p. 106305, 2020.
- MARCHI, F. C. **Avaliação da toxicidade da proteína antifúngica MO-CBP3 de *Moringa oleifera* Lam. aos estágios iniciais de desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*)**. 2018. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado)- Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- MARCUSSI, S. *et al.* Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v. 28, n. 12, p. 2328–2339, 2007.
- MARTIN, G. L. *et al.* Effects of pH changes of stock normal saline solution on 5 percent red cell suspension. **Immunohematology**, v. 30, n. 3, p. 126-134 2014
- MASSARSKY, A. *et al.* Glutathione and zebrafish: old assays to address a current issue. **Chemosphere**. v. 168, p. 707–715, 2017.
- MAZZI, M. V. *et al.* A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 215–223, 2004.

McDIARMID, R.W.; CAMPBELL, J.A.; TOURÉ, T.A. **Snake Species of the World, a Taxonomic and Geographic Reference**. The Herpetologists' League, Washington, D. C., v.1, 1999.

MCHARDY, S. F. *et al.* C.Recent advances in acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update on the patent literature (2012-2015). **Expert Opin Ther Pat**, v.27, n. 4, p. 455-476 2017.

MELARÉ, R. *et al.* Ultrastructural aspects of mouse nerve-muscle preparation exposed to *Bothrops jararacussu* and *Bothrops bilineatus* venoms and their toxins BthTX-I and Bbil-TX: Unknown myotoxic effects. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 11, p. 1082–1089, 2016.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, D. *et al.* Rattlesnake *Crotalus molossus nigrescens* venom induces oxidative stress on human erythrocytes. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis** v. 23, 2017.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H; MÁLAQUE, C.M.S; HADDAD, V. (orgs.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, 2ed: p. 42-60, 2009.

MELLO, E. M. **Endo e ectoparasitos de serpentes *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758 (Viperidae) de algumas localidades de Minas Gerais**. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MELLO, M. M. *et al.* Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos notificados no estado de Goiás, no período entre 2006 e 2008. In: 2º Simpósio Nacional de Ciência e Meio Ambiente, 2011, Anápolis. **Anais SNCMA Anápolis: UniEvangélica**, 2011. Disponível em: < <http://anais.unievangelica.edu.br/index.php/sncma/article/view/1756/530>> Acesso em 19 de jan. 2011.

MENDES, M. P. G.; SOUZA, C. A. DE J. Aplicação de modelos animais na pesquisa biomédica experimental. **Revista de Saúde Da Fiaciplac**, v. 4, n. 2, p. 41–58, 2017.

METAIRON, S. *et al.* Inorganic elements in blood of mice immunized with snake venom using NAA and XRF techniques. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 309, n. 1, p. 59–64, 2016.

MEYERS, J. R. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 16, n. 1, p. 1-26, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidente por animais peçonhentos: o que fazer como evitar**. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 29. mai. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidente por animais peçonhentos: o que fazer como evitar**. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 29. mai. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. **Acidente por animais peçonhentos**. 2019. Disponível em:<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>> Acesso: 26/05/2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

- MINOVSKI, N. *et al.* Revisiting fish toxicity of active pharmaceutical ingredients: Mechanistic insights from integrated ligand-/structure-based assessments on acetylcholinesterase. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 170, p. 548-558, 2019.
- MORAES, R. A. **Variações em caracteres morfológicos e ecológicos em populações de *Bothrops jararaca* (serpentes: viperidae) no estado de São Paulo.** 146 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- MORÁS, A. M. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Bothrops jararaca* venom mediated by mitochondrial depolarization. **Toxicology and Toxic Effects.** v. 4, n. 1, p. 001-008, 2020.
- MOREIRA, V. *et al.* Inflammatory Effects of *Bothrops* Phospholipases A2: Mechanisms Involved in Biosynthesis of Lipid Mediators and Lipid Accumulation. **Toxins (Basel).** v. 13, n. 12, p. 868, 2021.
- MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1099–1114, 2005.
- MOURA, E. C. **Atividade anti-angiogênica da fosfolipase A2 (PLA2 Lys-49) BnSP-7 isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*.** 2016. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- MUNAWAR, A. *et al.* Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 474, 2018.
- MUNIZ, M. S.; HALBACH, K.; ARARUNA, I. C. A.; MARTINS, R. X.; SEIWERT, B.; LECHTENFELD, O.; REEMTSMA, T.; FARIAS, D. Moxidectin toxicity to zebrafish embryos: Bioaccumulation and biomarker responses. **Environmental Pollution.** v. 283, p. 117096, 2021.
- NASCIMENTO, D. S. **Filogenia molecular de serpentes neotropicais do grupo *Bothrops atrox* (linnaeus, 1758) (Viperidae: Crotalinae).** 63 f. Dissertação (Mestre) - Curso Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2014.
- NAYAK, A. G. *et al.* Anti-snake venom and methanolic extract of *Andrographis paniculata*: a multipronged strategy to neutralize *Naja naja* venom acetylcholinesterase and hyaluronidase. **3 Biotech**, v. 10, n. 11, p. 475-487, 2020.
- NIEWERTH, M.; KORTING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses.** v. 44, n. 10, p. 361-367, 2001.
- OGAWA, T. *et al.* Diversified Carbohydrate-Binding Lectins from Marine Resources. **Journal of Amino Acids**, p. 1–20, 2011.
- OGINO, K.; HIRATA, H. Defects of the Glycinergic Synapse in Peixe-zebra. **Front Mol Neurosci.** v. 9, n. 50, p. 1-8, 2016.
- OGUNGBEMI, A. O. *et al.* Automated measurement of the spontaneous tail coiling of zebrafish embryos as a sensitive behavior endpoint using a workflow in KNIME. **MethodsX**, v. 8, n. 101330, 2021.
- OLAoba, O. T. *et al.* Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A Structure-function Update. **Toxicon**, n. 100052, 2020.

OLIVEIRA, A. A. S.; BRIGANTE, T. A. V.; OLIVEIRA, D. P. Tail Coiling Assay in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Stage of Development, Promising Positive Control Candidates, and Selection of an Appropriate Organic Solvent for Screening of Developmental Neurotoxicity (DNT). **Revista Water**, v. 13, n. 119, p. 1-14, 2021.

OLIVEIRA, M. M. M. *et al.* Oral cavity bleeding following snakebite: A case report. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2021.

OLIVEIRA, S. *et al.* Factors Associated with Systemic Bleeding in *Bothrops* Envenomation in a Tertiary Hospital in the Brazilian Amazon. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 22, 2019.

ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES (OECD). **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD Publishing, 2013.

PAIXÃO JÚNIOR, O. B. **Estudos comparativos da composição proteica e dos efeitos citotóxico, oxidante, antioxidante e coagulante causados pelas peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni***. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

PAIXÃO-JÚNIOR, O. B. *et al.* Comparative Protein Composition and Biological Effects Caused by *Bothrops jararacussu* and *B. moojeni* Crude Venoms. **Venoms and Toxins**, v. 1, n. 1, p. 67-84, 2021.

PALACIO, T. Z. *et al.* Isolation and characterization of a novel metalloprotease inhibitor from *Bothrops alternatus* snake serum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 436–446, 2017.

PEREIRA DOS REIS, V. *et al.* Light emitting diode (LED) photobiomodulation therapy on murine macrophage exposed to Bothropstoxin-I and Bothropstoxin-II myotoxins. **Toxicon**, v. 172, p. 45-72, 2019.

PEREIRA-BITTENCOURT, M. *et al.* The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. **Anticancer Res.** v. 19, n. 5B, p. 4023-4025, 1999.

PINHEIRO-JÚNIOR, E. L. *et al.* LmrBPP9: A synthetic bradykinin-potentiating peptide from *Lachesis muta rhombeata* venom that inhibits the angiotensin-converting enzyme activity in vitro and reduces the blood pressure of hypertensive rats. **Peptides**, v. 102, p. 1–7, 2018.

PINHO, F. M. .; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001.

PIRES, W. L. *et al.* Effect of BjcuL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 30-41, 2017.

POSPÍŠIL, P.; PRASAD, A.; RÁC, M. Mechanism of the Formation of Electronically Excited Species by Oxidative Metabolic Processes: Role of Reactive Oxygen Species. **Biomolecules**, v. 9, n. 7, p. 258, 2019.

PUZZI, M. B. *et al.* Acidentes ofídicos. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**, n. 10, p. 1–7, 2008.

QUADROS, V. A. **Avaliação do padrão comportamental de duas linhagens de peixe zebra expostas à substância de alarme em diferentes contextos**. 50f. Dissertação

(Mestrado) – Curso de Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2016.

QUINTANEIRO, C. *et al.* Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 390–400, 2017.

REN, Z. *et al.* Synthetic organic chemicals (flame retardants and pesticides) with neurotoxic potential induced behavioral impairment on zebrafish (*Danio rerio*): a non-invasive approach for neurotoxicology. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 28, p. 37534–37546, 2021.

RICARDO, H. D. *et al.* Ability of Polyanions to Antagonize the Cardiotoxic Effect of the *Bothrops jararacussu* Venom. **RevistaToxicon**, v. 60, n. 2, p. 205–206, 2012.

RICHETTI, S. K. *et al.* Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **Neuro Toxicology**, v.32, n. 1, p. 116–122, 2011.

ROSSUEL, Y. *et al.* Modeling spinal locomotor circuits for movements in developing zebrafish. **eLife**. v. 10, e67453, 2021.

ROUAULT, M. *et al.* Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: The N-terminal region is more important than enzymatic activity. **Biochemistry**, v. 45, n. 18, p. 5800–5816, 2006.

SACHDEV, S.; ANSARI, S.A.; ANSARI, M.I.; FUJITA, M.; HASANUZZAMAN, M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. **Antioxidants**. v. 10, p. 277, 2021.

SAMPURNA, B. P. *et al.* A Simple imagej-Based Method to Measure Cardiac Rhythm in Zebrafish Embryos. **Revista Inventiones**, v. 3, n. 21, p. 1-11, 2018

SANT'ANA, C. D. *et al.* BjussuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 443–454, 2008b.

SANT'ANA, C. D. *et al.* Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 500–507, 2008a.

SANTOS, P. K. **Proteoma da peçonha de *Lachesis muta rhombeata***. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Curso Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos–PB, 2013.

SCHMIDT, C. A. *et al.* Coral Venom Toxins. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, 2019.

SCHNEIDER, A. C. R. *et al.* Implementação de um novo modelo de experimentação animal – peixe-zebra. **Rev HCPA**. v. 29, n. 2, p.100-103, 2009.

SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C. The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, 2017.

- SELDERSLAGHS, I. W.T. *et al.* Locomotor activity in zebrafish embryos: A new method to assess developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 4, p. 460-471, 2010.
- SIFUENTES, D. N. *et al.* Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 28–36, 2008.
- SILTARI, A.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Bradykinin –induced vasodilatation: Role of age, ACE1-inhibitory peptide, mas- and bradykinin receptors. **Peptides**, v. 85, p. 46–55, 2016.
- SILVA, E. O.; PARDAL, P. P. O. Envenenamento por serpente *Bothrops* no município de Afuá, Ilha de Marajó, estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.9, n.3, p. 57-62, 2018.
- SILVA, G. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of *Bothrops* venom serine protease peptidic inhibitors. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 27, n. 5, 2021.
- SILVA, I. K. **Estudo da toxicidade do clioquinol sobre o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra**. 2019. 43f. Dissertação (Mestrado), Curso de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2019.
- SILVA, J. A. A. *et al.* Avaliação da concentração letal média do extrato de brácteas da *Bougainvillea glabra* Choisy em *Drosophila melanogaster*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 12, n. 2, 4 dez. 2020.
- SINGH, R. R.; REINDL, K. M. Glutathione S-Transferases in Cancer. *Antioxidants* v. 10, n. 5, p. 701, 2021.
- SINGH, S. *et al.* Structure functional insights into calcium binding during the activation of coagulation factor XIII A. **Scientific Reports**, v. 9, n. 11324, 2019.
- SOARES, A. M. *et al.* Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 2, p. 258–270, 2004.
- SOBRINHO, J. C. *et al.* Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A 2 from *Bothrops brazili* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v, 107, p. 1014–1022, 2018.
- SOUDER, J. P.; GORELICK, D. A. Quantification of estradiol uptake in zebrafish embryos and larvae. **Toxicological Sciences**, v. 158, n. 2, p. 465-474, 2017.
- SOUSA, L. F. *et al.* 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. 411–434, 2018.
- SOUSA, L. F. *et al.* Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, e2442, 2013.
- SOUZA, P. H. R. ; ROCHA, M. B. Sistemática Filogenética em Revista de Divulgação Científica : Análise da Scientific American Brasil. **Revista de Educação em Ciência e Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 75–99, 2015.

SPOLAORE, B. *et al.* Enzymatic labelling of snake venom phospholipase A2 toxins. **Toxicon**. v. 170, p. 99-107, 2019.

STRAPAZZON, J. O. *et al.* Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. **Journal of Applied Biomedicine**., 2014.

STREISINGER, G. *et al.* Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Nature**. v. 291, n. 5813, p. 293-296, 1981.

SUBENDRAN, S. *et al.* Comprehensive Hydrodynamic Investigation of Zebrafish Tail Beats in a Microfluidic Device with a Shape Memory Alloy. **Revista Micromachines**, v. 12, n. 68, p. 1-10, 2021.

SUN, K. *et al.* Expression, purification and characterization of a novel recombinant SVTLE, r- agkihpin-2, from *Gloydius halys* Pallas venom gland in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 136, p. 7–13, 2017.

SWINBURNE, I. A. *et al.* Improved Long-Term Imaging of Embryos with Genetically Encoded  $\alpha$ -Bungarotoxin. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, e0134005, 2015.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, v. 18, n. 9, p. 290, 2017.

TEAME, T. *et al.* The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal Frontiers**. v. 9, n. 3, p. 68-77, 2019.

TEIXEIRA, C. *et al.* Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thrombo inflammation. **Front Immunol**. v. 10, p. 2082, 2019.

TIERBACH, A. *et al.* Glutathione S-Transferase Protein Expression in Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 2, p. 702–712, 2018.

UETZ, P.; FREED, P.; HOŠEK, J. (eds). **The Reptile Database**. 2021. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso: 27/05/2021.

ULLAH, A. *et al.* Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 788–811, 2018.

ULLAH, A. Structure–Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 110, 2020.

VANDAMME, T. F. Use of rodents as models of human diseases. **J Pharm Bioallied Sci**. v.6, n. 1, p. 2–9, 2014.

WAHEED, H.; MOIN, S. F.; CHOUDHARY, M. I. (2017). Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 17, p. 1874-1891, 2017.

WAITE, M. The phospholipases. In DJ Hanahan, ed, **Handbook of Lipid Research**, v. 5. Plenum Press, New York, pp 111–133, 1987.

WHO. **WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins**. 2016. Disponível em: <

[https://www.who.int/biologicals/expert\\_committee/Antivenom\\_WHO\\_Guidelines\\_DJW\\_DEB\\_mn\\_cp.pdf](https://www.who.int/biologicals/expert_committee/Antivenom_WHO_Guidelines_DJW_DEB_mn_cp.pdf)>. Acessado em: 08 jul. 2021.

WHO. **World Health Organization. Snake Antivenom Immunoglobulins.** 2022.

Disponível em:<[https://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/en/](https://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/en/)>. Acesso em: 23 jan. 2022.

WHO. **World Health Organization. What is snakebite envenoming?** 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/snakebites/disease/en/>>. Acesso em: 26/05/2021.

WÜSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C.E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata:Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 445–459, 2008.

XU, X. *et al.* Hypotensive Peptides from Snake Venoms: Structure, Function and Mechanism. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 658-669, 2015.

YOUNG, A.; OLDFORD, C.; MAILLOUX, R. J. Lactate dehydrogenase supports lactate oxidation in mitochondria isolated from different mouse tissues. **Redox Biology**. v. 28, 2019.

YU, H. *et al.* Targeting lactate dehydrogenase A (*LDHA*) exerts antileukemic effects on T-cell acute lymphoblastic leucemia. **Cancer Communications**. p. 1–17, 2020.

ZACARIOTTI, R. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. **Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes.** v. 34, n. 2, p. 98-104, 2010.

ZANOTTY, Y. *et al.* Mutacytin-1, a New C-Type Lectin-Like Protein from the Venezuelan Cuaima (*Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766) (Serpentes: Viperidae) Snake Venom Inducing Cardiotoxicity in Developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. **Zebrafish**, v. 16, n. 4, p. 379–387, 2019.

ZENG, A. *et al.* Identify a Blood-Brain Barrier Penetrating Drug-TNB using Zebrafish Orthotopic Glioblastoma Xenograft Model. **Scientific Reports**, v, 7, n. 1, 2017.

ZHANG, X-L. *et al.* Experimental primates and non-human primate (NHP) models of human diseases in China: current status and progress. **Zoological Research**. v. 35, n. 6, p. 447–464, 2014.

ZHENG, Y.; WIENS, J. J. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 537–547, 2016.

ZINDLER, F. *et al.* Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. **Revista Ecotoxicol Environ Saf.** v. 186, p. 1-9 2019.

ZON, L. I.; PETERSON, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 1, p. 35–44, 2005.

ZOUARI-KESSENTINI, R. *et al.* Antitumoral Potential of Tunisian Snake Venoms Secreted Phospholipases A2. **BioMed Research International**, p. 1–9, 2013.

ZOUPA, M.; MACHERA, K. Zebrafish as an Alternative Vertebrate Model for Investigating Developmental Toxicity—The Triadimefon Example. **Int J Mol Sci.** v. 18, n. 4, p. 817, 2017.

ZYCHAR, B. C. *et al.* Leukocyte recruitment induced by snake venom metalloproteinases: Role of the catalytic domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2020.

**ANEXO 01****CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CAAE)**

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



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DOS EFEITOS TOXINOLÓGICOS DE PEÇONHA BRUTA DE *Bothrops jararacussu* (Lacerda, 1984) E PROTEÍNAS PLAS ISOLADAS, EM ORGANISMO MODELO NÃO CONVENCIONAL, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822).

**Pesquisador:** LAYSSA GUALBERTO DA SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 39716220.4.0000.8069

**Instituição Proponente:** UFPB - Centro de Ciências Médicas/CCM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.614.834

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, da discente Layssa Gualberto da Silva, que visa avaliar os efeitos coagulante e/ou anticoagulante de peçonhas brutas e de proteínas isoladas de peçonhas de serpente *Bothrops jararacussu*. É uma pesquisa de caráter experimental, que será realizada utilizando plasma humano citratado, coletado por profissionais biomédicos ou outros profissionais capacitados, e doado por voluntários estudantes dos cursos de graduação e pós-graduação da UFPB que não tenham feito uso de medicamento nos dez dias anteriores à coleta e estejam em jejum de no mínimo 4 horas. Serão realizados testes de Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), para verificar se a peçonha bruta e/ou as proteínas botrópica produzem atraso nos tempos desses testes, quando submetidas a diferentes condições de bancada. Todos os testes serão realizados em triplicata, sendo calculada a média e o desvio padrão, e em seguida será feita a análise estatística utilizando One-Way ANOVA seguido de comparação múltipla de Dunnet no GraphPad Software Inc. 8.0. Espera-se conhecer que a variação no tempo de TP e TTPa promovidas pela peçonha bruta e proteínas isoladas de *Bothrops jararacussu* após serem submetidas a condições em bancada, sem o banho de gelo, auxiliem a verificar quanto tempo estas moléculas podem permanecer fora de suas condições de preservação, sem alterarem suas

**Endereço:** Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1  
**Bairro:** CASTELO BRANCO **CEP:** 58 051-900  
**UF:** PB **Município:** JOÃO PESSOA  
**Telefone:** (83)3216-7308

**E-mail:** comitedestica@ccm.ufpb.br

funções.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avallar, in vivo, a peçonha bruta e fosfolipases isoladas BthTX-I, BthTX-II e BthA-I em embriões e larvas de *Danio rerio* avaliando os efeitos toxicológicos na morfologia e bioquímicos pouco explorados na toxicologia ofídica neste modelo não convencional.

**Objetivo Secundário:**

Avallar efetividade da ação da peçonha bruta e fosfolipases (BthTX-I, BthTX-II e BthA-I) de *Bothrops jararacussu* no plasma sanguíneo por TP e TTPA e comparar com as alterações em embriões e larvas no *Danio rerio*. Avallar alterações morfológicas em embriões e larvas no *Danio rerio* provenientes da ação da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e suas fosfolipases (BthTX-I, BthTX-II e BthA-I); Avallar índices de toxicidade LC50, NOAL e LOAEL em embriões e larvas no *Danio rerio* provenientes da ação da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e suas fosfolipases (BthTX-I, BthTX-II e BthA-I); Analisar alterações no perfil bioquímico através da medição de enzimas Catalase (CAT), Lactato Desidrogenase (LDH), Acetilcolinesterase (ACHE) e Glutamina S-transferase (GST) e ensaios de fluorescência em larvas no *Danio rerio* provenientes da ação da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e suas fosfolipases (BthTX-I, BthTX-II e BthA-I).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os pesquisadores apresentam um risco mínimo da pesquisa, previsível ao voluntário, visto que será realizada punção venosa periférica, e, dessa forma, o paciente pode sentir um leve desconforto e dor na coleta, risco esse que será minimizado uma vez que o procedimento vai ser realizado por profissional biomédico habilitado para tal atividade. Além disso, o procedimento de coleta obedecerá todas as normas de biossegurança em vigência. Como benefícios, esclarece-se que a pesquisa pode identificar um potencial coagulante ou anticoagulante a partir de peçonha bruta e proteínas ofídicas da serpente *Bothrops jararacussu*, além de conhecer, in vitro, a alteração das características hemostáticas promovidas pelas mesmas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa experimental, a ser realizada em laboratório, para avallar a efetividade da ação da peçonha bruta e fosfolipases (BthTX-I, BthTX-II e BthA-I) de *Bothrops jararacussu* no plasma sanguíneo por TP e TTPA e comparar com as alterações de embriões e larvas no *Danio rerio*, após a peçonha e/ou proteínas permanecerem em diferentes horas na bancada.

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

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7308

E-mail: comitedeetica@ccm.ufpb.br

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



Continuação do Parecer: 4.514.534

A pesquisadora apresenta uma terceira versão, na qual atende as pendências no indicadas por este Comitê de Ética.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram anexados os seguintes itens:

O projeto completo; o TCLE completo; a folha de rosto e a carta de anuência, devidamente assinadas.

Constam, ainda, a Carta resposta com a descrição das pendências atendidas; um termo de compromisso e responsabilidade da professora orientadora do projeto e um termo de compromisso da discente pesquisadora.

**Recomendações:**

- Manter a metodologia aprovada pelo CEP/CCM/UFPB.

- Apresentar os relatórios parcial e final, via Plataforma Brasil, no ícone notificações.

- Informar ao CEP-CCM, por meio de Emenda/Notificação a Inclusão de novos membros/equipe de pesquisa, via plataforma Brasil.

- Caso ocorram intercorrências durante ou após o desenvolvimento da pesquisa, a exemplo de alteração de título, mudança de local da pesquisa, população envolvida, entre outras, o (a) pesquisador (a) responsável deverá solicitar a este CEP, via Plataforma Brasil, aprovação de tais alterações, ou buscar devidas orientações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Considerando que a pesquisadora atendeu adequadamente às recomendações feitas por este Colegiado em parecer anterior a este, e que o estudo apresenta viabilidade ética e metodológica, estando em consonância com as diretrizes contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS, o protocolo está APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Médicas- CEP-CCM, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

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

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



Continuação do Parecer: 4.514.834

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                     | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1652056.pdf | 18/03/2021<br>12:30:24 |                           | Aceito   |
| Outros                                                    | CARTA_RESPOSTA_FINAL.pdf                      | 18/03/2021<br>12:29:20 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |
| Outros                                                    | Projeto_Comite_final_destacado.pdf            | 18/03/2021<br>12:17:20 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto_Comite_final.pdf                      | 18/03/2021<br>12:13:55 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Carta_anuencia.pdf                            | 18/03/2021<br>12:12:41 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | Folha_de_rosto100.pdf                         | 18/03/2021<br>12:09:20 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_enviar.pdf                               | 28/12/2020<br>14:32:13 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf                   | 29/10/2020<br>20:41:38 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | PESQUISADOR_PARTICIPANTE.pdf                  | 29/10/2020<br>20:41:24 | LAYSSA GUALBERTO DA SILVA | Aceito   |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900

UF: PB Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7308

E-mail: comitedeetica@com.ufpb.br

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



Continuação do Parecer: 4.614.834

JOAO PESSOA, 26 de Março de 2021

---

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

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

**ANEXO 02**  
**CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE**  
**ANIMAIS (CEUA)**



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Reitoria



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de toxicidade de produtos naturais e sintéticos bioativos em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*)", protocolada sob o CEUA nº 7605240821 (ID 001500), sob a responsabilidade de **Davi Felipe Farias e equipe; Leonardo Rogério Vieira; Maria Eduarda de Souza Maia; Juliana Alves da Costa Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 11/11/2021.

We certify that the proposal "Toxicity Assessment of natural and synthetic bioactive products in zebrafish embryos (*Danio rerio*)", utilizing 3088 Fishes (males and females), protocol number CEUA 7605240821 (ID 001500), under the responsibility of **Davi Felipe Farias and team; Leonardo Rogério Vieira; Maria Eduarda de Souza Maia; Juliana Alves da Costa Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 11/11/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2021 a 09/2024**

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UniPOM)**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 3 horas**

N: **3088**

Linhagem: **Danio rerio**

Peso: **0 a 0 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados na sala de experimentação da Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais, Depto. de Biologia Molecular, Campus I, UFPB.

João Pessoa, 26 de janeiro de 2022

Prof. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivya Carmem Talieri  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

## **APÊNDICE**

APÊNDICE A – TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR PARTICIPANTE

**TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR PARTICIPANTE**

Eu, **Layssa Gualberto da Silva**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, responsabilizo-me, junto com meu orientador, **Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Priscila Marchi Salvador** a desenvolver o projeto de pesquisa intitulado em **“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA PEÇONHA BRUTA DE *Bothrops jararacussu* SOBRE EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)”** comprometo-me ainda em assegurar que sejam cumpridos os preceitos éticos contidos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e demais documentos complementares. Responsabilizo-me, também, pelo zelo com o projeto de pesquisa no sentido de manutenção da privacidade e sigilo das informações, resguardando da segurança e bem-estar dos participantes nela recrutados, pelos resultados obtidos e posteriores divulgados no meio acadêmico e científico pela comunicação ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal da Paraíba sobre qualquer alteração no projeto e/ou ocorrência de evento adversos que impliquem no cancelamento da pesquisa, bem como pelo arquivamento durante 05 (cinco) anos, após o término da pesquisa, de uma das vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado por cada participante recrutado durante a execução da mesma.

João Pessoa – PB, 21 de outubro de 2020

---

**Layssa Gualberto da Silva**

Pesquisador Participante

## APÊNDICE B – TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

### TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, ***Daniela Priscila Marchi Salvador***, professora da Universidade Federal da Paraíba, responsabilizo-me pela orientação de ***Layssa Gualberto da Silva***, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, cujo projeto de pesquisa intitula-se “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA PEÇONHA BRUTA DE *Bothrops jararacussu* SOBRE EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**” e comprometo-me a assegurar os preceitos éticos previstos na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e demais documentos complementares. Responsabilizo-me, também, pelo zelo com o projeto de pesquisa no sentido de manutenção da privacidade e sigilo das informações, resguardando da segurança e bem-estar dos participantes nela recrutados, pelos resultados obtidos e posteriores divulgados no meio acadêmico e científico pela comunicação ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal da Paraíba sobre qualquer alteração no projeto e/ou ocorrência de evento adversos que impliquem no cancelamento da pesquisa, bem como pelo arquivamento durante 05 (cinco) anos, após o término da pesquisa, de uma das vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado por cada participante recrutado durante a execução da mesma.

João Pessoa-PB, 21 de outubro de 2020.

---

***Daniela Priscila Marchi Salvador***

Pesquisadora Responsável

## APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Meu nome é Layssa Gualberto da Silva, sou pós-graduanda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e o Sr. (a) está sendo convidado (a), como voluntário (a), a participar da pesquisa intitulada sobre **“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA PEÇONHA BRUTA DE *Bothrops jararacussu* SOBRE EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)”**.

**JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E PROCEDIMENTOS:** Diversos mecanismos farmacológicos têm sido elucidados graças a estudos envolvendo peçonhas de serpentes. Por isso, estudos dos efeitos da peçonha bruta de serpentes e do mecanismo de ação de suas proteínas isoladas permitem compreender a fisiopatologia do empeçonhamento, por conseguinte o desfecho clínico, aumentando a possibilidade de desenvolver terapias personalizadas e reduzir as sequelas decorrentes do ofidismo.

**DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:** Essa pesquisa pode oferecer risco mínimo previsível ao voluntário, visto que será realizada punção venosa periférica no membro superior (punção no braço), dessa forma o paciente pode sentir um leve desconforto e dor na coleta, risco esse que será minimizado uma vez que o procedimento vai ser realizado por profissional biomédico ou outro profissional habilitado para tal atividade. Além disso, o procedimento de coleta obedecerá a todas as normas de biossegurança. Esta pesquisa pode trazer benefícios como a identificação de um potencial anticoagulante e/ou coagulante novo originário a partir da peçonha bruta e proteínas ofídicas de serpente *Bothrops jararacussu*, além de conhecer, *in vitro*, a alteração das características hemostáticas promovidas pela peçonha e proteínas ofídicas, que permaneceram em tempos distintos em bancada.

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

**GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:** Os voluntários serão esclarecidos sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar, sendo livre para recusar-se a participar da pesquisa, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, procedimento, da pesquisa,

permanecerão confidenciais podendo ser fornecidos apenas para os voluntários. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será citado(a) nominalmente ou por qualquer outro meio que o identifique individualmente ou em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento assinada pelo voluntário ficará sob a responsabilidade do pesquisador responsável e outra será fornecida ao voluntário.

**CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:** A participação no estudo não acarretará custos para os voluntários e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional. Não é previsível dano decorrente dessa pesquisa ao voluntário e caso haja algum, será garantido indenização por parte do proponente.

**DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO PARTICIPANTE:** Eu, \_\_\_\_\_, fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci todas minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações, poderei desistir de participar da pesquisa se assim o desejar. Os pesquisadores Layssa Gualberto da Silva certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, no que se refere a minha identificação individualizada, e deverão ser tornados públicos através de algum meio. Elas se comprometem seguir os padrões éticos definidos na Resolução CNS 466/12. Também sei que em caso de dúvidas poderei contatar com o pós-graduando Layssa Gualberto da Silva, residente na cidade de João Pessoa- PB, telefone: 83-98122-3883 e e-mail: biomed.gualberto@gmail.com ou a professor orientador: Daniela Priscila Marchi Salvador, telefone 83 99916-5909 e através do e-mail: **danimarchi@dbm.ufpb.br**. Além disso, fui informado que em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo poderei consultar o Comitê de Ética do Centro de Ciências Médicas, situado Centro de Ciências da Médicas - 3º andar, Campus I - Cidade Universitária – Bairro Castelo Branco, CEP: 58.059-900 - João Pessoa-PB, telefone: (83) 3216-7308, e-mail: comitedeetica@ccm.ufpb.br. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Participante

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data