



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



DIANA PONTES DA SILVA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO PROTEICA E DOS EFEITOS
HEMOLÍTICO, OXIDANTE, ANTIOXIDANTE E COAGULANTE DAS PEÇONHAS
BRUTAS DE MACHOS E FÊMEAS DA SERPENTE *Bothrops leucurus***

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

JOÃO PESSOA- PB

2017



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



DIANA PONTES DA SILVA

**ANÁLISE COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO PROTEICA E DOS EFEITOS
HEMOLÍTICO, OXIDANTE, ANTIOXIDANTE E COAGULANTE DAS PEÇONHAS
BRUTAS DE MACHOS E FÊMEAS DA SERPENTE *Bothrops leucurus***

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^a. Dr^a. Daniela Priscila Marchi Salvador

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Hilzeth Luna Freire Pêsoa

JOÃO PESSOA- PB

2017

S586a Silva, Diana Pontes da.
Análise comparativa da composição proteica e dos efeitos hemolítico, oxidante, antioxidante e coagulante das peçonhas brutas de machos e fêmeas da serpente *Bothrops leucurus* / Diana Pontes da Silva. - João Pessoa, 2017.
89 f. : il. -

Orientadora: Daniela Priscila Marchi Salvador.
Coorientadora: Hilzeth Luna Freire Pêsoa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia Celular e Molecular. 2. Peçonha - *Bothrops leucurus*. 3. Lise eritrocitária. 4. Estresse oxidativo. 5. Hemaglutinação. 6. Coagulação plasmática. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(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



DIANA PONTES DA SILVA

Dissertação de Mestrado avaliada em 17/04/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dr.ª Daniela Priscila Marchi Salvador
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora

Prof.ª Dr.ª Hilzeth Luna Freire Pessoa
Departamento de Biologia Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Coorientadora

Prof.ª Dr.ª Márcia Regina Piuvezam
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Prof.ª Dr.ª Karla Patrícia de Oliveira Luna
Universidade Estadual da Paraíba
Examinadora Externa

“Ninguém vai bater mais forte do que a vida. Mas não se trata de bater, e sim do quanto você aguenta apanhar e continuar lutando; o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha.”

(Rocky Balboa)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua bondade infinita me deu a graça de estar cumprindo mais esta etapa da minha vida;

Aos meus pais, Francisco Antônio e Maria da Paz, sem os quais nada disso seria possível. Pelo exemplo, pelo amor incondicional e por todas as preciosas lições;

Aos meus irmãos, Fábio e Fernando, pelo apoio fundamental e pelo cuidado constante;

Aos meus sobrinhos, Laura e Fernando Filho, que em sua ingenuidade e carinho por muitas vezes me renovaram as forças ao longo desta jornada;

A Hugo Macêdo, peça fundamental do meu amadurecimento acadêmico e pessoal, pelo amor, pela leveza do que temos e pela estrada compartilhada;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Daniela Priscila Marchi Salvador, pelo acolhimento, orientação, atenção e conhecimento compartilhado;

À Prof^a. Dra^a. Hilzeth Pessoa pela colaboração e co-orientação;

À Jéssica Pessoa, Mariana Torres, Tássia Machado, Maraiza Cavalcante e Crislane Silva pela amizade e compreensão nas minhas muitas ausências;

A Sarah Ferreira, parceria constante durante essa trajetória, pelas milhares de risadas, pela amizade e por todas as discussões produtivas;

A Angélica Cardoso pela amizade, convivência e pelo compartilhamento de todas as alegrias e dissabores dessa jornada;

À minha turma de mestrado, em especial a Giulian César, Larissa Rodrigues, Francielly Negreiros, Laisa Vilar, Vanessa Cavalcanti e Aleson Pereira, pelos laços estabelecidos e momentos compartilhados;

Aos professores do PPGBCM, pelos ensinamentos e contribuições ao longo deste período;

À CAPES pelo auxílio financeiro durante o curso;

Aos demais, que embora não citados tiveram um papel fundamental ao longo desta jornada e por toda a minha vida, MUITO OBRIGADA!

Resumo

As peçonhas ofídicas são complexas misturas de componentes que atuam na perturbação de diversos mecanismos fisiológicos. A composição e atividades biológicas das peçonhas podem variar entre serpentes da mesma espécie de acordo com fatores como idade, sexo e região geográfica. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a composição proteica e atividades biológicas desencadeadas, *in vitro*, pelas peçonhas de machos e fêmeas da serpente *Bothrops leucurus*. O perfil proteico foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese unidimensional em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Os efeitos biológicos avaliados foram o estresse oxidativo, atividades antioxidante, coagulante e hemolíticas direta e indireta. A análise cromatográfica e eletroforética apresentaram semelhanças entre os perfis proteicos das peçonhas de machos e fêmeas. As peçonhas avaliadas não apresentaram efeito hemolítico (direto ou indireto) sobre eritrócitos. Foi observada uma expressiva hemaglutinação eritrocitária causada por todas as quantidades das peçonhas avaliadas. As peçonhas de machos e fêmeas de *B. leucurus* não apresentaram efeito oxidativo sobre hemoglobinas. Na presença de ambas as peçonhas estudadas, observou-se redução do efeito oxidativo sobre hemoglobinas provocado pela fenilhidrazina, sugerindo a presença de componentes antioxidantes na composição das peçonhas. A avaliação do efeito coagulante das peçonhas de *B. leucurus* foi realizada sobre o plasma humano citratado e os tempos de obtenção dos coágulos foram menores na presença da peçonha de fêmeas e, ambas as peçonhas apresentaram o tempo de formação dos coágulos inversamente proporcional às quantidades avaliadas. Contudo, tanto o perfil proteico como os efeitos hemolíticos (direto e indireto), oxidantes e antioxidantes observados nas peçonhas de machos e fêmeas de *B. leucurus* foram semelhantes. No entanto, a variação sexual obtida pela análise do efeito coagulante pode justificar as diferenças no tipo e/ou intensidade dos sintomas observados nos acidentes ofídicos.

Palavras-chave: Variação Sexual; Lise Eritrocitária; Hemaglutinação; Estresse Oxidativo; Coagulação Plasmática

Abstract

Snake venoms are complex mixtures of components that act upon the disturbance of various physiological mechanisms. The composition and biological activities of the venom may vary in snakes according to age, sex and geographic region. The present work aimed to evaluate the protein composition and biological activities triggered, in vitro, by male and female venoms of the *Bothrops leucurus* snake. The protein profile was obtained by high performance liquid chromatography (HPLC) and one-dimensional electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE). The biological effects evaluated were oxidative stress, antioxidant, coagulant and hemolytic (direct and indirect) activities. A chromatographic and electrophoretic analysis presented similarities between the protein profiles of males and females venoms. The evaluated venoms did not present hemolytic effect (direct or indirect) on erythrocytes. Significant erythrocyte haemagglutination was observed, it was caused by all the measurements of the venoms evaluated. *B. leucurus* venoms did not present oxidative effect on hemoglobin. In the presence of both venoms studied, were observed a reduction of the oxidative effect on hemoglobin caused by phenylhydrazine; suggesting the presence of antioxidant components in the composition of the venoms. The evaluation of coagulating effect of *B. leucurus* venoms were performed on citrated human plasma and clotting times were shorter in the presence of female venom and, both venoms presented clot formation time inversely proportional to the quantities evaluated. However, both protein profile and hemolytic (direct and indirect), oxidant and antioxidant effects observed in *B. leucurus* venom were similar for male and female venoms. Otherwise, the sexual variation linked to the coagulant effect may justify the differences in type and/or intensity of symptoms observed in ophidian accidents.

Keywords: Sexual Variation; Erythrocyte Lysis; Hemagglutination; Oxidative stress; Plasma Coagulation

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus célsius
µL	Microlitro
ABS	Absorbância
ACN	Acetonitrila
Ca²⁺	Cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CDR	Domínio de reconhecimento ao carboidrato
CRISPs	Proteínas secretórias ricas em cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HCl	Ácido clorídrico
IRA	Insuficiência renal aguda
kDa	Kilodáton
LAAO	L-aminoácido oxidase
LNC/SUS	Lista de notificação compulsória de agravos à saúde
M	Concentração de solução expressa em molaridade (molar)
metHb	Metahemoglobina
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
O₂	Oxigênio

OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Persulfato de amônio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PM	Padrão de peso molecular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Suspensão de eritrócitos
Sinan net	Sistema de informação de agravos de notificação
SVLs	Lectinas de venenos ofídicos
SVMPs	Metaloproteases de venenos ofídicos
SVSPs	Serinoproteases de venenos ofídicos
SVTLEs	Enzimas semelhantes à trombina de venenos ofídicos
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino
TF	Fator tecidual
TFA	Ácido trifluoroacético
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
VB	Veneno bruto
VB_BleuM	Veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> macho
VB_BleuF	Veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> fêmea
Zn²⁺	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Hemostasia secundária	17
Figura 02 - Efeitos locais desencadeados por envenenamentos com serpentes botrópicas	19
Figura 03 - Espécime adulto de <i>Bothrops leucurus</i> e sua distribuição geográfica.....	21
Figura 04 - Principais componentes dos venenos ofídicos.....	23
Figura 05 - Ação da PLA ₂	24
Figura 06 - Mecanismo de ação da LAAO.....	25
Figura 07 - Mecanismo de ação das Snake Venom Thrombin-Like Enzymes (SVTLEs).....	27
Figura 08 - Ação das metaloproteases hemorrágicas no envenenamento ofídico.....	28
Figura 09 - Cromatograma do veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> macho	38
Figura 10 - Cromatograma do veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> fêmea	38
Figura 11 - Perfil eletroforético das frações do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> macho.....	40
Figura 12 - Perfil eletroforético das frações 0-7 do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> fêmea	40
Figura 13 - Perfil eletroforético das frações 8-15 do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> fêmea.	41
Figura 14 - Hemaglutinação eritrocitária provocada pelo veneno bruto (VB) de <i>B. leucurus</i>	47
Figura 15 - Aspecto dos coágulos formados pela peçonha de <i>Bothrops leucurus</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Perfil cromatográfico comparativo das frações obtidas de VB_BleuM e VB_BleuF	39
Tabela 02 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de <i>B. leucurus</i> sobre eritrócitos A+	44
Tabela 03 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de <i>B. leucurus</i> sobre eritrócitos B+	44
Tabela 04 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de <i>B. leucurus</i> sobre eritrócitos AB+	45
Tabela 05 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de <i>B. leucurus</i> sobre eritrócitos O+	46
Tabela 06 - Porcentagem de formação de metahemoglobina provocada pelo veneno de <i>B. leucurus</i> macho e fêmea	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Avaliação da atividade antioxidante do veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> macho e fêmea.....	51
Gráfico 02: Tempo de coagulação induzido pelas peçonhas de <i>Bothrops leucurus</i> macho e fêmea.....	53
Gráfico 03 - Avaliação comparativa da atividade coagulante do veneno bruto (VB) de <i>Bothrops leucurus</i> macho e fêmea sobre plasma humano citratado.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Acidentes ofídicos - epidemiologia e fisiopatologia.....	15
1.1.1 Ação das toxinas ofídicas no sistema hemostático	16
1.1.2 Ação das toxinas ofídicas no processo inflamatório	18
1.1.3 Formação de espécies reativas de oxigênio X ofidismo.....	20
1.2 <i>Bothrops leucurus</i>.....	21
1.3 Composição do veneno	22
1.3.1 Fosfolipases A ₂	24
1.3.2 L-aminoácido-oxidases.....	25
1.3.3 Serinoproteases.....	26
1.3.4 Metaloproteases	27
1.4 Variações na composição de venenos ofídicos.....	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Eritrócitos humanos	32
3.2 Plasma humano citratado	32
3.3 Peçonhas brutas da serpente <i>Bothrops leucurus</i>	32
3.4 Aspectos éticos	33
3.5 Determinação do perfil proteico.....	33
3.5.1 Cromatografia líquida de fase reversa	33
3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	34
3.6 Investigação das atividades biológicas.....	34
3.6.1 Atividade hemolítica direta e indireta sobre eritrócitos humanos	34
3.6.2 Atividade oxidante.....	36
3.6.3 Atividade antioxidante.....	36
3.6.4 Atividade coagulante	37
3.7 Análises estatísticas	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Caracterização proteica - Cromatografia líquida de fase reversa e eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	38

4.2 Atividade hemolítica direta e indireta	43
4.3 Atividade oxidante.....	49
4.4 Atividade antioxidante	50
4.5 Atividade coagulante	52
5 CONCLUSÃO.....	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acidentes ofídicos - epidemiologia e fisiopatologia

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais, considerando o alto índice de ocorrências e a morbidade/mortalidade que ocasionam. Em 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu o ofidismo na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). A estimativa da OMS é que ocorram 1.841.000 casos de envenenamento anualmente, culminando em 94.000 óbitos (WHO, 2017).

No Brasil, em 2015, foram registrados 24.467 acidentes ofídicos, com 107 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). O ofidismo foi incluso na Lista de Notificação Compulsória de Agravos à Saúde (LNC/SUS), publicada na portaria nº 2.472 de 31 de agosto de 2010, devido ao alto número de ocorrências. A notificação de acidentes ofídicos em bancos nacionais de dados de saúde otimiza o planejamento e a adoção de medidas de controle necessárias aos agravos mais recorrentes (SOUZA, 2010).

A maior biodiversidade de serpentes é encontrada nas regiões tropicais. Atualmente, o Brasil possui 403 espécies de serpentes descritas, das quais 64 são consideradas peçonhentas e estão distribuídas entre as famílias Viperidae e Elapidae (BERNARDE, 2011; COSTA; BÉRNILS, 2014; THE REPTILE DATABASE, 2017). No Brasil, a família Viperidae tem por representantes os gêneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus* e a família Elapidae está representada por 34 espécies classificadas em um único gênero, *Micrurus*, presente em todo território nacional (THE REPTILE DATABASE, 2017).

A epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil indica que o número de ocorrências não tem se alterado significativamente, ao longo dos últimos 100 anos (BOCHNER; STRUCHINER, 2002; CHIPPAUX, 2015). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan Net), em 2015, 72% dos acidentes notificados foram provocados por serpentes do gênero *Bothrops*. A região Norte foi a que apresentou maior notificação de casos (6.390 ocorrências), seguida pela região Nordeste (4.887 ocorrências) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Os demais acidentes ofídicos considerados clinicamente importantes são provocados por serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (SGRIGNOLLI *et al.*, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Lira-da-Silva e colaboradores (2009) apontaram que os valores obtidos pelos sistemas nacionais de notificação em saúde tais como o Sinan Net estão aquém da realidade epidemiológica do ofidismo brasileiro devido à inadequação na coleta de dados e à

subnotificação de casos. As zonas rurais são as regiões com maior incidência de casos e esses estão relacionados às atividades laborais. Indivíduos do sexo masculino, com faixa etária entre 15 e 49 anos são os mais acometidos, geralmente nos membros inferiores (BOCHNER; STRUCHINER 2002).

Atualmente, o tratamento mais utilizado no combate aos efeitos causados por acidentes ofídicos é a aplicação de soro antiofídico (GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011). A Farmacopeia Brasileira dispõe de soros antiofídicos de seis tipos: soro antibotrópico pentavalente; soro antibotrópico pentavalente e crotálico; soro antibotrópico pentavalente e laquétrico; soro antibotrópico pentavalente anticrotálico e antilaquétrico; soro anticrotálico e soro antielapídico bivalente (ANVISA, 2010).

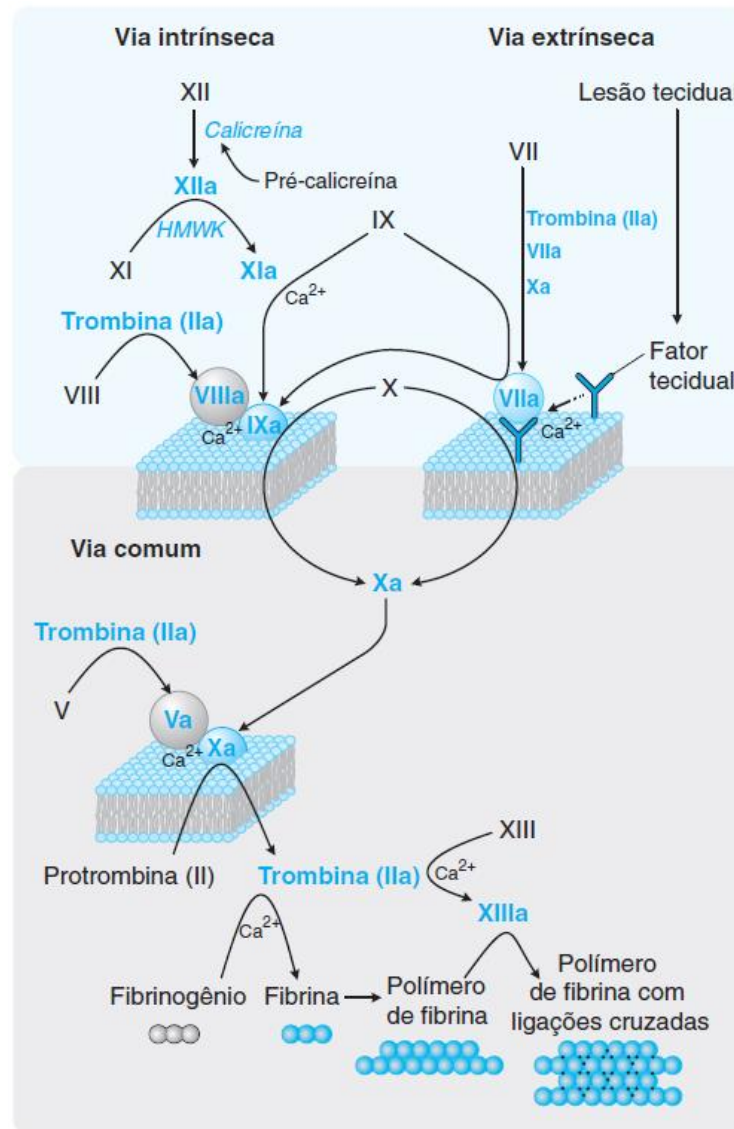
A soroterapia antiveneno tem algumas limitações relacionadas à logística de distribuição e à efetiva neutralização das toxinas. Ainda, a produção é feita por somente quatro laboratórios oficiais (Instituto Butantan – IB, São Paulo (SP), Instituto Vital Brazil – IVB, Niterói, Rio de Janeiro (RJ), Fundação Ezequiel Dias – FUNED, Minas Gerais (MG) e Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos – CPPI, Curitiba, PR).

O ofidismo botrópico provoca alterações fisiopatológicas locais e sistêmicas. Com relação às alterações locais, observa-se a formação de edema, mionecrose e hemorragia, que geralmente evolui para um dano tecidual grave com sequelas permanentes na vítima (LOMONTE e GUTIÉRREZ, 1989; BRASIL, 2001; GUTIÉRREZ, 2002). Os efeitos sistêmicos incluem alterações cardiovasculares, renais e distúrbios da coagulação. A complicação sistêmica mais descrita é a insuficiência renal aguda (IRA), a qual pode ser provocada por hipotensão arterial e pela coagulação intravascular disseminada (BRASIL, 2001; BONAVITA *et al.*, 2006).

1.1.1 Ação das toxinas ofídicas no sistema hemostático

A coagulação sanguínea é uma sucessão de mecanismos combinados para minimizar o extravasamento de sangue após uma injúria capilar. A lesão capilar expõe as fibras de colágeno subendoteliais, desencadeando a adesão e ativação das plaquetas. Ainda, ocorre a liberação do fator tecidual (FT) o qual ativa a cascata de coagulação (LORENZI, 2006).

A cascata de coagulação ou hemostasia secundária descreve alterações nas proteínas plasmáticas envolvidas na formação de um coágulo de fibrina. Essas proteínas são denominadas fatores de coagulação e circulam no sangue em sua forma inativa. A cascata de coagulação é dividida nas vias intrínseca e extrínseca, as quais convergem na via comum (ARMSTRONG; GOLAN, 2014) (Figura 01).

Figura 01- Hemostasia secundária

Indicação das vias intrínseca, extrínseca e comum e os fatores de coagulação que atuam na cascata.
Fonte: Armstrong e Golan (2014).

A convergência das vias intrínseca e extrínseca culmina na ativação do fator X e no início da via comum. O fator IIa ativa o fator V. Na presença de Ca²⁺, o fator Va complexa com o Fator Xa a cliva a protrombina em trombina (ARMSTRONG; GOLAN, 2014).

O fibrinogênio é uma glicoproteína constituída de três pares de cadeias polipeptídicas denominadas A α , B β e γ . A trombina, na presença de Ca²⁺, cliva as cadeias A α e B β do fibrinogênio, gerando monômeros de fibrina que se polimerizam e formam um coágulo primário. Essa polimerização é mediada pela trombina junto com o Ca²⁺, que ativam o fator XIII em XIIIa, o qual atua na formação de ligações cruzadas entre os polímeros de fibrina, formando um coágulo estável (FRANCO, 2001; ARMSTRONG; GOLAN, 2014).

Deficiências na via extrínseca são avaliadas pela análise do tempo de protrombina (TP), enquanto que desordens da via intrínseca são avaliadas por alterações no tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) (SMITH, 2009).

Algumas serinoproteases ofídicas denominadas SVTLEs - *Snake Venom Thrombin-like Enzymes* mimetizam a ação da trombina e são classificadas de acordo com a cadeia em que atuam em SVTLE-A, SVTLE-B e SVTLE-AB (MARKLAND, 1998). Além das SVTLEs, já foram descritas outras toxinas da classe das serinoproteases e das metaloproteases que atuam na ativação de diversos fatores de coagulação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; SERRANO; MAROUN, 2005).

Proteases ofídicas podem apresentar ação fibrinogenolítica ou ativar fatores de coagulação gerando distúrbios hemostáticos. Essas alterações podem induzir a formação de fibrina intravascular ou provocar o consumo do estoque de fibrinogênio produzindo um quadro de incoagulabilidade sanguínea, dano vascular e hemorragia (HUTTON; WARREL, 1993; MARKLAND, 1998; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; SERRANO; MAROUN, 2005; GABRIEL *et al.*, 2012).

1.1.2 Ação das toxinas ofídicas no processo inflamatório

A inflamação é um conjunto de respostas complexas do tecido conjuntivo vascularizado frente a uma injúria. Essas respostas incluem eventos vasculares, celulares e linfáticos que são desencadeados para eliminar o agente agressor e restabelecer a função tecidual. O processo inflamatório pode desencadear a formação de edema, vermelhidão, dor, e, em casos extremos, perda de função tecidual e necrose (ALBELDA, BUCK, 1990).

Os eventos vasculares envolvidos na resposta inflamatória incluem a contração do endotélio do vaso sanguíneo e a abertura das junções intercelulares. Com essa abertura, ocorre o aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento de proteínas plasmáticas em direção ao tecido intersticial. Simultaneamente à abertura das junções intercelulares, o fluxo sanguíneo é reduzido e ocorre o deslocamento das células sanguíneas do centro para a periferia do vaso, possibilitando a adesão dos leucócitos com as células endoteliais (ALBELDA; BUCK, 1990; SPRINGER, 1995; RANKIN, 2004). Após a adesão, os leucócitos migram para o espaço extravascular, em direção ao foco da lesão, onde será iniciado o processo de fagocitose do agente agressor (SPRINGER, 1995).

O processo inflamatório é decorrente da ação de substâncias endógenas (mediadores químicos) liberadas após o estímulo lesivo. Dentre os mediadores conhecidos, encontram-se

citocinas, cininas, eicosanoides, aminas, fator ativador de plaquetas, radicais livres e metabólitos do ácido araquidônico (SPRINGER, 1995; RANKIN, 2004).

A resposta inflamatória desencadeada pelo envenenamento botrópico é, geralmente, associada à ação das metaloproteases e fosfolipases A₂ (FOX; SERRANO, 2005; 2009; MARKLAND; SWENSON, 2013). Essas enzimas estão envolvidas no aumento da permeabilidade vascular e na liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, as cininas e o ácido araquidônico. A rápida modulação exercida sobre esses mediadores diminui a efetividade do soro antiofídico na neutralização das toxinas, pois o soro não é capaz de atenuar o dano tecidual já estabelecido (FOX; SERRANO, 2005, 2009).

No local da picada ocorrem sintomas como vermelhidão, dor, hemorragia local e formação de um edema pronunciado. Essas manifestações podem provocar isquemia e compressão neural, levando à perda tecidual e amputação do membro acometido (Figura 02) (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Figura 02 - Efeitos locais desencadeados por envenenamentos com serpentes botrópicas



Lesão inflamatória bolhosa (A); Edema pronunciado (B); Necrose de membro inferior (C). **Fonte:** <http://www.cobrasbrasil.com/index.html>

1.1.3 Formação de espécies reativas de oxigênio X ofidismo

As espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*), são definidas como elementos químicos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo, o que aumenta a sua reatividade química. Sua formação é decorrente de reações de óxido-redução, na qual pode haver a doação ou o recebimento do(s) elétron(s) isolado(s) (GUTTERIDGE; HALLWELL, 2000).

Nos sistemas biológicos ocorre a formação continuada de pequenas quantidades de ROS pela redução parcial do oxigênio molecular. Essa reação gera subprodutos como o peróxido de hidrogênio, radicais superóxido, hidroxil e peroxil (ÇIMEN, 2008). As ROS estão envolvidas em diversos processos celulares, tais como a fagocitose, sinalização celular e síntese proteica. Entretanto, quando há um excesso de produção de radicais livres, esses podem reagir de forma indiscriminada com outras moléculas biológicas, desencadeando efeitos prejudiciais como a agressão aos tecidos, membranas, enzimas, carboidratos e DNA. Assim, as ROS estão relacionadas a diversas doenças e podem ser a causa ou o fator agravante do quadro patológico já estabelecido no indivíduo (FINKEL; HOLBROOK, 2000; ÇIMEN, 2008).

O eritrócito é uma célula particularmente suscetível ao dano oxidativo desencadeado pelas ROS. Essa suscetibilidade deve-se a fatores como a maior concentração de lipídeos insaturados na membrana, altas taxas de oxigênio e a presença de hemoglobina (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000; ÇIMEN, 2008).

A hemoglobina é uma proteína carreadora de oxigênio e, durante o transporte, esse íon se liga ao Fe^{2+} (do grupo heme da hemoglobina). Quando o Fe^{2+} é oxidado à Fe^{3+} a hemoglobina é convertida em metahemoglobina. Nesta condição, a hemoglobina perde a sua capacidade de transportar oxigênio (ÇIMEN, 2008). Em eritrócitos normais, a taxa de metahemoglobina é mantida abaixo de 1% pela ação de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático inclui as proteínas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e o não enzimático engloba compostos como a glutathione, β - caroteno e vitaminas C e E (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

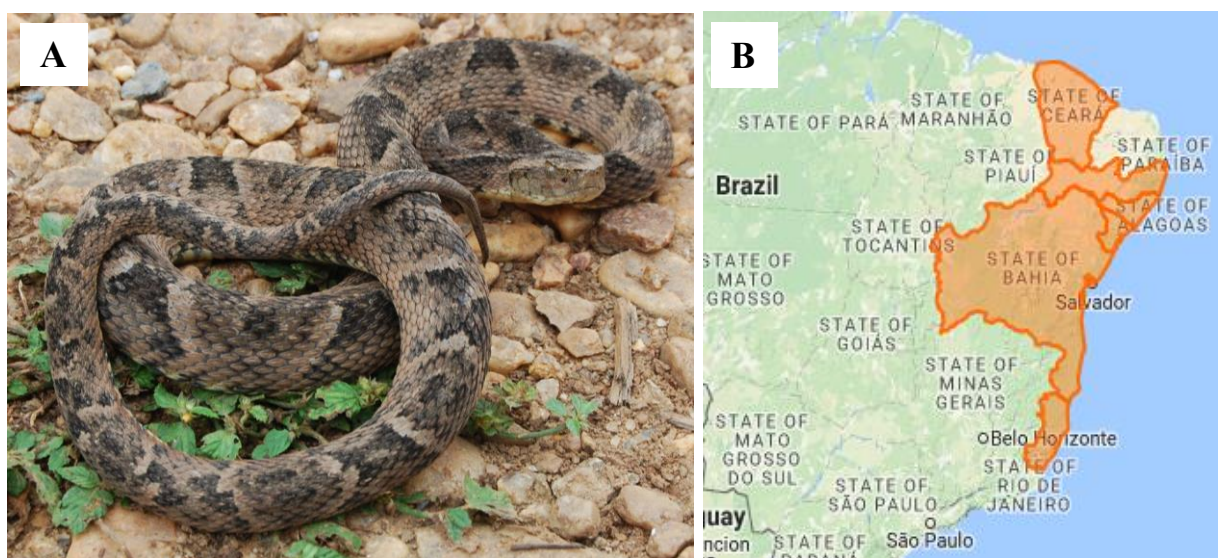
Taxas elevadas de metahemoglobina circulante em vítimas de acidentes ofídicos já foram descritas e associadas ao aumento da formação de ROS (SHARMA *et al.*, 2015). Os componentes da peçonha envolvidos nesse efeito ainda não foram descritos, porém, Rodrigues e colaboradores (2009) descreveram que proteínas ofídicas do tipo L-aminoácido-oxidase atuam na formação de radicais livres. Os mecanismos moleculares de toxinas ofídicas responsáveis pela formação de metahemoglobina ainda não foram descritos. A profusão dos

sintomas clínicos observados nos indivíduos acometidos pelo ofidismo pode variar de acordo com o tamanho e idade do animal, quantidade de veneno inoculado e estado de saúde da vítima (BRASIL, 2001).

1.2 *Bothrops leucurus*

A serpente *Bothrops leucurus*, conhecida popularmente como jararaca-do-rabo-branco (Figura 03a), pertence à família Viperidae, subfamília Crotalinae. Essa espécie pode ser encontrada desde o norte da Região Sudeste até o Nordeste brasileiro, estendendo-se para o sul do Ceará e por toda a Bahia (Figura 03b). Apresenta médio porte (250-1840mm), é terrícola e exibe variações morfológicas relacionadas à idade, sexo e localização geográfica (LIRA-DASILVA, 2009).

Figura 03 - Espécime adulto de *Bothrops leucurus* e sua distribuição geográfica.



(A) Espécime encontrado em Jenipapo de Minas, MG. Imagem gentilmente cedida por Guilherme Santoro. (B) Em laranja estão destacados os estados brasileiros nos quais essa serpente pode ser encontrada. **Fonte:** The Reptile Database (2017).

A espécie foi descrita, inicialmente, em 1824 por Wagler, porém, a variação no padrão de coloração levantou questionamentos acerca da sua real classificação. Wucherer (1863) examinou 40 indivíduos desta espécie na Bahia e os identificou como *Craspedocephalus Atrox*. Entretanto, anos mais tarde, foi confirmada a legitimidade da espécie *Bothrops leucurus* (SALOMÃO, 1997; WUSTER, 1999).

Lira-da-Silva (2009) salientou que a variação na coloração ontogenética (relacionada ao estágio de desenvolvimento do indivíduo) está relacionada às diferenças de hábitos alimentares

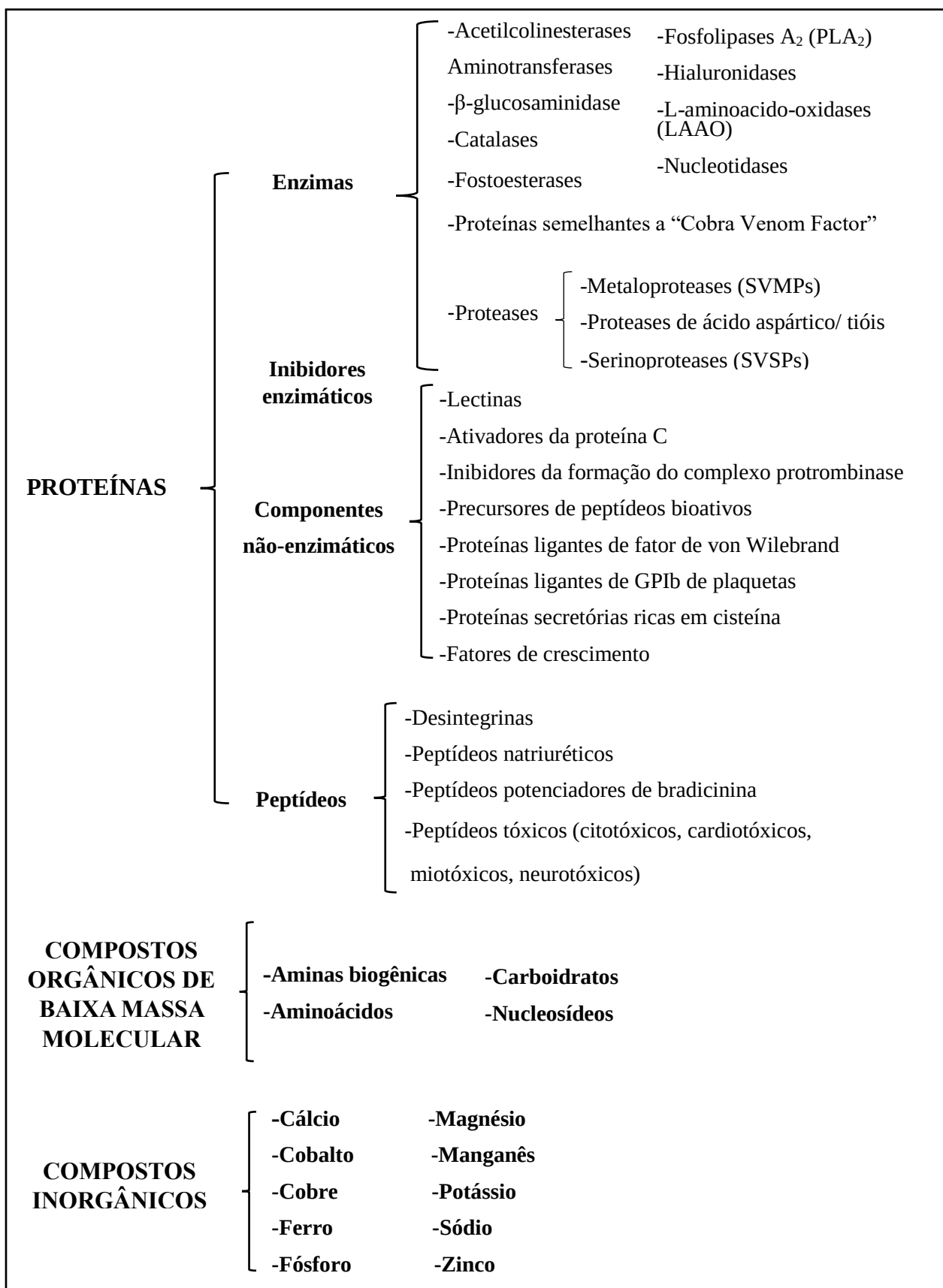
entre jovens e adultos. Adicionalmente, a autora destacou que essa variação pode estar associada à evolução de um mecanismo de camuflagem específico ao substrato de cada região.

Sanchez *et al.* (1992) descreveram que a peçonha total de *B. leucurus* desencadeia os efeitos coagulante, hemorrágico, edematogênico e necrosante. Ainda, diversos estudos, *in vitro*, descreveram as ações nefrotóxica (MORAIS *et al.*, 2013), fibrinogenolítica, proteolítica (LIRA-DA-SILVA, 2009), neuromuscular e miotóxica (PRIANTI JR *et al.*, 2003) causadas pela peçonha bruta. A espécie *B. leucurus* é uma das principais responsáveis pelos acidentes ofídicos na região Nordeste (LIRA-DA-SILVA, 2009), no entanto, a sua peçonha não faz parte do *pool* utilizado para a fabricação do soro antiofídico distribuído nacionalmente.

1.3 Composição do veneno

A peçonha ofídica é uma mistura complexa de componentes proteicos e não proteicos. A porção proteica é a mais importante do ponto de vista biológico, constituindo aproximadamente 95% do seu peso seco (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998). A porção não proteica abrange íons e outras substâncias como lipídios, carboidratos e aminas biogênicas (Figura 04), que podem atuar como mediadores da dor desencadeada no envenenamento (FERREIRA *et al.*, 1992). Esses componentes interferem, de forma rápida e seletiva, em mecanismos fisiológicos específicos, com a finalidade de imobilizar a presa e, assim, capturá-la (MEBS, 1970; CALVETE *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2011).

Dentre as enzimas encontradas na peçonha ofídica, as mais conhecidas e estudadas são as proteínas da classe das fosfolipases A₂ (PLA₂), assim como a L-aminoácido-oxidase (LAO), serinoproteases e metaloproteases. Hialuronidases e nucleotidases também são encontradas. (KANG *et al.*, 2011). As proteínas não enzimáticas compreendem desintegrinas, proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISPs), lectinas tipo-C, dentre outros (Figura 04).

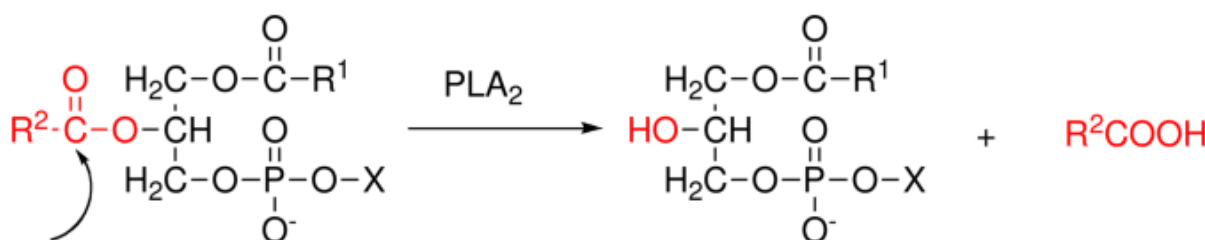
Figura 04 - Principais componentes dos venenos ofídicos

Fonte: Adaptação de Ramos; Selistre-de-Araújo (2006)

1.3.1 Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas em microrganismos, tecidos de mamíferos e toxinas de répteis e artrópodes (ARNI; WARD, 1996). As PLA₂s catalisam a hidrólise de fosfolipídios de membranas biológicas na ligação 2-acil éster, em uma reação dependente de cálcio (Figura 05). Essa reação resulta na liberação de ácido araquidônico, o qual atua na síntese de mediadores inflamatórios como prostaciclina, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (ARNI; WARD, 1996; ZULIANI *et al.*, 2005; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DE MARIA *et al.*, 2007).

Figura 05 - Ação da PLA₂



Hidrólise de fosfolipídios de membranas na ligação 2-acil-éster pela ação das PLA₂s com a liberação de ácidos graxos. X = grupo polar da cabeça do fosfolipídio; R¹ e R²= radicais de ácidos graxos da molécula. **Fonte:** Dennis *et al.* (2011).

Gutiérrez e Lomonte (2013) correlacionaram as PLA₂s com os efeitos inflamatórios desencadeados pelos acidentes botrópicos, causando uma reação caracterizada pelo aumento da permeabilidade microvascular. O extravasamento sanguíneo induz a formação de edema, provoca dor e pode culminar em necrose tecidual. Além de causar miotoxicidade, essas enzimas apresentam outras atividades biológicas incluindo cardiotoxicidade, neurotoxicidade e ativação/inibição da agregação plaquetária, que podem ou não estar atreladas à sua atividade catalítica (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989).

Quanto à sua caracterização, as PLA₂s são enzimas com baixa massa molecular (13 a 18 kDa), apresentam alto número de pontes dissulfeto e possuem atividade catalítica dependente de cálcio. O ácido aspártico presente na posição 49 atua na coordenação do íon cálcio, desempenhando um papel importante na atividade catalítica da PLA₂ (ARNI; WARD, 1996).

Diversas PLA₂ presentes em toxinas ofídicas foram isoladas, caracterizadas (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008; VARGAS *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2014), e tiveram suas estruturas resolvidas (LEE *et al.*, 2001; MAGRO *et al.*, 2003; MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2005;

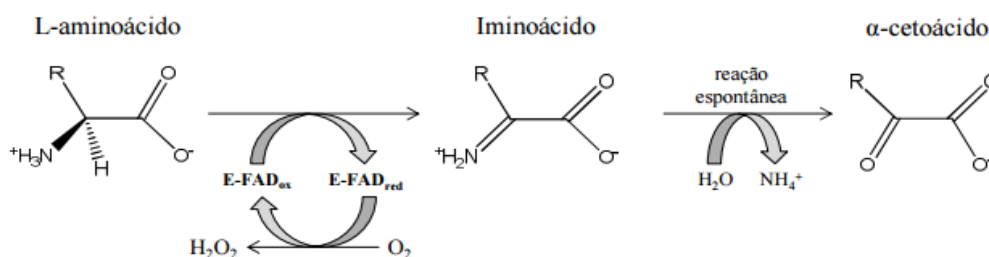
CORRÊA *et al.*, 2016), em sua forma nativa ou complexada com ligantes (MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2006; BORGES *et al.*, 2017). Calvete e colaboradores (2007) destacaram que as PLA₂s constituem cerca de 30 a 60% do veneno ofídico e, com maior quantidade de PLA₂ básicas na maioria das serpentes botrópicas.

Nunes *et al.* (2011) isolaram e caracterizaram os primeiros 60 resíduos de aminoácidos de uma Asp49-PLA₂ ácida da peçonha de *Bothrops leucurus*, denominada Bl-PLA₂. Esses autores descreveram que a Bl-PLA₂ não apresentou miotoxicidade, mas foi capaz de induzir edema e secreção de algumas citocinas pró-inflamatórias. Higuchi *et al.* (2007) purificaram e caracterizaram duas PLA₂s básicas de *B. leucurus*, uma contendo lisina na posição 49 (*blK*-PLA₂) e outra contendo um ácido aspártico na mesma posição (*blD*-PLA₂). A *blK*-PLA₂ apresentou níveis insignificantes de atividade de PLA₂ e a *blD*-PLA₂ não exerceu efeito sobre a agregação plaquetária, no entanto inibiu fortemente a coagulação. Marangoni *et al* (2013) isolaram outra Asp49-PLA₂ básica da peçonha *B. leucurus* denominada Bleu-TXIII a qual apresentou ação inflamatória e edematogênica

1.3.2 L-aminoácido-oxidases

As L-aminoácido-oxidases (LAAOs) são encontrada em plantas, insetos, fungos, bactérias e na peçonha de serpentes (TAN; FUNG, 2008). As LAAOs ofídicas são proteínas diméricas de massa molecular variando entre 60 e 150 kDa, que tem como cofatores o FAD (flavina-adenina dinucleotídeo) ou o FMN (flavina mononucleotídeo). Essas enzimas catalisam a oxidação de L-aminoácidos, produzindo um intermediário iminoácido através da redução do cofator flavina. Esse iminoácido intermediário sofre uma hidrólise não enzimática e produz α -cetoácidos e amônia. Durante a reoxidação do cofator FAD é produzido peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir do oxigênio (Figura 06) (POLLEGIONI *et al.*, 2013; IZIDORO *et al.*, 2014).

Figura 06 - Mecanismo de ação da LAAO



No metabolismo de catálise química da LAAO, a oxidação dos L-aminoácidos produz α -cetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia. **Fonte:** Wiesel (2016).

O mecanismo de ação da LAAO na toxicidade da peçonha ofídica ainda é desconhecido, entretanto, especula-se que o peróxido de hidrogênio resultante da sua reação oxidativa esteja relacionado à esta toxicidade (TAN; FUNG, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009). Nesse contexto, Izidoro *et al.* (2006) e Stábeli *et al.* (2007) descreveram que o efeito apoptótico causado por LAAOs purificadas de serpentes do gênero *Bothrops* foi inibido após a adição da catalase, evidenciando o envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de ação dessas enzimas.

Além da indução da apoptose, já foram descritas outras atividades como citotoxicidade, ativação ou inibição da agregação plaquetária (RODRIGUES *et al.*, 2009) e efeitos antiparasitário, antibacteriano e antiviral (IZIDORO *et al.*, 2014). Em 2011, Nauman e colaboradores isolaram uma LAAO da peçonha de *Bothrops leucurus* e descreveram o efeito de inibição da agregação plaquetária e a pronunciada citotoxicidade causados por essa enzima.

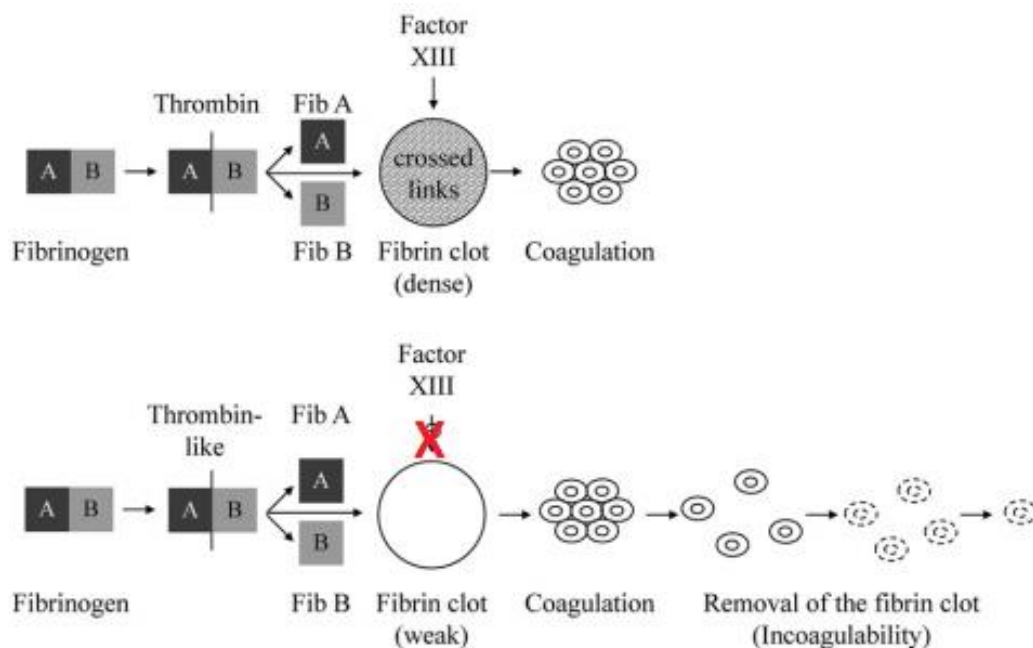
1.3.3 Serinoproteases

As serinoproteases (*snake venom serine proteases* - SVSPs) são proteínas abundantes em peçonhas ofídicas da família Viperidae, podendo representar até 20% do conteúdo total de proteínas (BLOW, 1997; KANG *et al.*, 2011). São enzimas proteolíticas semelhantes à tripsina, atuando em regiões ricas em arginina ou lisina (SERRANO; MAROUN, 2005). As SVSPs são dependentes dos cofatores Ca^{2+} , Zn^{2+} e fosfolipídios, apresenta massa molecular entre 26 e 67 kDa, e um resíduo de serina em seu sítio ativo (BLOW, 1997; DOLEY; KINI, 2009).

As SVSPs estão relacionadas às desordens hemostáticas decorrentes do ofidismo, interferindo na coagulação através da ativação, inibição ou proteólise dos fatores de coagulação (SERRANO; MAROUN, 2005; ZAQUEO *et al.*, 2014). Ainda, Cardoso e colaboradores (2010) apontaram que alguns tipos de SVSPs provocam a liberação de cininas envolvidas na resposta inflamatória.

As serinoproteases de peçonhas ofídicas mais estudadas são as *snake venom thrombin-like enzymes* (SVTLEs). As SVTLEs apresentam ação fibrinogenolítica sobre uma das cadeias do fibrinogênio formando uma forma frouxa (ou solúvel) de fibrina (HUTTON; WARREL, 1993). Ainda, essas enzimas induzem a formação de coágulos instáveis, por não serem capazes de ativar o fator XIII da coagulação, responsável pelas ligações cruzadas entre os polímeros de fibrina (Figura 07) (HUTTON; WARREL, 1993; COSTA *et al.*, 2010). Magalhães e colaboradores (2007) e Wilson (2013) purificaram uma mesma trombina-like da peçonha de *Bothrops leucurus* (leucurobina) e a descreveram sua ação fibrinogenolítica.

Figura 07 - Mecanismo de ação das *Snake Venom Thrombin-Like Enzymes* (SVTLEs)



As SVTLEs são enzimas semelhantes à trombina. A ação fibrinogenolítica das SVTLEs e a não ativação do fator XIII promovem a formação de um coágulo frágil e suscetível à degradação. **Fonte:** Adaptado de Costa *et al.* (2010).

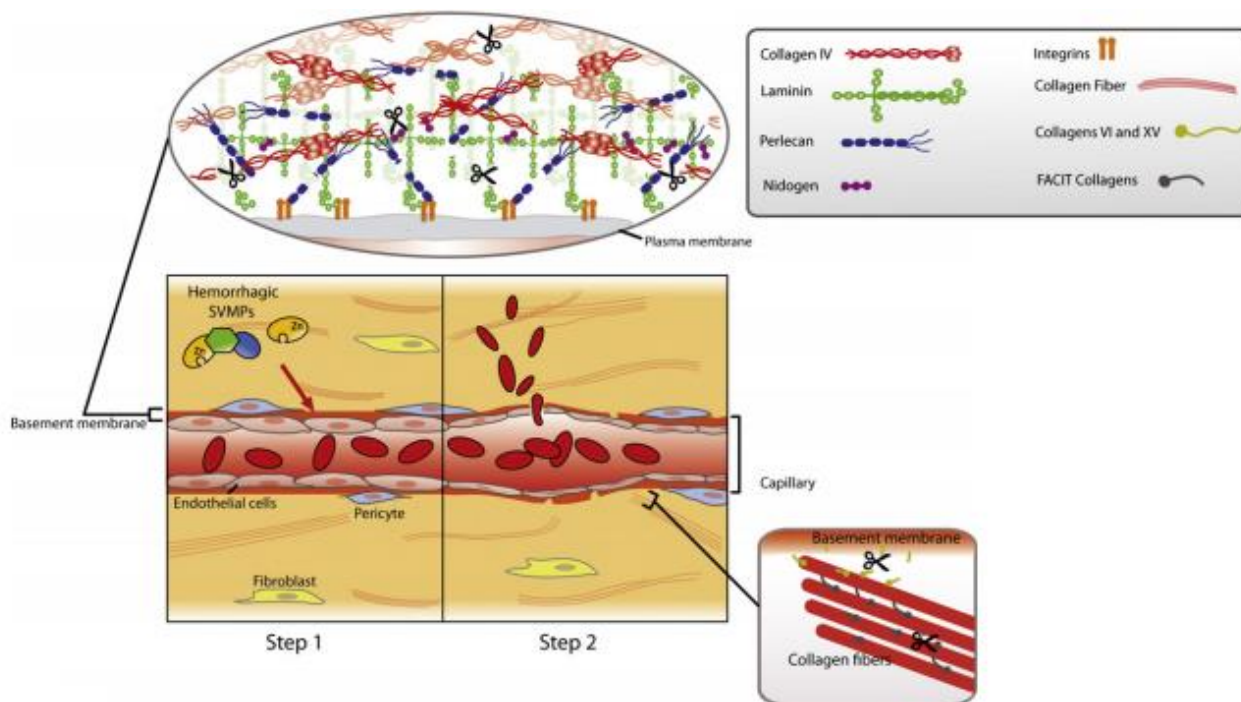
Magalhães e colaboradores (2007) purificaram e caracterizaram uma serinoprotease presente na peçonha de *Bothrops leucurus*, com atividade fibrinogenolítica, característica que também foi observada na mesma enzima por Wilson (2013). A atividade das SVSPs sobre o sistema hemostático tem provocado o aumento do interesse nestas enzimas, considerando a aplicabilidade da sua propriedade desfibrinante no tratamento de pacientes acometidos por infarto, trombose, doença vascular periférica e isquemia aguda (KOH; ARMUNGAN; JEYASEELAN, 2006). Além disso, algumas SVSPs já foram usadas para a preparação do selante de fibrina, um adesivo cirúrgico altamente efetivo (BARROS, 2009).

1.3.4 Metaloproteases

As peçonhas ofídicas contêm, em sua composição, aproximadamente 30% de metaloproteases (SVMPs), as quais desempenham um papel central no envenenamento. As SVMPs são proteínas com massa molecular entre 20 a 100 kDa e, atualmente, são classificadas em três grupos (grupos P-I, P-II e P-III) de acordo com a organização de seu domínio catalítico (KANG *et al.*, 2011; MARKLAND; SWENSON, 2013). As SVMPs são toxinas responsáveis pela formação de edema, hemorragia sistêmica e local, inflamação e necrose (FOX; SERRANO, 2005; 2009).

A hemorragia induzida pelas SVMPs hemorrágicas é decorrente da hidrólise específica de componentes da lâmina basal dos capilares sanguíneos resultando no desarranjo estrutural e ruptura capilar (Figura 08) (BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; MARKLAND; SWENSON, 2013).

Figura 08 - Ação das metaloproteases hemorrágicas no envenenamento ofídico



SVMPs: Metaloproteases de venenos ofídicos, que atuam na lâmina basal dos capilares sanguíneos (Step 1). Desestabilização da lâmina basal através da clivagem de seus componentes, resultando na ruptura capilar (Step 2). **Fonte:** Adaptado de Escalante *et al.* (2011).

Entretanto, algumas SVMPs não possuem atividade hemorrágica, mas perturbam a homeostase através de efeitos procoagulantes ou anticoagulantes, pró-inflamatórios e de inibição da agregação plaquetária (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Há um crescente interesse em estudar as SVMPs devido sua interação com o sistema hemostático.

Diversos feitos biológicos desencadeados pelas SVMPs já foram descritos e permitiram inferir a sua importante participação no envenenamento e o seu potencial biotecnológico (PAES LEME *et al.*, 2012; OYAMA; TAKAHASHI; YSHII, 2015; BONILLA-PORRAS *et al.*, 2016). A Leucurolisina-B, uma SVMP purificada da peçonha de *Bothrops leucurus* apresentou, além de atividade hemorrágica, um elevado potencial citotóxico (SANCHEZ *et al.*, 2007; GABRIEL *et al.*, 2012). Outras duas metaloproteases também isoladas da peçonha de *B. leucurus*, a Leucurolisina-A e a BleucMP foram caracterizadas como enzimas fibrinogenolíticas (GREMSKI *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2011).

1.4 Variações na composição de venenos ofídicos

A heterogeneidade na composição do veneno pode estar relacionada a fatores como gênero, idade, sazonalidade, dieta e potencial de deriva genética. Diversos autores têm se dedicado a descrever a variabilidade na composição da peçonha e correlacioná-la às diferentes atividades biológicas desencadeadas pelo ofidismo (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE 1991; SANCHEZ *et al.*, 1992; COGO *et al.*, 1993; DALTRY WUSTER; THORPE; 1996; CALVETE *et al.*, 2009).

Cogo e colaboradores (1993) observaram que a peçonha de *Bothrops insularis*, uma serpente endêmica da Ilha da Queimada Grande/SP, apresenta maior letalidade sobre pássaros em relação a mamíferos. Ainda, determinadas espécies de serpentes marinhas possuem, na composição de suas peçonhas, toxinas pós-sinápticas, fundamentais para a captura de presas rápidas (LI; FRY; KINI, 2005).

A região geográfica em que a serpente se encontra também é um fator correlacionado à variação intraespecífica da peçonha. Núñez e colaboradores (2009) observaram um maior número de metaloproteases na composição da peçonha de *Bothrops atrox* brasileiras e peruanas, enquanto que nos espécimes colombianos há maior quantidade de PLA₂s. Peçonhas de espécies norte-americanas do gênero *Crotalus* apresentam ampla variação na quantidade de metaloproteases, fosfolipases e lectinas, dependendo da região de seu habitat (SUNAGAR *et al.*, 2014). Contudo, estas variações podem ser consideradas uma adaptação apropriada às presas locais (DALTRY; WUSTER; THORPE, 1996; MORAIS; BARAIBAR; CARREIRA, 2006).

Variações ontogenéticas foram observadas nas peçonhas de *Bothrops jararaca* e de *B. moojeni* e foi descrito que indivíduos jovens apresentavam maior atividade pró-coagulante (FURTADO, 1991). Recentemente, Wray e colaboradores (2015) apontaram diferenças ontogenéticas expressivas no perfil cromatográfico de três ninhadas de serpentes recém-nascidas do gênero *Crotalus*, com 12 dias de diferença entre o nascimento de cada ninhada. A variação ontogenética entre peçonhas também foi observada em serpentes do gênero *Bothrops* e constatou-se a presença de miotoxinas apenas em adultos (CHAVES; GUTIÉRREZ; BRENES, 1992) enquanto que houve maior presença de LAAOs e hialuronidase em jovens (ANTUNES *et al.*, 2010). Complementarmente, Saldarriaga *et al.* (2003) e Zelanis *et al.* (2010) descreveram que as peçonhas dos indivíduos jovens de *Bothrops* desencadeavam maior atividade hemorrágica, edematogênica e coagulante observadas na peçonha destes indivíduos.

A influência das variações sazonais na composição das peçonhas ofídicas ainda é pouco estudada, apesar de haver pesquisas descrevendo diferenças sazonais no perfil eletroforético e na letalidade do veneno de serpentes do gênero *Vipera* (DETRAIT; DUGUY, 1966; GUBENSEK *et al.*, 1974).

As diferenças na composição de toxinas ofídicas relacionadas à variação sexual é uma vertente pouco estudada. Furtado e colaboradores (2006) observaram que as fêmeas de *Bothrops jararacussu* produzem maior quantidade de peçonha, com pronunciada atividade hemorrágica. Ainda, Furtado *et al.* (2006) descreveram que a peçonha dos machos apresenta maior atividade miotóxica e fosfolipásica. Menezes e colaboradores (2006) detectaram que na peçonha da fêmea de *B. jararacussu* há uma quantidade maior de metaloproteases, que podem estar associadas à acentuada ação hemorrágica e à maior letalidade (SAAD, 2011). Estudos realizados por Pimenta *et al.* (2007) descreveram expressivas diferenças peptidômicas entre as peçonhas de macho e fêmea de *B. jararacussu*.

Como anteriormente descrito, a composição de peçonhas ofídicas pode variar devido à filogenia, distribuição geográfica, idade, dieta, sazonalidade e gênero. Pesquisas desta natureza podem auxiliar na compreensão do mecanismo de envenenamento e dar subsídios ao desenvolvimento de terapias antiofídicas mais efetivas, como também auxiliar na prospecção de moléculas com potencial biotecnológico. Neste contexto, descrever o conteúdo proteico das peçonhas brutas do macho e da fêmea de *Bothrops leucurus* e avaliar seus efeitos biológicos ganha notoriedade, pois esta espécie é responsável por um número expressivo de acidentes na região Nordeste (LIRA-DA-SILVA, 2009). Ainda, deve-se considerar que a peçonha de *B. leucurus* não faz parte do *pool* das peçonhas utilizadas na produção dos soros antiofídicos distribuídos nacionalmente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, a influência da variação sexual da peçonha da serpente da espécie *Bothrops leucurus* nos efeitos biológicos desencadeados pelo mesmo, correlacionando esses dados com o perfil proteico observado na peçonha de espécimes adultos macho e fêmea.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar e descrever o perfil proteico da peçonha bruta extraída de serpentes macho e fêmea da espécie *Bothrops leucurus*;
- ✓ Avaliar a atividade hemolítica direta e indireta sobre eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B, AB e O na presença do veneno bruto de *Bothrops leucurus* macho (VB_BleuM) e do veneno bruto de *Bothrops leucurus* fêmea (VB_BleuF);
- ✓ Quantificar os efeitos oxidante e antioxidante de VB_BleuM e de VB_BleuF sobre a hemoglobina humana;
- ✓ Mensurar o tempo de coagulação de VB_BleuM e de VB_BleuF sobre o plasma humano citratado;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos foram cedidos pela Agência Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW/UFPB), João Pessoa, PB. As bolsas doadas continham concentrado de hemácias dos grupos sanguíneos A, B, AB e O, fator Rh positivo. O acondicionamento, manipulação e descarte dos eritrócitos foram realizados segundo as normas preconizadas pela referida unidade, de acordo com a resolução CNS nº 441 de 12 de maio de 2011 (ANEXO 1).

3.2 Plasma humano citratado

O plasma humano foi obtido por coleta de sangue venoso de voluntários sadios, colhidos em tubos de ensaio à vácuo contendo 3,2% (0,109M) de citrato de sódio (1:9). Os doadores permaneceram em jejum por, no mínimo, quatro horas e não fizeram uso de medicamentos nos dez dias que antecederam à coleta. Após a coleta, os tubos contendo o sangue total foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos para a separação do plasma, o qual foi utilizado imediatamente para avaliar a atividade coagulante. Os controles de Tempo de Protrombina – TP e de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada – TTPA dos experimentos de coagulação, foram aferidos, respectivamente, pelos kits PT HEMOSTASIS Ref. 501 e APTT HEMOSTASIS Ref. 502, comercializados pela Labtest Diagnóstica S.A.

3.3 Peçonhas brutas da serpente *Bothrops leucurus*

Os *pools* de veneno bruto de espécimes adultos de *Bothrops leucurus* macho (VB_BleuM) e fêmea (VB_ BleuF) provenientes do Museu Vivo Répteis da Caatinga, Puxinanã/PB foram coletados, liofilizados e cedidos gentilmente pela Prof^a. Dr^a. Karla Patrícia de Oliveira Luna –Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Para a avaliação das atividades biológicas, os VB_BleuM e VB_BleuF foram solubilizados em Tampão Fosfato Salina (PBS – 10x, pH 7,4) e utilizados imediatamente ou acondicionadas sob refrigeração (-4°C). Durante a execução dos experimentos, as amostras solubilizadas foram mantidas em banho de gelo para evitar a desnaturação proteica.

3.4 Aspectos éticos

Todos os experimentos e toda a coleta de material biológico utilizados foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB (HULW/UFPB - CAAE nº 60981316.6.0000.5186, parecer nº 1.848.748) (ANEXO 2), como preconizado pela Norma Operacional nº 001/2013 - Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução 466/12 - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

3.5 Determinação do perfil proteico

3.5.1 Cromatografia líquida de fase reversa

Os perfis cromatográficos do VB_BleuM e do VB_BleuF foram obtidos por Cromatografia Líquida de Fase Reversa utilizando o cromatógrafo HPLC (Shimadzu Corporation) e coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (M) com comprimento de 25cm x 4,6mm, 100Å de diâmetro do poro e 5µm de diâmetro da partícula) seguindo a metodologia proposta por Calvete *et al.* (2007) e Rodrigues *et al.* (2012).

Para obtenção das frações proteicas de cada *pool* de peçonha bruta de *B. leucurus* (macho e fêmea) foram utilizadas, respectivamente, 2,15 mg e 2,45 mg solubilizadas em 0,05% de Ácido Trifluoroacético (TFA) / 5% Acetonitrila (ACN) e centrifugadas a 13000rpm por 10 minutos a 4°C. A coluna foi equilibrada com o Tampão A (0,1% de TFA em água destilada e deionizada) e a eluição foi realizada com gradiente de 0 a 100% de Tampão B (66,5% de ACN em 0,1% de TFA). O gradiente linear empregado para eluição das frações foi de 0% de Tampão B por cinco minutos seguido por 0 a 20% de Tampão B durante 10 minutos; 20 a 75% de Tampão B por 80 minutos; 75 a 100% de Tampão B por 10 minutos e 100% de Tampão B por cinco minutos. O fluxo de eluição empregado foi de 1,0 mL/min.

As frações proteicas foram coletadas automaticamente sob temperatura de 4°C acima de 25mAU. A concentração teórica de cada fração proteica obtida foi aferida por espectrofotometria a 280nm pelo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific™), considerando 1 ABS = 1,0 mg/mL.

3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizadas com gel de separação a 13% de Bis-acrilamida em um sistema desnaturante e reduzido conforme metodologia proposta por Laemmli (1970).

As amostras aplicadas no sistema SDS-PAGE continham 10µL de fração obtida dissolvida em 5µL de tampão de amostra, composto por 0,05M de Tris-HCl pH 6,8; 10% de SDS; azul de bromofenol; glicerol e β-mercaptoetanol. Antes das amostras serem aplicadas, essas foram aquecidas a 100°C por cinco minutos e centrifugadas rapidamente.

A separação das amostras ocorreu sob corrente constante de 25mA, em temperatura ambiente, usando tampão de corrida Tris-Glicina. O padrão de massa molecular utilizado na corrida foi o PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™), contendo nove padrões de massa molecular variando entre 250 e 10kDa (250, 130, 100, 55, 35 e 15 kDa em azul, 70 e 25 kDa em vermelho e 10 kDa em verde).

Após a corrida, o gel foi corado com Azul de Comassie Brilhante g-250 por duas horas a 40°C sob agitação constante e descorado em água deionizada, etanol e ácido acético, na proporção de 6:3:1. As análises cromatográficas e eletroforéticas foram feitas em colaboração com o Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador (Laboratório de Biologia Molecular Estrutural/IBB/UNESP, Botucatu-SP).

3.6 Investigação das atividades biológicas

3.6.1 Atividade hemolítica direta e indireta sobre eritrócitos humanos

Os testes de atividade hemolítica direta/indireta de VB_BleuM e VB_BleuF foram realizados sobre eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B, AB e O com fator Rh positivo, adaptando as metodologias propostas por Hubert *et al.* (1997) e Rangel *et al.* (1997).

Para a execução dos testes, foi preparada uma suspensão de eritrócitos (SE) a 0,5%. A SE foi feita com eritrócitos ressuspensos em uma solução de NaCl a 0,9% na proporção de 1:2 e centrifugados a 3.000 rpm durante 5 minutos. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram ressuspensos novamente, da mesma forma. Os eritrócitos humanos foram considerados “lavados” após esse procedimento ter sido realizado três vezes. O sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em NaCl a 0,9% para obtenção da SE a 0,5%.

O grau de hemólise direta foi avaliado em cinco quantidades distintas de VB_BleuM e VB_BleuF: 1000, 100, 10, 1 e 0,1µg. Os experimentos foram realizados em microtubos em que foram adicionados 2,0mL de SE a 5% e 100µL de peçonha bruta. Nos microtubos do controle negativo continham apenas 2,0mL de SE a 5% (0% de hemólise), enquanto que aos do controle positivo foram acrescentados 100µL de Triton X-100 (100% hemólise). Os microtubos contendo as amostras em experimentação e os controles foram incubados a 37°C sob agitação lenta e constante (100 rpm) por 60 minutos.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante cinco minutos e o grau de hemólise foi quantificado através da leitura do sobrenadante por espectrofotometria a 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem do grau de hemólise, que foram calculados segundo a equação proposta por Hubert *et al.*, (1997), utilizando os valores de absorbância (Abs):

$$\% \text{ hemólise} = 100 \times \frac{\text{Abs da amostra} - \text{Abs controle negativo}}{\text{Abs controle positivo} - \text{Abs controle negativo}} \quad \text{Equação \#1}$$

Para avaliar o grau de hemólise indireta sobre eritrócitos humanos na presença das peçonhas, além da adição da SE e da peçonha bruta, adicionou-se a cada microtubo 20µL de um complexo de ácidos graxos (AG - ácido eicosapentanoico e ácido docosahecanoico) a 100% e/ou 0,5µL de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 1M. O teste de hemólise indireta foi realizado para verificar se haveria um aumento do grau de hemólise decorrente do possível aumento da atividade fosfolipásica, já que foram adicionados ao sistema o CaCl₂ e um complexo de ácidos graxos, descritos como co-fatores importantes no desempenho da atividade catalítica da PLA₂, enzima com atividade de clivagem de fosfolipídios de biomembranas (ARNI; WARD, 1996; SINGH *et al.*, 2005).

O procedimento de montagem do experimento ocorreu de forma idêntica à descrita para a atividade hemolítica direta, porém foram adicionados o complexo de ácidos graxos e CaCl₂ juntos e separadamente, de maneira que foram obtidos três grupos experimentais: 1. SE + CaCl₂; 2. SE + complexo de ácidos graxos; 3. SE + complexo de ácidos graxos + CaCl₂. Os grupos seguiram para incubação e leitura sob as mesmas condições empregadas no teste de hemólise direta e a porcentagem de hemólise também foi calculada de acordo com a equação proposta por Hubert *et al.* (1997).

3.6.2 Atividade oxidante

O estresse oxidativo, *in vitro*, causado à hemoglobina pela presença de VB_BleuM e de VB_BleuF foi avaliado de acordo com adaptações na metodologia proposta por Naoum *et al.* (2004). Para a avaliação do potencial oxidante dos venenos brutos em estudo, inicialmente foi preparada uma suspensão de eritrócitos contendo 30% de eritrócitos em PBS 10X pH 7,4; 0,6% de glicose a 10% e 400µL de Trinton X-100. Em microtubos contendo 1mL da SE foi adicionado 100µL do veneno bruto em cinco concentrações diferentes (1000, 100, 10, 1 e 0.1 mg/mL) e incubados por 1h a 37°C com agitação constante (100 rpm). Decorrido este tempo, foram retirados 25 µL de cada microtubo inicial e ressuspensos separadamente em microtubos contendo 750 µL de tampão fosfato e quantificados por espectrofotometria a 630nm. De cada um desses últimos microtubos, foi retirado 75 µL, ressuspensos separadamente em 750 µL de tampão fosfato e quantificados por espectrofotometria a 540nm. O efeito oxidante foi caracterizado segundo a metodologia proposta por Naoum *et al.* (2004), que considera significativos valores de formação de metahemoglobina (metHb) acima de 4% e propôs a seguinte equação para cálculo da porcentagem de metHb em relação à hemoglobina (Hb):

$$\%metHb = \frac{Abs\ 630nm \times 100}{Abs\ 630nm + (Abs\ 540nm \times 10)} \quad \text{Equação \#2}$$

Todos os experimentos de avaliação da atividade oxidante foram realizados em triplicatas (n=3).

3.6.3 Atividade antioxidante

A investigação, *in vitro*, do potencial antioxidante de VB_BleuM e de VB_BleuF após a exposição à hemoglobina humana foi realizada com posterior adição do agente oxidante fenilhidrazina (PH), seguindo a metodologia (com adaptações) proposta por Naoum *et al.* (2004).

O potencial antioxidante de VB_BleuM e de VB_BleuF foi avaliado em cinco quantidades: 1000, 100, 10, 1 e 0,1µg. Para a realização dos experimentos, cada quantidade de peçonha avaliada foi incubada por 60 minutos, sob agitação de 100 rpm e 37°C com 1000µL de SE a 30% (preparada conforme descrito para a atividade oxidante). Decorrido o primeiro tempo de incubação, foi acrescido 50µL de fenilhidrazina a 1M à cada amostra em análise e novamente incubadas por 20 minutos à 37°C sob agitação de 100 rpm.

Após o segundo tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 3000 rpm e 25°C, e 25µL de cada amostra em análise foi ressuspensa em 750µL de PB e quantificada por espectrometria a 630nm. Dessa diluição anterior, 75µL de cada amostra foi ressuspensa em 750µL de PB e quantificada por espectrometria a 540nm. Os experimentos foram executados em triplicata e a porcentagem de metHb em relação à de Hb total foi quantificada pela Equação #2, tendo como controle positivo as amostras contendo somente suspensão de eritrócitos e fenilhidrazina.

3.6.4 Atividade coagulante

A avaliação da atividade coagulante, *in vitro*, do plasma citratado humano na presença de VB_BleuM e VB_BleuF foi realizado segundo a metodologia descrita por Alvarado e Gutiérrez (1998), com algumas adaptações.

O tempo de coagulação do plasma citratado humano foi aferido para quatro quantidades (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0µg) de VB_BleuM e de VB_BleuF. Para a realização dos experimentos de coagulação, foram adicionados 100µL do *pool* de plasma citratado humano em tubos mantidos em banho-maria, a 37°C. Em seguida, cada uma das quantidades das peçonhas foi acrescentada aos tubos, separadamente, e o tempo de formação do coágulo foi registrado.

Os controles utilizados como referência para o tempo de coagulação foram obtidos pela incubação do plasma citratado humano com reagentes comerciais que compunham os kits comerciais PT HEMOSTASIS ref. 501 e APTT HEMOSTASIS ref. 502 (Labtest Diagnóstica S.A.) conforme orientações do fabricante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7 Análises estatísticas

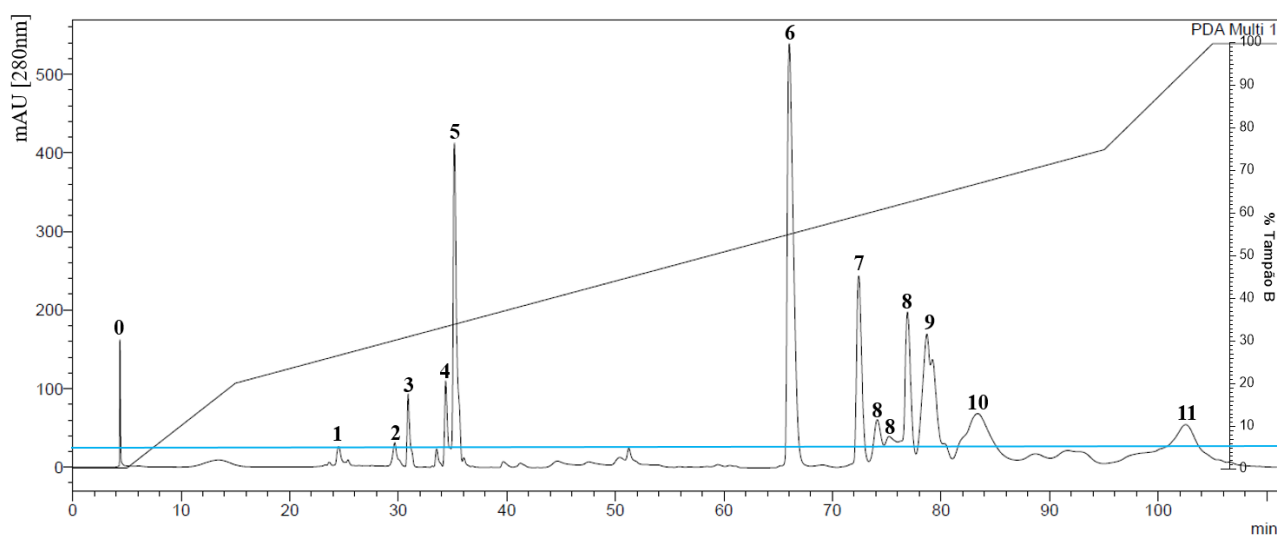
Os resultados obtidos em todos os experimentos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e os grupos experimentais foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) usando o teste one-way ANOVA com múltiplas comparações. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,01$; **: $p < 0,001$; ***: $p < 0,0001$; ****: $p < 0,00001$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização proteica - Cromatografia líquida de fase reversa e eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

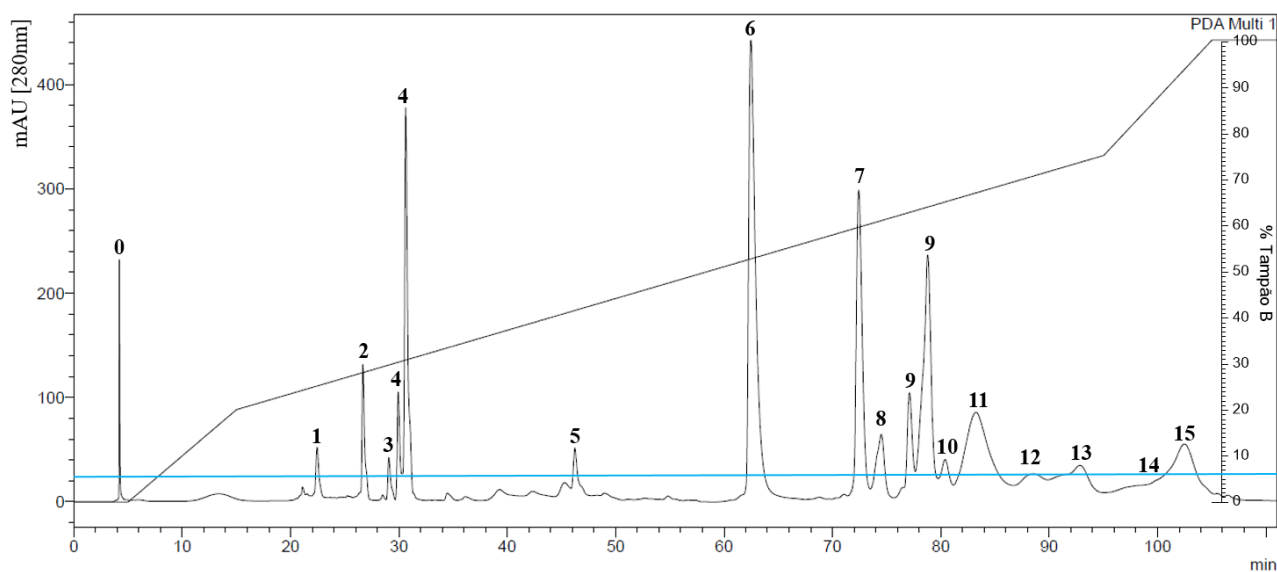
A análise cromatográfica de VB_BleuM e de VB_BleuF levou à obtenção de 12 e 16 frações, respectivamente, coletadas acima de 25mAU (Figuras 09 e 10).

Figura 09 - Cromatograma do veneno bruto de *Bothrops leucurus* macho



Fonte: Dados de pesquisa, 2015-2017.

Figura 10 - Cromatograma do veneno bruto de *Bothrops leucurus* fêmea



Fonte: Dados de pesquisa, 2015-2017.

As frações coletadas foram denominadas Fr0 a Fr11 para VB_BleuM e Fr0 a Fr15 para VB_BleuF. A Fr0 de ambos foi obtida antes dos cinco minutos iniciais, quando ainda não havia começado o gradiente linear (0% de tampão B) e foi descartada. A análise comparativa das frações obtidas nos dois cromatogramas indicou semelhanças nos perfis cromatográficos, diferindo, apenas, no número de frações coletadas. Essa diferença pode estar associada à quantidade de peçonha bruta utilizada nos experimentos. As condições de eluição das frações estão descritas na Tabela 01.

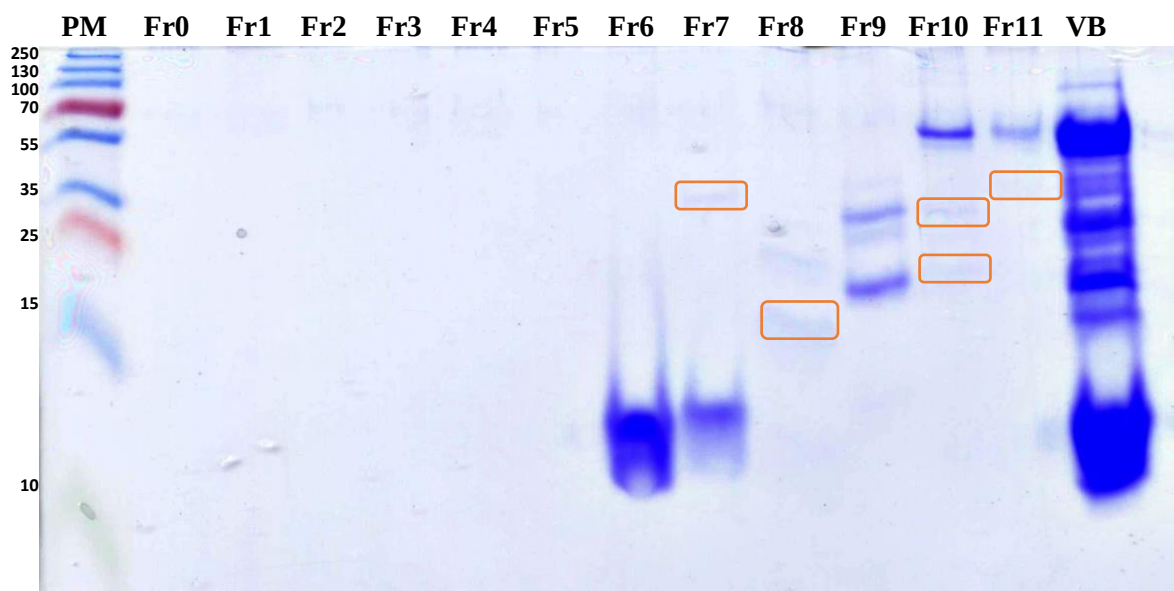
Tabela 01 - Perfil cromatográfico comparativo das frações obtidas de VB_BleuM e VB_BleuF

Frações (picos)		% Tampão B	Tempo (minutos)
VB_BleuM	VB_BleuF		
Fr0	Fr0	0	5
Fr1	Fr1	25-26	23-24
Fr2	-	31	30
Fr3	Fr2	28-32	27-31
-	Fr3	29	29
Fr4	Fr4 (a)	30-33	30-35
Fr5	Fr4 (b)	30-34	31-35
-	Fr5	42	46
Fr6	Fr6	54-56	63-67
Fr7	Fr7	60	72
Fr8 (a)	Fr8 (a)	61	74
Fr8 (b)	Fr8 (b)	62	75
Fr8 (c)	Fr9 (a)	63	77
Fr9 (a)	Fr9 (b)	64	79
Fr9 (b)	Fr9 (b)	64	79
Fr9 (c)	Fr10	64-65	80
Fr10 (a)	Fr11	66-68	82-83
Fr10 (b)	Fr11	66-68	83-84
-	Fr12	72	88
-	Fr13	74	93
-	Fr14	88	101
Fr11	Fr15	92	102-103

Análise comparativa das frações equivalentes de VB_BleuM e VB_BleuF de acordo com o perfil cromatográfico e SDS-PAGE. O símbolo “-” indica fração não coletada. As letras (a), (b) e (c) indicam picos distintos observados em uma mesma fração. **Fonte:** dados de pesquisa, 2015-2017.

Após traçar o perfil cromatográfico, foi realizada a análise por SDS-PAGE dos picos das peçonhas de macho e fêmea para averiguar o perfil proteico de cada uma (Figuras 11 – 13).

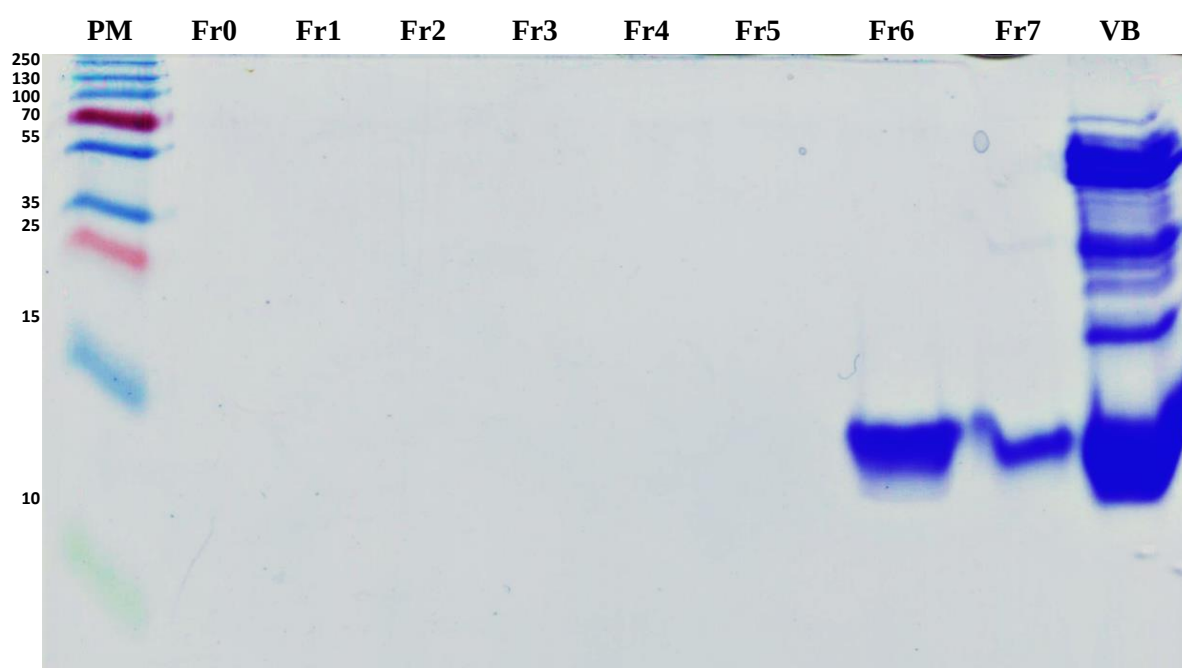
Figura 11 - Perfil eletroforético das frações do veneno de *Bothrops leucurus* macho



PM: padrão de peso molecular ((PageRuler Plus®); Fr0 - Fr11: frações proteicas; VB: veneno bruto.

Fonte: dados de pesquisa, 2015-2017

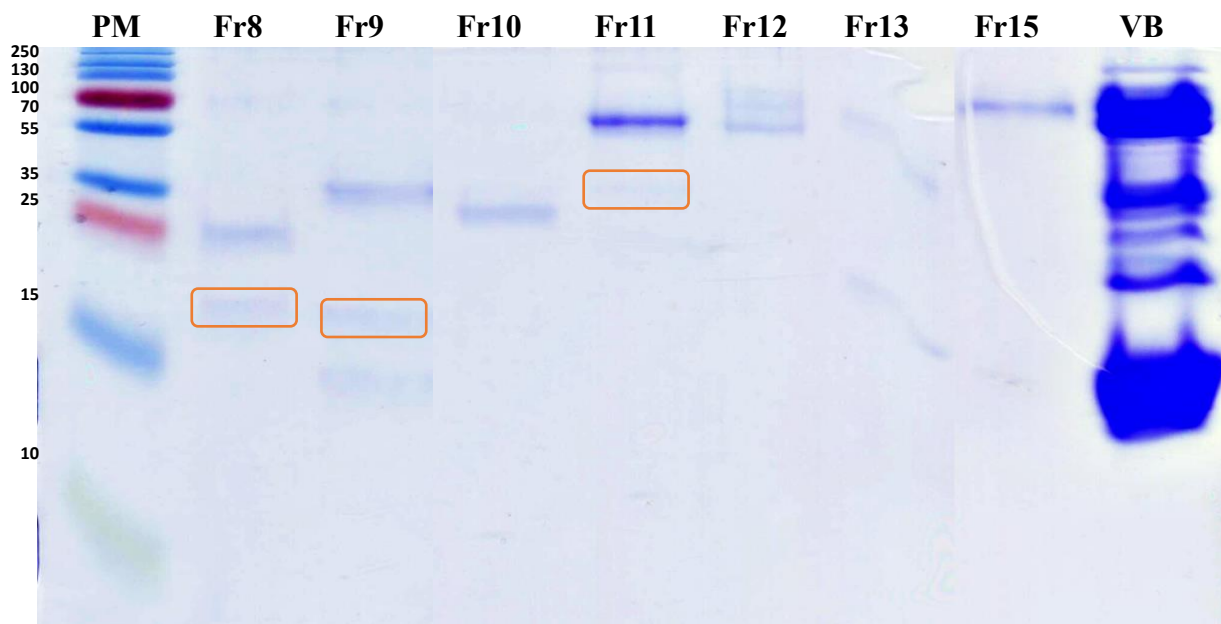
Figura 12 - Perfil eletroforético das frações 0-7 do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea



PM: padrão de massa molecular (PageRuler Plus®) Fr0 – Fr7: frações proteicas; VB: veneno bruto.

Fonte: dados de pesquisa, 2015-2017

Figura 13 - Perfil eletroforético das frações 8-15 do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea.



PM: padrão de massa molecular (PageRuler Plus®); Fr8 – Fr15: frações proteicas; VB: veneno bruto.
Fonte: dados de pesquisa, 2015-2017

Ao analisar os perfis de migração eletroforética das frações de VB_BleuM e VB_BleuF não foi possível observar a presença de proteínas nas frações 1-5, quando corados com Azul de Comassie Brilhante g-250. A determinação da classe proteica das bandas observadas na SDS-PAGE foi realizada pela correlação dessas com as referências bibliográficas sobre proteínas isoladas da peçonha *Bothrops leucurus* e estudos venômicos descritivos do perfil cromatográfico de outras espécies botrópicas. Diversos estudos realizados traçaram o perfil venômico da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, identificando cada proteína por meio de sequenciamento aminoacídico (TASHIMA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012; GONÇALVES-MACHADO *et al.*, 2015; JORGE *et al.*, 2015; GAY *et al.*, 2016; CALVETE, 2017).

Na Fr6, de ambos os venenos, foi possível observar a presença de uma proteína de ~13 kDa, a qual pode estar relacionada à presença de fosfolipases A₂ como a bIK-PLA₂ (Lys49), bID-PLA₂ (Asp49) (HIGUCHI *et al.*, 2011), a BleuTX-III, com ação miotóxica e edematogênica (MARANGONI *et al.*, 2013) ou a Bl-PLA₂, que apresenta ação hemolítica e edematogênica (NUNES *et al.*, 2011).

As bandas de ~15 kDa observadas na fração 8 de VB_BleuM e na fração 9 de VB_BleuF puderam ser associadas à uma lectina, que pode ser a bIL, uma lectina dimérica cálcio-dependente do tipo C caracterizada por Oliveira (2015) e Nunes e colaboradores (2011).

Na fração 9 dos VB_BleuM e VB_BleuF, a banda proteica observada na faixa de ~30 kDa foi relacionada à uma serinoprotease, podendo se tratar da leucurolina, uma enzima fibrinogenolítica com atividade sobre a cadeia A α do fibrinogênio (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

A análise eletroforética da fração 10 de VB_BleuM e da fração 11 de VB_BleuF indicou a presença de proteínas com ~30kDa, as quais puderam ser associadas à uma metaloprotease, que pode ser a Leucurolisina-A, uma enzima não-hemorrágica com atividade catalítica sobre a cadeia A α do fibrinogênio (BELLO *et al.*, 2006; GREMSKI, 2007; WILSON, 2013). Ainda, nessas frações, a presença de proteínas de ~60 kDa puderam ser relacionadas à L-aminoácido oxidase, tal qual a Bl-LAAO, descrita por Naumann e colaboradores (2011) como uma LAAO monomérica com ação inibitória sobre a agregação plaquetária.

Na fração 13 de VB_BleuF foi observada uma proteína de ~20 kDa que pode ser relacionada à uma metaloprotease, podendo indicar a presença da BleucMP, uma SVMP não-hemorrágica e fibrinogenolítica com ação sobre as cadeias A α e B β do fibrinogênio (GOMES *et al.*, 2011).

As frações 11 de VB_BleuM e 15 de VB_BleuF apresentaram bandas similares de ~60 kDa, as quais foram associadas à uma outra metaloprotease como a Leucurolisina-B, uma proteína com atividade fibrinogenolítica sobre a cadeia A α do fibrinogênio descrita por Sánchez e colaboradores (2007).

Duas metaloproteases de alto peso molecular denominadas Bleu-H1 e Bleu H-2 foram descritas por Correia (2006) como toxinas hemorrágicas de 287 kDa e 207 kDa, respectivamente. Essas enzimas, em condições redutoras, revelaram seis cadeias com massa molecular aproximada de 14 a 41 kDa. Ao analisar as frações 12 e 13 da fêmea e 10 do macho, observou-se algumas bandas proteicas dentro dessa faixa de massa molecular, o que pode estar relacionado à presença dessas SVMPs. As análises cromatográficas e proteômicas realizadas com peçonhas botrópicas geralmente descrevem a presença das SVMPs nas últimas frações eluídas (TASHIMA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012; GONÇALVES-MACHADO *et al.*, 2015; JORGE *et al.*, 2015; GAY *et al.*, 2016; CALVETE, 2017), corroborando a associação das SVMPs às frações citadas anteriormente.

Atualmente, as pesquisas relacionadas ao veneno bruto e às proteínas isoladas da peçonha de *Bothrops leucurus* são escassas, dificultando descrever e detalhar a composição desses venenos. Estudos venômicos detalhados da peçonha de *B. leucurus* podem dar subsídio à efetiva elucidação da sua composição, facilitando análises proteômicas e peptidômicas intraespecíficas.

A semelhança observada entre os perfis proteicos dos VB_BleuM e VB_BleuF corroboraram com o estudo de Lira-da-Silva (2009), que não observou mudanças significativas entre as composições proteicas de venenos de machos e fêmeas de *Bothrops leucurus*.

Estudos proteômicos sexo-específicos foram realizados com a peçonha de *Bothrops jararaca*, indicando expressivas diferenças entre as composições proteicas de machos e fêmeas. Furtado e colaboradores (2006) observaram semelhanças entre as composições de venenos de machos e fêmeas de *B. jararaca*, variando apenas nas atividades biológicas desencadeadas. Já Menezes e colaboradores (2006) demonstraram a presença de proteínas de alto peso molecular (~100 kDa) apenas na peçonha dos machos de *B. jararaca*, ao passo que, exclusivamente no veneno das fêmeas, havia proteases na faixa de 25 kDa.

Pesquisas voltadas à influência da variação sexual na composição do veneno de outras espécies peçonhentas mostraram que apenas no veneno da fêmea da aranha *Coremiocnemis tropix* foram detectadas neurotoxinas pós-sinápticas (HERZIG; HODGSON, 2009). Binford e colaboradores (2016) apontaram que a aranha do gênero *Tetragnatha* apresentou marcantes diferenças na composição proteica das peçonhas de machos e fêmeas, com proteínas de baixa massa molecular presentes em maior quantidade no veneno das fêmeas. Ainda, Uribe e colaboradores (2017) descreveram a diferença na composição proteica associada à variação sexual no veneno do escorpião *Centruroides limpidus*, em que foram detectadas a presença de dois tipos de serinoprotease na fêmea e de apenas um tipo no macho.

4.2 Atividade hemolítica direta e indireta

Os experimentos de hemólise direta e indireta sobre eritrócitos humanos dos grupos A+, B+, AB+ e O+ não indicaram atividade hemolítica significativa em nenhum dos dois venenos analisados. A porcentagem de hemólise foi calculada com base na equação #1, e não ultrapassou os 3% na maioria das amostras, exceto naquelas contendo VB_BleuM e VB_BleuF, ambos incubados com o complexo de ácido graxos e eritrócitos do grupo A+ (Tabela 02). Todas as demais amostras apresentaram taxas de formação de hemoglobina abaixo de 3% (Tabelas 02-05).

Tabela 02 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de *B. leucurus* sobre eritrócitos A+

	Taxa de hemólise (% de formação de hemoglobina)				
	0,1 µg	1 µg	10 µg	100 µg	1000 µg
VB					
VB_BleuM	0,0±0,13	0,0±0,08	0,0±0,14	0,0±0,09	0,0±0,11
VB_BleuF	0,1±0,13	0,0±0,25	0,0±0,09	0,0±0,19	0,0±0,27
VB + AGs					
VB_BleuM	2,1±0,19	2,1±0,10	2,9±0,25	3,3±0,10	3,3±0,04
VB_BleuF	4,8±0,08	5,6±0,52	6,0±0,07	5,6±0,16	4,6±0,47
VB + CaCl₂					
VB_BleuM	0,4±0,07	0,3±0,15	0,1±0,06	0,0±0,06	0,0±0,11
VB_BleuF	0,6±0,15	2,0±0,32	0,5±0,27	0,1±0,22	0,0±0,17
VB + AGs + CaCl₂					
VB_BleuM	0,0±0,07	0,0±0,13	0,0±0,22	0,0±0,31	0,0±0,08
VB_BleuF	0,0±0,12	0,0±0,25	0,0±0,17	0,0±0,22	0,0±0,47

% hemólise direta sobre eritrócitos A+ provocada pelo veneno bruto (VB) de *B. leucurus* macho (VB_BleuM) e de *B. leucurus* fêmea (VB_BleuF) incubados com complexo de ácidos graxos (AGs) e/ou CaCl₂. Os valores obtidos dos controles positivos e negativos foram empregados para os cálculos dos valores descritos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). **Fonte:** Pesquisa direta, 2015-2017.

Tabela 03 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de *B. leucurus* sobre eritrócitos B+

	Taxa de hemólise (% de formação de hemoglobina)				
	0,1 µg	1 µg	10 µg	100 µg	1000 µg
VB					
VB_BleuM	0,0±0,07	0,0±0,09	0,0±0,11	0,0±0,09	0,0±0,04
VB_BleuF	0,4±0,18	0,4±0,22	0,0±0,27	0,0±0,19	0,0±0,40
VB + AGs					
VB_BleuM	0,0±0,08	0,3±0,10	0,0±0,05	0,0±0,05	0,0±0,07
VB_BleuF	0,0±0,09	0,0±0,42	0,0±0,27	0,0±0,38	0,0±0,47
VB + CaCl₂					
VB_BleuM	0,0±0,05	0,0±0,03	0,0±0,03	0,0±0,11	0,0±0,02
VB_BleuF	0,3±0,28	0,3±0,34	2,1±0,16	0,6±0,47	0,0±0,23

(continuação)

VB + AGs + CaCl ₂					
VB_BleuM	0,0±0,18	0,0±0,10	1,5±0,22	0,1±0,12	0,7±0,06
VB_BleuF	0,4±0,27	1,7±0,49	1,6±0,35	0,2±0,24	0,2±0,44

% hemólise direta sobre eritrócitos A+ provocada pelo veneno bruto (VB) de *B. leucurus* macho (VB_BleuM) e de *B. leucurus* fêmea (VB_BleuF) incubados com complexo de ácidos graxos (AGs) e/ou CaCl₂. Os valores obtidos dos controles positivos e negativos foram empregados para os cálculos dos valores descritos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). **Fonte:** Pesquisa direta, 2015-2017.

Tabela 04 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de *B. leucurus* sobre eritrócitos AB+

Taxa de hemólise (% de formação de hemoglobina)					
	0,1 µg	1 µg	10 µg	100 µg	1000 µg
VB					
VB_BleuM	0,4±0,12	0,4±0,10	0,2±0,17	0,0±0,06	0,0±0,04
VB_BleuF	0,5±0,28	0,3±0,46	2,2±0,27	0,0±0,16	0,0±0,26
VB + AGs					
VB_BleuM	1,5±0,27	1,3±0,15	1,6±0,18	0,6±0,28	1,1±0,30
VB_BleuF	0,0±0,19	0,5±0,41	0,0±0,07	0,0±0,14	0,0±0,23
VB + CaCl₂					
VB_BleuM	1,1±0,29	3,1±0,11	2,0±0,14	1,4±0,22	2,4±0,16
VB_BleuF	0,4±0,09	1,6±0,63	0,7±0,22	0,0±0,16	0,0±0,24
VB + AGs + CaCl₂					
VB_BleuM	0,9±0,18	0,0±0,33	0,0±0,28	0,0±0,15	0,0±0,18
VB_BleuF	0,0±0,34	0,5±0,27	0,0±0,07	0,0±0,16	0,0±0,22

% hemólise direta sobre eritrócitos AB+ provocada pelo veneno bruto (VB) de *B. leucurus* macho (VB_BleuM) e de *B. leucurus* fêmea (VB_BleuF) incubados com complexo de ácidos graxos (AGs) e/ou CaCl₂. Os valores obtidos dos controles positivos e negativos foram empregados para os cálculos dos valores descritos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). **Fonte:** Pesquisa direta, 2015-2017.

Tabela 05 - Atividade hemolítica provocada pelo veneno de *B. leucurus* sobre eritrócitos O+

	Taxa de hemólise (% de formação de hemoglobina)				
	0,1 µg	1 µg	10 µg	100 µg	1000 µg
VB					
VB_BleuM	0,3±0,12	0,4±0,20	0,2±0,15	0,3±0,31	0,4±0,28
VB_BleuF	0,5±0,28	0,9±0,57	1,0±0,27	1,5±0,16	2,1±0,34
VB + AGs					
VB_BleuM	0,2±0,27	2,5±0,15	2,4±0,32	0,0±0,08	0,0±0,08
VB_BleuF	0,0±0,17	0,0±0,29	0,0±0,22	0,0±0,18	0,0±0,27
VB + CaCl₂					
VB_BleuM	0,2±0,23	0,2±0,17	0,0±0,11	0,0±0,13	4,4±0,24
VB_BleuF	1,3±0,28	1,4±0,43	0,6±0,17	0,0±0,36	1,3±0,28
VB + AGs + CaCl₂					
VB_BleuM	0,4±0,27	0,2±0,18	0,6±0,25	0,0±0,12	1,4±0,24
VB_BleuF	1,3±0,27	1,4±0,47	0,6±0,39	0,0±0,46	1,3±0,19

% hemólise direta sobre eritrócitos O+ provocada pelo veneno bruto (VB) de *B. leucurus* macho (VB_BleuM) e de *B. leucurus* fêmea (VB_BleuF) incubados com complexo de ácidos graxos (AGs) e/ou CaCl₂. Os valores obtidos dos controles positivos e negativos foram empregados para os cálculos dos valores descritos. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). **Fonte:** Pesquisa direta, 2015-2017.

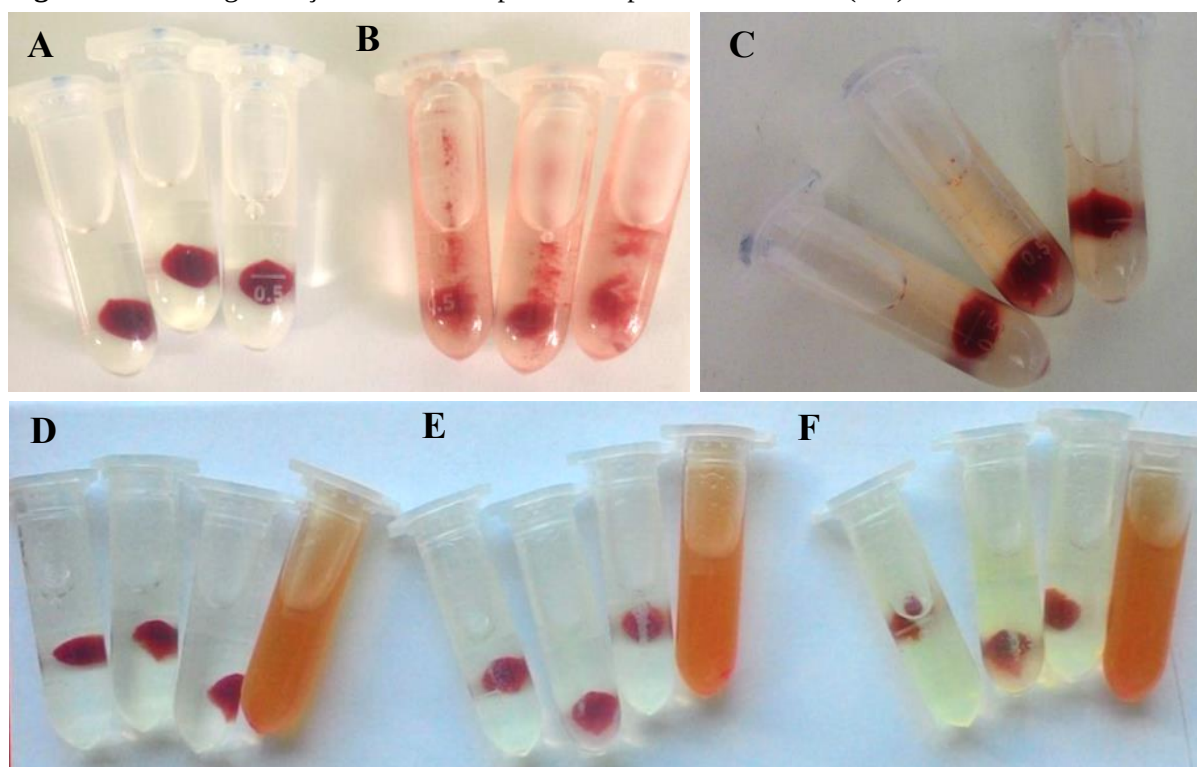
Os valores de hemólise obtidos não foram significativos para as amostras experimentais, embora a atividade hemolítica direta e indireta de outros venenos botrópicos já tenha sido bem descrita por outros autores, com resultados significativos para diversas espécies (CISCOTTO, 2005; MARTINS, 2006; CARVALHO, 2008; MENALDO *et al.*, 2016).

A hemólise provocada pelos venenos botrópicos está associada à atividade das fosfolipases A₂ (PLA₂), que são proteínas dependentes de cálcio e ácidos graxos para o desempenho da sua atividade catalítica (RODRIGUES-SIMIONI; BORGESE; CECCARELLI, 1983; ARNI; WARD, 1996; SINGH *et al.*, 2005).

Ao analisar o perfil de migração eletroforética dos venenos, pode-se observar a presença de bandas proteicas de baixa massa molecular que podem ser associadas à presença de fosfolipases A₂. Algumas PLA₂ foram isoladas a partir da peçonha de *Bothrops leucurus*, sendo descritas como proteínas de ação miotóxica (HIGUCHI *et al.*, 2007; MARANGONI *et al.*, 2013), hemolítica (NUNES *et al.*, 2011) e edematogênica (MARANGONI *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2011).

Entretanto, a ausência de hemólise observada em todos os experimentos pode estar relacionada à hemaglutinação eritrocitária observada (Figura 14). A pronunciada hemaglutinação foi constatada logo após o término do tempo de incubação e, caracterizou-se pela formação de uma massa fluida e resistente à desintegração por agitação mecânica. Essa resistência apresentou relação com a quantidade de veneno adicionada aos tubos, de forma que as amostras contendo a menor concentração de veneno assumiram coloração avermelhada logo após a agitação manual, provavelmente devido à hemólise provocada por este movimento.

Figura 14 - Hemaglutinação eritrocitária provocada pelo veneno bruto (VB) de *B. leucurus*



A) Amostras com a maior quantidade (1000 µg) de VB incubado com eritrócitos A+, após agitação; B) Amostras com a menor quantidade (0,1 µg) de VB após da agitação manual; C) Amostras com a menor quantidade de veneno, antes da agitação manual; D) Amostras contendo VB + CaCl₂ e controle negativo, antes da centrifugação; E) Amostras contendo VB + complexo de ácidos graxos + CaCl₂ e controle negativo, antes da centrifugação; F) Amostras contendo VB+ complexo de ácidos graxos e controle negativo, antes da centrifugação. **Fonte:** pesquisa direta, 2015-2017.

A hemaglutinação, *in vitro*, provocada pela presença do veneno total de serpentes foi observada, pela primeira vez, por Ogilvie e Gartner (1984). Esses autores descreveram a capacidade hemaglutinante de 16 venenos de serpentes das famílias Crotalidae, Elapidae e Viperidae, e atribuíram esta atividade à presença de lectinas tipo-C.

As lectinas de veneno de serpentes (SVLs, *snake venom lectins*) correspondem a cerca de 1 a 5% do peso seco do veneno (HAVT, *et al.*, 2005). Essas proteínas possuem a capacidade

de aglutinação celular e precipitação de polissacarídeos devido à sua capacidade de formar ligações não covalentes com carboidratos específicos. A região molecular das lectinas que interage com o carboidrato foi caracterizada como um domínio que reconhece a sequência específica de resíduos de açúcar, denominada domínio de reconhecimento ao carboidrato (CDR). Nas lectinas tipo-C, a atividade de reconhecimento ao carboidrato é dependente da presença do íon cálcio, o qual atua na estabilização do sítio de ligação (SHARON; LIS, 1989; DRICKAMER, 1995). A interação com o carboidrato ocorre por meio de forças de “van der Waals” e de um complexo sistema de pontes de hidrogênio, fundamentais para a estabilização da interação lectina-carboidrato (WEIS; DRICKAMER, 1996).

A maioria das lectinas provenientes de venenos ofídicos interagem com β -galactosídeos de biomembranas (LOMONTE *et al.*, 1990). Essa característica foi observada em diversos estudos relacionados ao isolamento e caracterização das lectinas-C de peçonhas do gênero *Bothrops*. Carvalho *et al.*, (1998) e Carvalho *et al.*, (2002) purificaram, da peçonha de *B. jararacussu*, uma lectina-C ligante de galactose, afinidade que também foi observada nas lectinas-C isoladas de *Bothrops pirajai* (HAVT *et al.*, 2005) e de *Bothrops moojeni* (BARBOSA *et al.*, 2010). Guimarães-Gomes e colaboradores (2004) descreveram que a lectina-C da peçonha de *Bothrops insularis* tem afinidade à lactose e galactose.

A pronunciada capacidade hemaglutinante observada pela presença do veneno total de *B. leucurus* corrobora com os resultados obtidos por Lomonte *et al.* (1990). Nesse estudo, os autores observaram que a hemaglutinação provocada pela presença da lectina-C isolada de *Bothrops godmani* ocorreu em todas as amostras, independente do grupo sanguíneo. Os autores atribuíram essa elevada capacidade hemaglutinante ao fato de que os β -galactosídeos são componentes facilmente encontrados em membranas biológicas, o que facilita a ligação específica às lectinas tipo-C presentes na peçonha ofídica.

A análise dos perfis eletroforéticos e cromatográficos das peçonhas de macho e fêmea e comparação desses com os perfis proteicos descritos de outras espécies botrópicas (TASHIMA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012; GONÇALVES-MACHADO *et al.*, 2015; JORGE *et al.*, 2015; GAY *et al.*, 2016; CALVETE, 2017) permitiu associar uma banda proteica de ~15 kDa observada na fração 8 de VB_BleuM e na fração 9 de VB_BleuF à presença de lectinas-C.

A lectina presente no veneno de *Bothrops leucurus* foi isolada por Nunes e colaboradores (2011). Esses autores a caracterizaram como uma lectina tipo-C com massa molecular de 30 kDa, homodimérica, com afinidade à galactose, rafinose e lactose e ação cálcio-dependente. Já foram descritas, para essa proteína, as atividades antibacteriana contra

bactérias gram-positivas e gram-negativas (NUNES *et al.*, 2011) e citotóxica frente a células tumorais K562 (linhagem referente à eritroleucemia) pela externalização da fosfatidilserina (NUNES *et al.*, 2012).

Apesar da ampla distribuição de lectinas tipo-C em peçonhas de diversas espécies de serpentes, a sua participação no envenenamento ainda não foi totalmente elucidada, gerando controvérsias entre pesquisadores. Ogilvie e colaboradores (1986) demonstraram que injeções intramusculares ou subcutâneas de lectinas isoladas em cobaias não causaram reações adversas, enquanto Lomonte *et al.* (1990) e Panunto *et al.* (2006) sugeriram a participação das lectinas na ativação da agregação plaquetária, indução da inflamação e na formação de edema. A inconclusão sobre o papel da lectina no empeçonhamento pode estar relacionada à existência de alguma ação sinérgica ou antagônica desconhecida entre os constituintes da peçonha. Estudos adicionais podem auxiliar no esclarecimento desse mecanismo e, possivelmente, fornecer novas ferramentas que contribuirão para a minimização dos efeitos dos acidentes ofídicos, especialmente o botrópico.

4.3 Atividade oxidante

A análise da atividade oxidante desencadeada por VB_BleuM e VB_BleuF frente à hemoglobina foi realizada através da incubação das peçonhas, em cinco diferentes quantidades, com suspensões de eritrócitos. O cálculo da porcentagem de hemoglobina e metahemoglobina foi realizado com o emprego da equação #2, utilizando os valores obtidos pela leitura espectrofotométrica a 630 e 540nm.

A análise dos resultados indicou que não houve atividade oxidante significativa provocada pela presença dos venenos em estudo (Tabela 06).

Tabela 06 - Porcentagem de formação de metahemoglobina provocada pelo veneno de *B. leucurus* macho e fêmea

	Taxa de oxidação (% de formação de metahemoglobina)					
	C-	0,1µg	1 µg	10 µg	100 µg	1000 µg
VB_BleuM	0,80±0,04	0,77±0,05	0,75±0,03	0,62±0,06	0,63±0,03	0,56±0,06
VB_BleuF	0,80±0,04	0,80±0,03	0,63±0,06	0,70±0,07	0,53±0,09	0,68±0,05

% de formação de metahemoglobina provocada pelo veneno de *B. leucurus* macho (VB_BleuM) e *B. leucurus* fêmea (VB_BleuF) C-: controle. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). **Fonte:** Pesquisa direta, 2015-2017.

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SUZUKI *et al.*, 1997; MORABITO *et al.*, 2012) e aumento nos níveis de metahemoglobina circulante (BARRETO *et al.*, 1990; SHARMA *et al.*, 2015) são partes importantes do conjunto de perturbações fisiológicas causadas pelo ofidismo. O estresse oxidativo pode estar relacionado aos sintomas locais e sistêmicos dos envenenamentos botrópicos, inclusive a falência renal (YAMASAKI *et al.*, 2008). Nesse contexto, Rehan e colaboradores (1986) observaram que a proteinúria (presença de proteínas na urina) decorrente do envenenamento provocado em ratos diminuiu expressivamente após o aumento experimental nos níveis de catalase. Os autores sugerem que os mecanismos antioxidantes de defesa da vítima provavelmente foram insuficientes para reverter o estresse oxidativo provocado. Adicionalmente, a L-aminoácido oxidase (LAAO) presente na peçonha ofídica é uma proteína que tem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como subproduto de sua reação oxidativa, o que tem sido associado a seu papel tóxico no envenenamento ofídico (RODRIGUES *et al.*, 2009). A presença de H_2O_2 foi descrita como um fator que favorece a conversão de hemoglobina em metahemoglobina pela exaustão das vias antioxidantes do eritrócito, que, em condições normais, degradariam o H_2O_2 em H_2O e O_2 (MILLS; RANDALL, 1958).

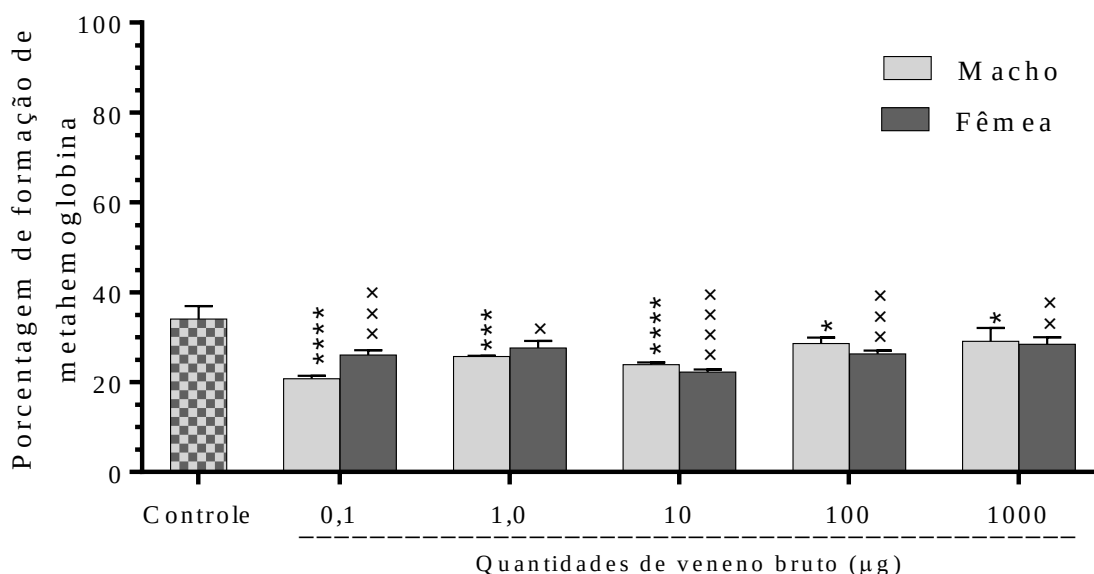
Ao observar o perfil proteico das peçonhas analisadas neste estudo, percebe-se a presença de uma banda eletroforética de ~60 kDa na fração 10 de VB_BleuM e na fração 11 de VB_BleuF, podendo estar associadas à LAAO encontrada na peçonha de *B. leucurus* em estudos anteriores (NAUMANN *et al.*, 2011). As análises proteômicas de peçonhas botrópicas reforçam essa associação, descrevendo a presença das LAAOs nos picos eluídos na região final do cromatograma (TASHIMA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012; GONÇALVES-MACHADO *et al.*, 2015; JORGE *et al.*, 2015; GAY *et al.*, 2016; CALVETE, 2017). Apesar da provável presença da LAAO nas peçonhas em estudo, não foram observados níveis significativos de formação de metahemoglobina, induzida pela presença de VB_BleuM e VB_BleuF nas amostras, com a metodologia utilizada.

4.4 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante frente à hemoglobina na presença de fenilhidrazina e VB_BleuM e VB_BleuF foi realizada em cinco diferentes quantidades (0.1, 1, 10, 100 e 1000 µg). Em todas as amostras avaliadas, os níveis de metHb foram menores em

relação ao controle, indicando uma possível ação protetiva das peçonhas frente à oxidação provocada pela fenilhidrazina (Gráfico 01). A comparação estatística do potencial antioxidante na presença de VB_BleuM e VB_BleuF não apresentou resultados significativos.

Gráfico 01 - Avaliação da atividade antioxidante do veneno bruto de *Bothrops leucurus* macho e fêmea.



Avaliação das taxas de formação de metahemoglobina na presença de VB_BleuM e de VB_BleuF. Os valores relativos à porcentagem de formação de metahemoglobina foram significativamente menores em todas as amostras, em relação ao controle. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) (n=3). $\times$ ou *: valor de $p < 0,01$; $\times\times$ ou **: valor de $p < 0,001$; $\times\times\times$ ou ***: valor de $p < 0,0001$ e $\times\times\times\times$ ou ****: valor de $p < 0,0001$. **Fonte:** pesquisa direta, 2015-2017.

Ao comparar as amostras experimentais com o controle, pode-se afirmar que os venenos brutos de *Bothrops leucurus* macho e fêmea mostraram efeito protetor frente à oxidação provocada pela fenilhidrazina em todas as quantidades, mas de forma acentuada com 0,1 μ g e 10 μ g do veneno da fêmea e de 10 μ g do veneno do macho.

Atualmente, há poucos estudos que avaliam o efeito antioxidante causado pela presença de toxinas animais. Nesse âmbito, há relatos sobre a toxina de algumas espécies de água-viva, das quais já se demonstrou o potencial antioxidante por sua capacidade de redução do DPPH (YU *et al.*, 2006; SUGANTHI *et al.*, 2012).

Em relação aos venenos ofídicos, essa atividade foi descrita poucas vezes e é geralmente associada a um incremento dos mecanismos antioxidantes celulares. Nesse contexto, já foi observado que uma proteína de ~7 kDa isolada a partir do veneno da serpente *Naja naja*, denominada NN-32, foi capaz de aumentar a atividade de marcadores antioxidantes (glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase) em células tumorais (DAS *et al.*,

2011). Além disso, já foi observado que o veneno bruto da serpente *Cerastes cerastes gasperetti* ao ser injetado intraperitonealmente em ratos provocou a diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), quando comparada os níveis de ROS de ratos injetados com solução salina (HAFFOR; AL-SADOON, 2008).

Ao analisar os dados obtidos neste trabalho, pode-se observar que houve uma menor taxa de formação de metahemoglobina nas amostras experimentais, quando comparadas aos controles. Logo, é pertinente inferir que um ou mais componentes da peçonha podem ter interagido com os eritrócitos, potencializando a sua defesa contra a oxidação provocada pela fenilhidrazina, sugerindo a presença de atividade antioxidante nos dois venenos analisados. Entretanto, a metodologia utilizada não permite supor por qual via este fenômeno ocorreu, sendo necessárias investigações adicionais com marcadores específicos, como também estudos envolvendo o isolamento e caracterização de componentes que podem estar relacionados à regulação dos mecanismos antioxidantes celulares.

Geralmente, as pesquisas relacionadas às atividades biológicas de peçonhas ofídicas não avaliam o efeito antioxidante do veneno bruto e/ou dos seus componentes isolados. Os resultados obtidos com a peçonha de *B. leucurus* macho e fêmea constituem um dado inédito importante, sugerindo a presença de constituintes com aplicabilidade biotecnológica, podendo ser testados e empregados na amenização e/ou reversão de mecanismos oxidativos patológicos.

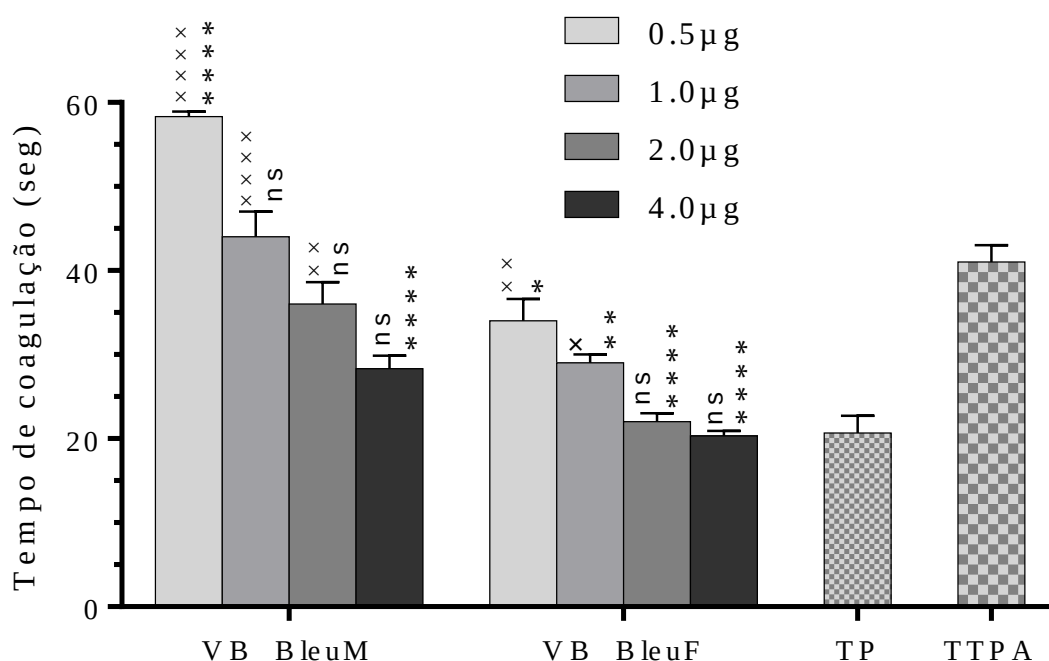
4.5 Atividade coagulante

A avaliação da atividade coagulante do plasma humano citratado na presença dos venenos brutos de *Bothrops leucurus* (macho e fêmea) foi determinada com quatro diferentes quantidades de peçonha (4,0; 2,0; 1,0 e 0,5 µg), mensurando o tempo de formação do coágulo de fibrina após a adição da peçonha. O tempo aferido foi comparado ao tempo de ativação da coagulação pelas vias extrínseca e intrínseca, obtidos pela utilização dos kits comerciais PT e APTT HEMOSTASIS Ref. 501 e 502, respectivamente.

O teste de atividade coagulante do veneno bruto de *Bothrops leucurus* macho e fêmea foi realizado pela incubação com plasma humano citratado, tendo como referências o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), que fornecem parâmetros acerca do tempo de coagulação do plasma a partir das vias extrínseca e intrínseca, respectivamente. A análise dos resultados permite inferir que o tempo de formação do coágulo de fibrina diminui conforme aumenta a quantidade de veneno bruto utilizado, válido tanto para

a peçonha do macho quanto para a da fêmea. O tempo médio de formação do coágulo após a adição do TP no plasma foi de 20 segundos, e de 41 segundos após a adição do TTPA (Gráfico 02).

Gráfico 02: Tempo de coagulação induzido pelas peçonhas de *Bothrops leucurus* macho e fêmea



Avaliação do tempo de coagulação do plasma humano citratado na presença de VB_BleuM e de VB_BleuF. O tempo de formação do coágulo é inversamente proporcional à quantidade de peçonha utilizada. VB_BleuM: Veneno bruto de *Bothrops leucurus* macho VB_BleuF: Veneno bruto de *Bothrops leucurus* fêmea TP: Tempo de Protrombina; TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) (n=3) - ns: valor de $p < 0,05$; $\times$ ou *: valor de $p < 0,01$; $\times \times$ ou **: valor de $p < 0,001$; $\times \times \times$ ou ***: valor de $p < 0,0001$ e $\times \times \times \times$ ou ****: valor de $p < 0,0001$ ($\times$ PT e * APTT). **Fonte:** pesquisa direta, 2015-2017.

A peçonha bruta de *Bothrops leucurus* macho apresentou rápida coagulação sobre o plasma *in vitro*, com tempo médio de formação do coágulo de 58 segundos com a menor quantidade de veneno (0.5 μ g), 44 segundos com 1.0 μ g, 36 segundos com 2.0 μ g e 28 segundos com 4.0 μ g de veneno bruto. O veneno bruto de *Bothrops leucurus* fêmea apresentou um tempo de coagulação ainda menor sobre o plasma *in vitro*, com tempo médio de formação do coágulo de 34 segundos com a menor quantidade de veneno (0.5 μ g), 29 segundos com 1.0 μ g, 22 segundos com 2.0 μ g e 20 segundos com 4.0 μ g de veneno bruto. Cabe destacar que, com a maior quantidade de VB_BleuF, a formação do coágulo de fibrina ocorreu em tempo idêntico à coagulação induzida por TP, sugerindo a ativação de fatores da via extrínseca ou da via comum da cascata de coagulação.

As peçonhas ofídicas podem atuar em qualquer ponto da cascata de coagulação, perturbando a hemostasia em diversos níveis (WHITE, 2005). Hutton e Warrell (1993) descreveram que as peçonhas botrópicas, geralmente, ativam a cascata de coagulação pela via extrínseca. Essa é uma característica considerada vantajosa, pois a coagulação ativada no fim da cascata é mais rápida e pode acarretar na imobilização da presa em um tempo menor (HUTTON; WARRELL, 1993).

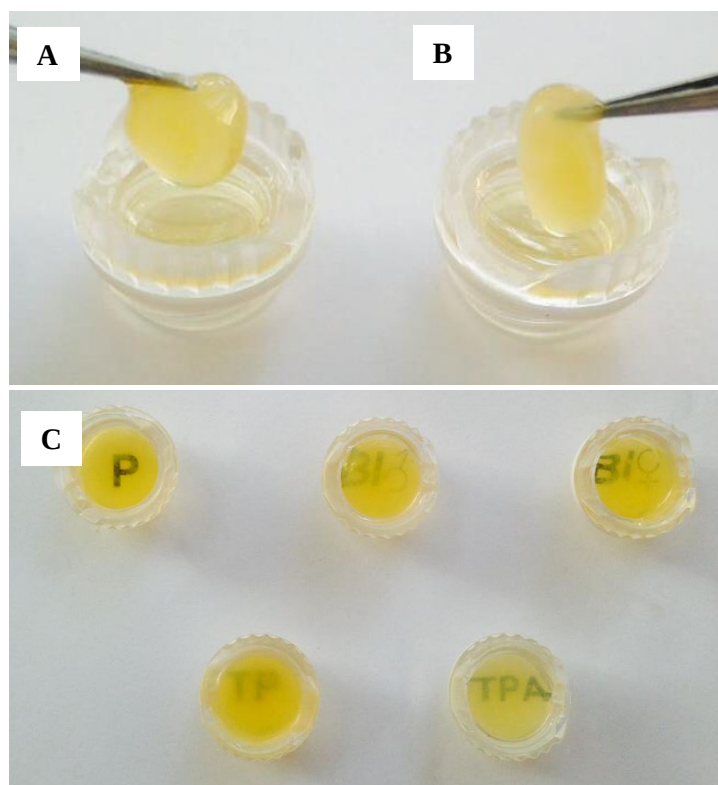
Diversos estudos descreveram componentes do veneno botrópico que interferem na via extrínseca/comum da cascata de coagulação, atuando sobre o fator X, protrombina e fibrinogênio (HOFMAN; BOM, 1987; HUTTON; WARRELL, 1993; MARKLAND, 2003). Geralmente, a ação pró-coagulante causada pelo envenenamento ocorre devido à ação de metaloproteases ou serinoproteases atuantes no fim da cascata (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; SERRANO; MAROUN, 2005; WILSON, 2013).

As SVTLEs, enzimas semelhantes à trombina, constituem uma classe de serinoproteases com atividade fibrinogenolítica sobre as cadeias α e/ou β do fibrinogênio (HUTTON; WARRELL, 1993). Até o momento, no veneno de *B. leucurus*, foram identificadas apenas proteínas com ação sobre o fibrinogênio. Magalhães e colaboradores (2007) isolaram, do veneno de *B. leucurus*, uma serinoprotease denominada leucurolina. Essa enzima foi caracterizada como uma proteína de 30 kDa, com alta atividade fibrinogenolítica sobre a cadeia α do fibrinogênio (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

No perfil eletroforético das frações obtidas por cromatografia de fase reversa de VB_BleuM e VB_BleuF pode-se verificar, na fração 9 de ambos os venenos, proteínas com massa molecular de aproximadamente 30 kDa que podem estar associadas à presença da leucurolina. Além disso, foram detectadas, também, bandas de ~20 kDa (Fr 13 de VB_BleuF), 30 kDa (Fr 10 de VB_BleuM e Fr11 de VB_BleuF e de 60 kDa (Fr 10 de VB_BleuM e Fr 11 de VB_BleuF), que puderam ser relacionadas à presença de metaloproteases descritas como fibrino(geno)líticas como a BleucMP (GOMES *et al.*, 2011), Leucurolisina-A (BELLO *et al.*, 2006; GREMSKI, 2007; WILSON, 2013) e Leucurolisina-B (SANCHEZ *et al.*, 2007; GABRIEL *et al.*, 2012), respectivamente. A presença de serinoproteases e metaloproteases com ação fibrinogenolítica pode estar atrelada à atividade coagulante observada nos experimentos com ambas as peçonhas.

Os coágulos formados pelos dois venenos apresentaram semelhanças quanto à textura, cor e estabilidade, apresentando-se como uma massa uniforme, maleável e turva. O aspecto visual dos coágulos induzidos pelas peçonhas foi semelhante ao dos coágulos formados pela adição dos reagentes dos kits TP e TTPA ao plasma puro. (Figura 15).

Figura 15 - Aspecto dos coágulos formados pela peçonha de *Bothrops leucurus*

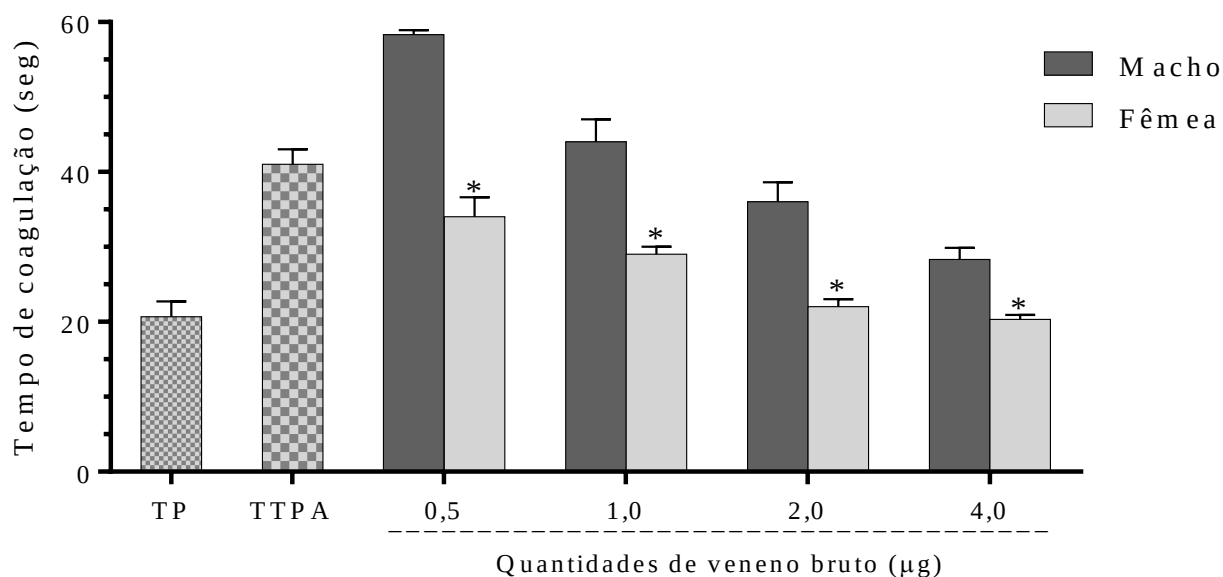


(A) Coágulo formado pela presença da peçonha de *B. leucurus* macho; (B) Coágulo formado pela presença da peçonha de *B. leucurus* fêmea; (C) Comparação da turbidez do plasma puro (P) e dos coágulos formados pela adição de VB_BleuM (Bl♂), VB_BleuF (Bl♀), TP e TTPA. **Fonte:** pesquisa direta, 2015-2017.

Os coágulos formados na presença das peçonhas mostraram-se mais suscetíveis à desintegração do que aqueles que se formaram pela adição do TP e do TTPA ao plasma. Esse dado corrobora com os estudos de caracterização das enzimas fibrinogenolíticas de *B. leucurus*, que descrevem a ocorrência de uma quebra incomum do fibrinogênio nas cadeias α e/ou β e a incapacidade de ativação do fator XIII, gerando um coágulo instável *in vitro* (HUTTON; WARREL, 1993; BELLO *et al*, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2007; SANCHEZ *et al.*, 2007 GOMES *et al.*, 2011).

Ao traçar um comparativo entre o tempo de coagulação induzido pelos venenos de *B. leucurus* macho e fêmea, foi observado que a peçonha da fêmea apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação à do macho, tendo um maior potencial coagulante frente ao plasma humano citratado (Gráfico 03).

Gráfico 03 - Avaliação comparativa da atividade coagulante do veneno bruto (VB) de *Bothrops leucurus* macho e fêmea sobre plasma humano citratado



Análise comparativa do tempo de coagulação do plasma humano citratado na presença de VB_BleuM e de VB_BleuF. * = $p < 0,01$. **Fonte:** pesquisa direta, 2015-2017.

A influência da variação intraespecífica na atividade coagulante do veneno já foi observada anteriormente (FURTADO *et al.*, 1991; LÓPEZ-LOZANO *et al.*, 2011), indicando que o veneno de serpentes jovens provoca a coagulação do plasma em um tempo menor do que o veneno de serpentes adultas, entretanto, apenas o fator ontogenético tem sido considerado na maioria dos estudos comparativos dessa natureza. Com relação à influência do dimorfismo sexual na atividade coagulante da peçonha ofídica, os relatos disponíveis contrastam ao descrever uma maior atividade fibrinogenolítica no veneno da fêmea de *Bothrops jararaca* (MENEZES *et al.*, 2006), indicando uma coagulação plasmática mais rápida, e um menor tempo de coagulação provocado pelo veneno do macho da mesma espécie (FURTADO *et al.*, 2006).

Neste estudo, observamos um maior potencial coagulante do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea frente ao plasma humano citratado. O resultado obtido por Lira-da-Silva (2009) foi semelhante, indicando um maior potencial coagulante no veneno das fêmeas desta espécie sobre o sangue total, apesar de esta propriedade não ter refletido uma maior toxicidade do veneno quando inoculado em cobaias.

Já foi descrito que a variação sexual teve implicações na composição proteica da peçonha da espécie *Bothrops jararaca*. Entretanto, os autores atribuem esta variação ao fato de que a fêmea possui maior tamanho corporal em relação ao macho, refletindo a tendência de se

alimentar de presas maiores. Logo, esta variação pode estar atrelada à especificidade da peçonha para captura de diferentes presas (FURTADO *et al.*, 2006).

Lira-da-Silva (2009), em seu estudo, indicou que não houve variação quanto à dieta e tamanho corporal entre machos e fêmeas de *Bothrops leucurus*, o que leva a crer que as diferenças observadas na presente pesquisa se devem a uma outra razão.

De-Oliveira *et al.* (2016), em estudos venômicos intraespecíficos, indicaram que a expressão modulatória de toxinas pode estar associada à regulação hormonal relacionada ao sexo da serpente, o que pode justificar a diferença entre o potencial coagulante das peçonhas de macho e fêmea de *B. leucurus*. Os fatores relacionados à variação sexual que determinam esta diferença de resultados carecem de estudos adicionais, afim de sanar esta e outras questões relacionadas à variação na composição dos venenos ofídicos.

Nossos resultados indicaram um maior potencial coagulante na peçonha da fêmea de *Bothrops leucurus*, em relação à do macho. Ainda, foi observado que a oxidação da hemoglobina foi significativamente menor nas amostras contendo as peçonhas, sugerindo a presença de atividade antioxidante nas mesmas. Esses dados podem servir de base para outros estudos detalhados das variações intra e interespecíficas das peçonhas ofídicas, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos no envenenamento, dando subsídio ao melhoramento das terapias antiofídicas e possibilitando a prospecção de moléculas com alto potencial biotecnológico.

5 CONCLUSÃO

-O perfil proteico obtido por cromatografia de fase reversa e SDS-PAGE dos venenos de machos e fêmeas de *Bothrops leucurus* foi semelhante;

- Os experimentos para avaliar as atividades hemolítica direta e indireta sobre eritrócitos humanos dos tipos A, B, AB e O, Rh positivo na presença dos venenos de *Bothrops leucurus* machos e fêmeas não apresentaram resultados significativos. Foi observada uma pronunciada hemaglutinação eritrocitária durante a realização de todos os experimentos hemolíticos;

-A avaliação do estresse oxidativo sobre hemoglobinas humanas na presença da peçonha de machos e fêmeas de *Bothrops leucurus* não demonstrou taxas significativas de formação de metahemoglobina, indicando ausência de atividade oxidante;

-Ambos os venenos inibiram a oxidação da hemoglobina à metahemoglobina provocada pela fenilhidrazina, um conhecido agente oxidante.

-Os venenos de machos e fêmeas de *B. leucurus* atuaram na hemostasia secundária de forma dose-dependente. Todas as quantidades avaliadas da peçonha bruta da fêmea induziram a formação do coágulo em um tempo menor, quando comparadas ao tempo de coagulação induzida pela peçonha do macho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBELDA, S. M.; BUCK, C. Integrins and other cell adhesion molecules. **The FASEB journal**, v. 4 n. 11, p. 2868-2880, 1990.
- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic fosfolipase A₂ isolated from the venom of *Bothrops asper* (Viperidae) **Rev. Biol. Trop.**, v. 36, p.263-265, 1988.
- ANTUNES, T. C.; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI, M.; SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon** 56, p. 1443-1458, 2010.
- ANVISA: **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed., v. 2, Brasília p. 1289-1294 2010.
- ARMSTRONG, A. W.; GOLAN, D. E. Farmacologia da Hemostasia e Trombose. In: **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3ª ed. [s.l: s.n.]p. 356–383, 2014.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.
- ASLAN, M.; THRONLEY-BORWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Ann. NY Acad. Sci**, v.17, p.375-390, 2000.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 493-504, 2010.
- BARRETO, O. C. O.; CILLO, D. M.; NONOYAMA, K.; ANTONIO, L .C.; MORENA, P.; CARDOSO, J. L. C. Methemoglobinemia associated with loxocelism. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 1990.
- BARROS, L. C.; FERREIRA JR., R. S.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; STOLF, H. O.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; TOSCANO, E.; BARRAVIERA, B. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **J. Toxicol. Environ. Health B**, v. 12, p. 553-571, 2009.
- BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L. N.; MAGALHÃES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochemie**, v. 88, p. 189-200, 2006.
- BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta médica da Bahia**, v. 81, n. 1, p. 55-63, 2011.
- BINFORD, G. J.; GILLESPIE, R. G.; MADDISON, W. P. Sexual dimorphism in venom chemistry in *Tetragnatha* spider is not easily explained by adult niche differences. **Toxicon** 114, p. 45-52, 2016.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, v. 62, n. 3, p. 325-72, 1994.
- BLOW, D. M. The tortuous story of Asp... His... Ser: Structural analysis of alpha chymotrypsin. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 405-408, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2º ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por serpentes** – Situação epidemiológica. Portal Saúde. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 13 dez 2016.

BOCHNER, R; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação **Cad. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro v. 18, n. 3, p. 735-746, 2002.

BONAVITA, A. G. C.; COSTA, A. S.; PIRES, A. L. A.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; PERALES, J.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 47, p. 885-893, 2006.

BONILLA-PORRAS, A. R.; VARGAS, L. J.; JIMENEZ-DEL-RIO, M.; NUÑEZ, V.; VELEZ-PRADO, C. A new toxin from *Porthidium nasutum* snake venom that specifically induces apoptosis in leukemia cell model through caspase-3 and apoptosis-inducing factor activation. **Toxicon**, v. 12, 2016.

BORGES, R. J.; CARDOSO, F. F.; FERNANDES, C. A. H.; DREYER, T. R.; MORAES, D. S.; FLORIANO, R. S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M. R. M. Functional and structural studies of a Phospholipase A₂-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochimica et biophysica acta** 1861, p. 3199-3209, 2017.

CALTEVE, J. J.; JÚAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J. J.; BORGES, A.; SEGURO, A.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J. G.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to is taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics.**, v.72, p. 227-40, 2009.

CALVETE, J. J. Venomomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochemical Journal**, v. 474, p. 611-634, 2017.

CARDOSO, K. C.; SILVA, M. J.; COSTA, G. G. L.; TORRES, T. T. ; DEL BEM, L. E. V. ; VIDAL, R. O. ; MENOSSI, M. ; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605-627, 2010.

CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake venom *Bothrops jararacussu*. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 44, n. 5, p. 933-938. 1998.

CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary Structure Characterization of *Bothrops jararacussu* Snake Venom Lectin. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21. n. 1, p.43-50, 2002.

CARVALHO, M. Atividades da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e sua neutralização com imunesoros específicos. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em farmacologia. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

CHAVEZ, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon** 30 n. 9, p. 1099-1109, 1992.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. V. Venoms, ativenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n.6, p. 823-84, 1998.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29: p. 1279-1303, 1991.

CHIPPAUX, J. P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases** v. 21, n. 13, p. 1-17, 2015.

ÇIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica chimica acta**, v. 390, p. 1-11, 2008.

CISCOTTO, P. H. C. Purificação e caracterização biológica (estrutural, antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de componentes do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. 2005.

COGO, J.C.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; RODRIGO-SIMIONI, L. Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon** 31: p. 1237-1247, 1993.

CORRÊA, E. A.; KAYANO, A. M.; DINIZ-SOUSA, R.; SETÚBAL, S. S.; ZANCHI, F. B., ZULIANI, J. P.; MATOS, N. B.; ALMEIDA, J. R.; RESENDE, L. M.; MARANGONI, S.; SILVA, S. L.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A. Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi* with bactericidal potential. **Toxicon**, v. 115, p. 13-21, 2016.

CORREIA, J. M. Purificação e caracterização parcial de duas hemorraginas ativadoras de fator X da peçonha de *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco) (Wagler, 1824). **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2006.

COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; FREITAS, M. V.; SILVA, H. S.; ARAÚJO, R. B.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochemie**, v. 92, p. 1760-1765, 2010.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. (org) 2014. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2014. Disponível: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em 17/12/2016.

DALTRY, J.C.; WUSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537-540, 1996.

DAS, T.; BHATTACHARYA, S.; HALDER, B.; BISWAS, A.; GUPTA, S. D.; GOMES, A.; GOMES, A. Cytotoxic and antioxidante property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Erlich ascites carcinoma in BALB/c mice. **Toxicon** 57, p. 1064-1072, 2011.

- DE MARIA, L.; VIND, J.; OXENBOLL, K. M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Phospholipase and their industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, p. 290-300, 2007.
- DE OLIVEIRA, T. C.; AMORIM, H. L. N.; GUIMARÃES, J. A. Interfacial activation of snake venom phospholipases A₂ (svPLA₂) probed by molecular dynamics simulations. **Theochem**, v. 818, p. 31-41, 2007.
- DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev**, v. 111 n.10, p. 6130-6185, 2011.
- DETRAIT, J.; DUGUY, R. Variations de toxicité du venin au cours du cycle annuel chez *Vipera aspis*. **L. Ann. Inst. Pasteur** 111, p. 93-99, 1966.
- DOLEY, R, KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.
- DRICKAMER, K. Increasing diversity of animal lectin structures. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 5, p. 612-616, 1995
- ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of proteomics**, v. 74, p. 1781-1794, 2011.
- FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado). **Toxicon** 30, n. 1, p. 33-40, 1992.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidantes, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases, **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J. Proteomics**, v. 72, p. 200-209, 2009.
- FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. In: Simpósio: Hemostasia e Trombose. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 229-237, 2001.
- FURTADO, M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, p.219-226, 1991.
- FURTADO, M. F. D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (serpentes: viperidae). **Toxicon** 48, p. 401-410, 2006.
- GABRIEL, L. M.; SANCHEZ, E. F.; SILVA, S. G.; SANTOS, R. G. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. **J. Venomous Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 18, p. 24-33, 2012.

GAY, C.; SANZ, L.; CALVETE, J.; PLA, D. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina. **Toxins**, v.8-9, p. 1-13, 2016.

GOMES, M. S. R.; QUEIROZ, M. R.; MAMEDA, C. C. N.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative biochemistry and physiology, Part C**, v. 153, p. 290-300-, 2011.

GONÇALVES-MACHADO, L.; PLA, D.; SANZ, L.; JORGE, R. J. B.; LEITÃO-DE-ARAÚJO, M.; ALVES, M. L. M.; ALVARES, D. J.; MIRANDE, J. D.; NOWATZKI, J.; MORAIS-ZANI, K. S.; FERNANDES, W.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; FERNÁNDEZ, J.; ZINGALI, R. B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORRÊA-NETO, C.; CALVETE, J. J. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of proteomics**, p. 1-17, 2015.

GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SADE, Y. B.; OTUKI, M. F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E. F.; VEIGA, S. S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 120-34, 2007.

GUBENSEK, F.; SKET, D.; TURK, V. & LEBEZ, D. Fractionation of *Vipera ammoytes* venom and seasonal variation of its composition. **Toxicon** 12: 167-171, 1974.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; DUTRA, D. L. S.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B. Cloning, characterization and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, p. 1-11, 2004.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Ann. NY Academy of Sciences**, v. 38, p. 136-147, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M. Compreendendo los venenos de serpientes: 50 Años de investigaciones em América Latina. **Revista de Biología Tropical**, v. 50, n. 2, p. 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. . Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. **Biologicals**, v. 39, n. 3, p. 129-142, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, p. 27-39, 2013.

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

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C. L.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. A new C-type lectin isolated

from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 130-141, 2005.

HERZIG, V.; HODGSON, W, C. Intersexual variations in the pharmacological properties of *Coremiocnemis tropix* (Aranae, Theraphosidae) spider venom. **Toxicon** 53, p. 196-205, 2009.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTTO, J. R.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

HOFMAN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. **Biochemistry**, v. 26, p. 772-780, 1987.

HUBERT, F.; COOPER, E. L.; ROCH, P. Structure and differential target sensitivity of the stimuable cytotoxic complex from hemolymph of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1361, p. 29-41, 1997.

HUTTON, R. A.; WARRELL, D. A. Action of snake venoms components on the haemostatic system. **Blood reviews**, v. 7, p. 176-189, 1993.

IZIDORO, L. F.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med.Chem**, v. 14 n. 20, p.7034-7043, 2006.

IZIDORO, L. F. M.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-19, 2014.

JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M. C.; XIMENES, R. M.; BORGES-NOJOSA, D. M.; LUNA, K. P. O.; ZINGALI, R. B.; CORRÊA-NETO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populatins within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of proteomics**, v. 114, p. 93-114, 2015.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from skane venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J**, v. 278, p. 4544-4576, 2011.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** Aug 15, p. 680-685, 1970.

LEE, W.; GIOTTO, M. T. S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARATT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂ – a

hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v.40, p.28-36, 2001.

LI, M.; FRY, B.G.; KINI, R.M. Eggs-only diet: Its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). **J. Mol. Evol.** v. 60, p.81-89, 2005.

LIRA-DA-SILVA, R.M. *Bothrops leucurus* wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae): Natural history, venom and envenomation. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p-56-65, 2009.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-733, 1989.

LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; RAMÍREZ, G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops Godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon** 28, p. 75-81, 1990.

LÓPEZ-LOZANO, J. L.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; SANCHEZ, E. F.; MUNIZ, E. G.; BÜHRNHEIM, P. F.; MOHRY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon** 40, p. 997-1006, 2002.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica**, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, R. N. F.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp. Biochem. Physiol**, Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 146, n. 4, p. 565-575, 2007.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. And Biophysical Research Commum.** 311, p. 713-720, 2003.

MARANGONI, F. A.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LANDUCCI, E. C. T. Unmasking snake venom of *Bothrops leucurus*: purification and pharmacological and structural characterization of new PLA₂ Bleu TX-III. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminar X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallographica** Section F, p. 882-884, 2005.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; FERNANDES, C. A. H.; AMUI, S. F.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminar X-ray diffraction analysis of a myotoxic Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu* venom complexed with *p*-bromophenacyl bromide. **Acta Crystallographica** Section F, p. 600-603, 2006.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon** 26, p. 1749-1800, 1998.

MARKLAND JUNIOR, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, 2013.

MARTINS, L. J. Estudo da atividade hemolítica induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) *in vitro*. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Estadual de Campinas. 2006.

MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int. J. Biochem**, v. 1, p. 335-342, 1970.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; JACOB-FERREIRA, A. L.; NOGUEIRA-SANTOS, C. G.; CASARE-OGASAWARA, T. M.; PEREIRA-CROTT, L. S.; SAMPAIO, S. V. Effects of *Bothrops atrox* venom and two isolated toxins on the human complement system: Modulation of pathways and generation of anaphylatoxins. **Molecular Immunology** 80, p. 91-100, 2016.

MENEZES, M. C. ; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon** 47, p. 304-312, 2006.

MILLS, G. C.; RANDALL, H. P. Hemoglobin catabolism II. The protection of hemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte. **J. Biol. Chem.** 232, p. 589-598, 1958.

MORABITO, R.; CONDELLO, S.; CURRÒ, M.; MARINO, A.; IENTILE, R.; SPADA, G. L. Oxidative stress induced by crude venom from the jellyfish *Pelagia nocticula* in neuronal-like differentiated SH-SY5Y cells. **Toxicology in vitro** 26, p. 694-699, 2012.

MORAIS, I. C. M.; TORRES, A. F. C.; PEREIRA, G. J. S.; PEREIRA, T. P.; MENEZES, R. R. P. P. B.; MELLO, C. P.; JORGE, A. R. C.; BINDÁ, A. H.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S. A.; SMAILI, S. S.; MARTINS, A. M. C. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38-46, 2013.

MORAIS, V.; BARAIBAR, M.; CARREIRA, S. Intraspecific variation of *Bothrops pubescens* (cope, 1869) venom in Uruguay (serpentes: viperidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.4, p. 604-611, 2006.

MOURA, A. A.; KAYANO, A. M.; OLIVEIRA, G. A.; SETÚBAL, S. S.; RIBEIRO, J. G.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; MOURA, L. A.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; SILVA, S. L.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

NAOUM, P.C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M.S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.26 n.1. p. 19-22, 2004.

NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M. F.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F. F.; EBLE, J. A.; SANCHEZ, E. F. Cytotoxic and inhibition of platelet aggregation caused by the l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta** 1810, p.683-694, 2011.

NUNES, D. C. O.; RODRIGUES, R. S.; LUCENA, M. N.; COLOGNA, C. T.; OLIVEIRA, A. C. S.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; ARANTES, E. C.; TEIXEIRA, D. N. S.; UEIRA-VIEIRA, C.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, vol. 154, n. 3, p. 226-233, 2011.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A. A.; VAZ, A. F. M.; SANTANA, G. M. S.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, R. M. L.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L. V. O.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 159, p. 57-63, 2011.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A. A.; VAZ, A. F. M.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P.; GUARNIERI, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon** 59, p. 667-671, 2012.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; TORRE, P. D. L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 57-78, 2009.

OGILVIE, M. L.; GARTNER, T. K. Identification of Lectins in Snake Venoms. **Journal of Herpetology**, v. 18, n. 3, p. 285-290, 1984.

OGILVIE, M. L.; DOCKTER, M. E.; WENZ, L.; GARTNER, T. K. Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamaicensis*. **J. Biochem.** 100, p. 1425-1431, 1986.

OLIVEIRA, C. S. Caracterização bioquímica e funcional de lectinas tipo C de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em biologia experimental. Universidade Federal de Rondônia, 2015.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H.; YSHI, K.; Purification and characterization of two high molecular mass snake venom metalloproteinases (P-III SVMs), named SV-PAD-2 and HR-Ele-1, from the venom of *Probothrops elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon**, v.20, p. 1-9, 2015.

PAES LEME, A. F.; SHERMAN, N. E.; SMALLEY, D. M.; SIZUKUSA, L. O.; OLIVEIRA, A. K.; MENEZES, M. C.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Hemorrhagic Activity of HF3, a Snake Venom Metalloproteinase: Insights from the Proteomic Analysis of Mouse Skin and Blood Plasma. **J. Prot. Res.**, v. 11, n. 1, p. 279-291, 2012.

PANUNTO, P. C.; SILVA, M. A.; LINARDI, A.; BUZIN, M. P.; MELO, S. E. S. F. C. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 47, p. 21-31, 2006.

PIMENTA, D. C.; PREZOTO, B. C.; KONNO, K.; MELO, R. L.; FURTADO, M. F.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variations among the bradykinin-potentiating peptides. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.** v. 21, p. 1034-1042, 2007.

POLLEGIONI, L.; MOTTA, P.; MOLLA, G. L-amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? **App. Microbiol Biotechnol**, v.97, p. 9323-9341, 2013.

PRIANTI JR, A. C. G.; RIBEIRO, W.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; LIRA-DA-SILVA, R. J.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HOFLING, M. A. C.; LEITE, G. B.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**, v. 41, p. 595-603. 2003.

- RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 142, p. 328-346, 2006.
- RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, p. 305-309, 1997.
- RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical issues**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.
- REHAN, A.; WIGGINS, R. C.; KUNKEL, R. G.; TILL, G. O.; JOHNSON, K. J. Evidence for the role of neutrophil-derived oxygen free radicals. **The American Journal of Pathology**, v. 123, p. 57-66, 1986.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESSE, N.; CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its componentes on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v. 10, n. 2, p.475-489, 1983.
- RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; FRANÇA, B.; FONSECA, F. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; SANTOS, J.I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and funtional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochemie**, v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009.
- RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.P.; DE LA TORRE, P; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v.75, p.2707–2720, 2012.
- SAAD, E. Variação sexual, ontogenética e ambiental do veneno de *Bothrops jararaca* da micro-região de Botucatu-SP: caracterização enzimática, bioquímica e farmacológica. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- SALDARRIAGA, M. M.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; TORO, M. F.; DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon** 42, p. 405–411, 2003.
- SALOMÃO, M. G.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S.; TOUZET, J. M. DNA evolution of South American pitviper genus *Bothrops* (Reptilia: Serpentes: Viperidae). In: THORPE, R.S., WÜSTER, W.; MALHOTRA, A. **Venomous Snakes: Ecology, evolution and snakebite**. Oxford: Clarendon Press, p. 89-98, 1997.
- SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEITO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C. R. Biological activies of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, p. 95-103, 1992.
- SANCHEZ, E. F.; GABRIEL, L .M; GONTIJO, S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S.; EVANGELISTA, K. S.; EBLE, J. A.; RICHARDSON, M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Archives of biochemistry and biophysics** 468, p. 193-204, 2007.
- SANTOS-FILHO, N. A; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C. N.;

- BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.
- SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E. F.; CARLOS, C. P.; BURDMANN, E. A. Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. **Nephron Clin Pract.**, v. 119, n.2, p.131-6, 2011.
- SHARMA, R. D.; KATKAR, G. D.; SUNDARAM, M. S.; PAUL, M.; NAVEENKUMAR, S. K.; SWETHAKUMAR, B.; HEMSHEKHAR, M.; GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: a novel and strategic neutralization by melatonin. **J. Pineal research**, v. 59, p. 240-254, 2015.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.
- SINGH, G.; JASTI, J.; SARAVANAN, K.; SHARMA, S.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of the complex formed between a group I phospholipase A₂ and a naturally occurring fatty acid at 2.7 Å resolution. **Protein Science**, v. 14, p. 395-400, 2005.
- SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. **Journal of veterinary emergency and critical care**, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2009.
- SOUZA, W. Doenças negligenciadas. In: Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, p. 56, 2010.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.** v.57, p.827-872, 1995.
- STÁBELI, R. G.; SANT'ANA, C. D.; RIBEIRO, P. H.; COSTA, T. R.; TICLI, F. K.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; ALBUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N. R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 41, p. 132-140, 2007.
- SUNAGAR, K.; UNDHEIM, E. A. B.; SCHEIB, H.; GREN, E. C. K.; COCHRAN, C.; PERSON, C. E.; KOLUDAROV, I.; KELLN, W.; HAYES, W. K.; KING, G. F.; ANTUNES, A.; FRY, B. G. Intraspecific venom variation in the medically significant southern pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): biodiscovery, clinical and evolutionary implications. **Journal of proteomics**, v. 99, p. 68-83, 2014.
- SUNGANTHI, K.; BRAGADEESWARAN, S.; KUMARAN, N. S.; THENMOZHI, C.; THANGARAJ, S. In vitro antioxidant activities of jelly fish *Chrysaora quinquecirrha* venom from southeast coast of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. 346-351, 2012.
- SUZUKI, K.; NAKAMURA, M.; HATANAKA, Y.; KAYANOKI, Y.; TATSUMI, H.; TANIGUCHI, N. Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: Implication of intracellular reactive oxygen species and protective effects of glutathione and superoxide dismutases. **J. Biochem.** 122, p. 1260-1264, 1997.

TAN, N. H.; FUNG, S. Y. Snake venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2008.

TASHIMA, A. K.; SANZ, L.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonscolombei*. Identification of taxonomy markers. **Journal of proteomics**, v. 71, p. 473-485, 2006.

THE REPTILE DATABASE. Disponível em: <http://reptile-database.reptarium.cz/> Acesso em 11 Fev 2017.

URIBE, J. I. C.; VARGAS, J. M. J.; BATISTA, C. V. F.; ZUÑIGA, F. Z.; POSSANI, L. D. Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. **Toxicon** 125, p. 91-98, 2017.

VARGAS, L. J.; LONDOÑO, M.; QUINTANA, J. C.; RUA, C.; SEGURA, C.; LOMONTE, B.; NÚÑEZ, V. An acidic phospholipase A2 with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 161(B), p. 341-347, 2012.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Ann. Rev. Biochem.** v. 65, p. 441-473, 1996.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon** 45, p. 951-967, 2005.

WHO - World Health Organization. **List of neglected tropical diseases**. 2014. Disponível: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em 15 jan 2017.

WIEZEL, G. A. Caracterização bioquímica e avaliação in vitro da ativação de fibroblastos e do potencial leishmanicida de uma L-aminoácido oxidase (LAAO) da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Toxicologia. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2016.

WILSON, C. Purificação e caracterização parcial de proteínas presentes no veneno de *Bothrops leucurus*. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2013.

WRAY, K. P.; MARGRES, M. J.; SEAVY, M.; ROKYTA, D. R. Early significant ontogenetic changes in snake venoms. **Toxicon** 96, p. 74-81, 2015.

WUCHERER, O. E. H. On the species *Craspedocephalus* which occur in the Provincia of Bahia, Brazil. **Proc. Zool. Ser. London** 27, p. 51- 54. 1863.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; DUCKETT, G. J.; THORPE, R. S. Mitochondrial DNA Phylogeny of the *Bothrops atrox* Species Complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Kaupia**, v. 8 p. 135-144. 1999.

YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; BARONE, J. M.; ZAMBOTTI-VILELA, L.; SILVEIRA, P. F. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon** 52, p. 445-454, 2008.

YU, H.; LIU, X.; XING, R.; LIU, S.; GUO, Z.; WANG, P.; LI, C.; LI, P. In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum*. **Food chemistry** 95, p. 123-130, 2006.

ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; MOREIRA-DILL, L. S.; FERNANDES, C. F. C.; FULY, A. L.; MALTAROLLO, V. G.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, S. L.; ACOSTA, G.; CABALLOL, M. A. O.; OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; ROCHA, M. T.; FURTADO, M. F.; CAMARGO, A. C. M.; HO, P. H.; SERRANO, S. M. T. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals diferente to deal with prey. **Journal of proteome research**, v. 9, p. 2278-2291, 2010.

ZULIANI, J. P.; GUTIERREZ, J. M.; SILVA, L. L. C. E; SAMPAIO, S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. D. F. P.; COCCUZZO, S. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 46, p. 523-532, 2005.

ANEXOS

RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012.

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde em sua 240ª Reunião Ordinária, realizada nos dias 11 e 12 de dezembro de 2012, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, e pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e

Considerando o respeito pela dignidade humana e pela especial proteção devida aos participantes das pesquisas científicas envolvendo seres humanos;

Considerando o desenvolvimento e o engajamento ético, que é inerente ao desenvolvimento científico e tecnológico;

Considerando o progresso da ciência e da tecnologia, que desvendou outra percepção da vida, dos modos de vida, com reflexos não apenas na concepção e no prolongamento da vida humana, como nos hábitos, na cultura, no comportamento do ser humano nos meios reais e virtuais disponíveis e que se alteram e inovam em ritmo acelerado e contínuo;

Considerando o progresso da ciência e da tecnologia, que deve implicar em benefícios, atuais e potenciais para o ser humano, para a comunidade na qual está inserido e para a sociedade, nacional e universal, possibilitando a promoção do bem-estar e da qualidade de vida e promovendo a defesa e preservação do meio ambiente, para as presentes e futuras gerações;

Considerando as questões de ordem ética suscitadas pelo progresso e pelo avanço da ciência e da tecnologia, enraizados em todas as áreas do conhecimento humano;

Considerando que todo o progresso e seu avanço devem, sempre, respeitar a dignidade, a liberdade e a autonomia do ser humano;

Considerando os documentos que constituem os pilares do reconhecimento e da afirmação da dignidade, da liberdade e da autonomia do ser humano, como o Código de Nuremberg, de 1947, e a Declaração Universal dos Direitos Humanos, de 1948;

Considerando os documentos internacionais recentes, reflexo das grandes descobertas científicas e tecnológicas dos séculos XX e XXI, em especial a Declaração de Helsinque, adotada em 1964 e suas versões de 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000; o Pacto Internacional sobre os Direitos Econômicos, Sociais e Culturais, de 1966; o Pacto Internacional sobre os Direitos Civis e Políticos, de 1966; a Declaração Universal sobre o Genoma Humano e os Direitos Humanos, de 1997; a Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos Humanos, de 2003; e a Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos, de 2004;

Considerando a Constituição Federal da República Federativa do Brasil, cujos objetivos e fundamentos da soberania, da cidadania, da dignidade da pessoa humana, dos valores sociais do trabalho e da livre iniciativa e do pluralismo político e os objetivos de construir uma sociedade livre, justa e solidária, de garantir o desenvolvimento nacional, de erradicar a pobreza e a marginalização e reduzir as desigualdades sociais e regionais e de promover o bem de todos, sem qualquer tipo de preconceito, ou de discriminação coadunam-se com os documentos internacionais sobre ética, direitos humanos e desenvolvimento;

Considerando a legislação brasileira correlata e pertinente; e

Considerando o disposto na Resolução nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, que impõe revisões periódicas a ela, conforme necessidades nas áreas tecnocientífica e ética.

R E S O L V E:

Aprovar as seguintes diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos:

I – DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

A presente Resolução incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, referenciais da bioética, tais como, autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade, dentre

outros, e visa a assegurar os direitos e deveres que dizem respeito aos participantes da pesquisa, à comunidade científica e ao Estado.

Projetos de pesquisa envolvendo seres humanos deverão atender a esta Resolução.

II - DOS TERMOS E DEFINIÇÕES

A presente Resolução adota as seguintes definições:

II.1 - achados da pesquisa - fatos ou informações encontrados pelo pesquisador no decorrer da pesquisa e que sejam considerados de relevância para os participantes ou comunidades participantes;

II.2 - assentimento livre e esclarecido - anuência do participante da pesquisa, criança, adolescente ou legalmente incapaz, livre de vícios (simulação, fraude ou erro), dependência, subordinação ou intimidação. Tais participantes devem ser esclarecidos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa lhes acarretar, na medida de sua compreensão e respeitados em suas singularidades;

II.3 - assistência ao participante da pesquisa:

II.3.1 - assistência imediata – é aquela emergencial e sem ônus de qualquer espécie ao participante da pesquisa, em situações em que este dela necessite; e

II.3.2 - assistência integral – é aquela prestada para atender complicações e danos decorrentes, direta ou indiretamente, da pesquisa;

II.4 - benefícios da pesquisa - proveito direto ou indireto, imediato ou posterior, auferido pelo participante e/ou sua comunidade em decorrência de sua participação na pesquisa;

II.5 - consentimento livre e esclarecido - anuência do participante da pesquisa e/ou de seu representante legal, livre de vícios (simulação, fraude ou erro), dependência, subordinação ou intimidação, após esclarecimento completo e pormenorizado sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar;

II.6 - dano associado ou decorrente da pesquisa - agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade, decorrente da pesquisa;

II.7 - indenização - cobertura material para reparação a dano, causado pela pesquisa ao participante da pesquisa;

II.8 - instituição proponente de pesquisa - organização, pública ou privada, legitimamente constituída e habilitada, à qual o pesquisador responsável está vinculado;

II.9 - instituição coparticipante de pesquisa - organização, pública ou privada, legitimamente constituída e habilitada, na qual alguma das fases ou etapas da pesquisa se desenvolve;

II.10 - participante da pesquisa - indivíduo que, de forma esclarecida e voluntária, ou sob o esclarecimento e autorização de seu(s) responsável(is) legal(is), aceita ser pesquisado. A participação deve se dar de forma gratuita, ressalvadas as pesquisas clínicas de Fase I ou de bioequivalência;

II.11 - patrocinador - pessoa física ou jurídica, pública ou privada que apoia a pesquisa, mediante ações de financiamento, infraestrutura, recursos humanos ou apoio institucional;

II.12 - pesquisa - processo formal e sistemático que visa à produção, ao avanço do conhecimento e/ou à obtenção de respostas para problemas mediante emprego de método científico;

II.13 - pesquisa em reprodução humana - pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nesses estudos serão considerados “participantes da pesquisa” todos os que forem afetados pelos procedimentos dela;

II.14 - pesquisa envolvendo seres humanos - pesquisa que, individual ou coletivamente, tenha como participante o ser humano, em sua totalidade ou partes dele, e o envolva de forma direta ou indireta, incluindo o manejo de seus dados, informações ou materiais biológicos;

II.15 - pesquisador - membro da equipe de pesquisa, corresponsável pela integridade e bem-estar dos participantes da pesquisa;

II.16 - pesquisador responsável - pessoa responsável pela coordenação da pesquisa e corresponsável pela integridade e bem-estar dos participantes da pesquisa;

II.17 - protocolo de pesquisa - conjunto de documentos contemplando a descrição da pesquisa em seus aspectos fundamentais e as informações relativas ao participante da pesquisa, à qualificação dos pesquisadores e a todas as instâncias responsáveis;

II.18 - provimento material prévio - compensação material, exclusivamente para despesas de transporte e alimentação do participante e seus acompanhantes, quando necessário, anterior à participação deste na pesquisa;

II.19 - relatório final - é aquele apresentado após o encerramento da pesquisa, totalizando seus resultados;

II.20 - relatório parcial - é aquele apresentado durante a pesquisa demonstrando fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento;

II.21 - ressarcimento - compensação material, exclusivamente de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação;

II.22 - risco da pesquisa - possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente;

II.23 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - documento no qual é explicitado o consentimento livre e esclarecido do participante e/ou de seu responsável legal, de forma escrita, devendo conter todas as informações necessárias, em linguagem clara e objetiva, de fácil entendimento, para o mais completo esclarecimento sobre a pesquisa a qual se propõe participar;

II.24 - Termo de Assentimento - documento elaborado em linguagem acessível para os menores ou para os legalmente incapazes, por meio do qual, após os participantes da pesquisa serem devidamente esclarecidos, explicitarão sua anuência em participar da pesquisa, sem prejuízo do consentimento de seus responsáveis legais; e

II.25 - vulnerabilidade - estado de pessoas ou grupos que, por quaisquer razões ou motivos, tenham a sua capacidade de autodeterminação reduzida ou impedida, ou de qualquer forma estejam impedidos de opor resistência, sobretudo no que se refere ao consentimento livre e esclarecido.

III - DOS ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

As pesquisas envolvendo seres humanos devem atender aos fundamentos éticos e científicos pertinentes.

III.1 - A eticidade da pesquisa implica em:

a) respeito ao participante da pesquisa em sua dignidade e autonomia, reconhecendo sua vulnerabilidade, assegurando sua vontade de contribuir e permanecer, ou não, na pesquisa, por intermédio de manifestação expressa, livre e esclarecida;

b) ponderação entre riscos e benefícios, tanto conhecidos como potenciais, individuais ou coletivos, comprometendo-se com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos;

c) garantia de que danos previsíveis serão evitados; e

d) relevância social da pesquisa, o que garante a igual consideração dos interesses envolvidos, não perdendo o sentido de sua destinação sócio-humanitária.

III.2 - As pesquisas, em qualquer área do conhecimento envolvendo seres humanos, deverão observar as seguintes exigências:

a) ser adequada aos princípios científicos que a justifiquem e com possibilidades concretas de responder a incertezas;

b) estar fundamentada em fatos científicos, experimentação prévia e/ou pressupostos adequados à área específica da pesquisa;

c) ser realizada somente quando o conhecimento que se pretende obter não possa ser obtido por outro meio;

d) buscar sempre que prevaleçam os benefícios esperados sobre os riscos e/ou desconfortos previsíveis;

e) utilizar os métodos adequados para responder às questões estudadas, especificando-os, seja a pesquisa qualitativa, quantitativa ou quali-quantitativa;

f) se houver necessidade de distribuição aleatória dos participantes da pesquisa em grupos experimentais e de controle, assegurar que, *a priori*, não seja possível estabelecer as

vantagens de um procedimento sobre outro, mediante revisão de literatura, métodos observacionais ou métodos que não envolvam seres humanos;

g) obter consentimento livre e esclarecido do participante da pesquisa e/ou seu representante legal, inclusive nos casos das pesquisas que, por sua natureza, impliquem justificadamente, em consentimento *a posteriori*;

h) contar com os recursos humanos e materiais necessários que garantam o bem-estar do participante da pesquisa, devendo o(s) pesquisador(es) possuir(em) capacidade profissional adequada para desenvolver sua função no projeto proposto;

i) prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros;

j) ser desenvolvida preferencialmente em indivíduos com autonomia plena. Indivíduos ou grupos vulneráveis não devem ser participantes de pesquisa quando a informação desejada possa ser obtida por meio de participantes com plena autonomia, a menos que a investigação possa trazer benefícios aos indivíduos ou grupos vulneráveis;

k) respeitar sempre os valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos, como também os hábitos e costumes, quando as pesquisas envolverem comunidades;

l) garantir que as pesquisas em comunidades, sempre que possível, traduzir-se-ão em benefícios cujos efeitos continuem a se fazer sentir após sua conclusão. Quando, no interesse da comunidade, houver benefício real em incentivar ou estimular mudanças de costumes ou comportamentos, o protocolo de pesquisa deve incluir, sempre que possível, disposições para comunicar tal benefício às pessoas e/ou comunidades;

m) comunicar às autoridades competentes, bem como aos órgãos legitimados pelo Controle Social, os resultados e/ou achados da pesquisa, sempre que estes puderem contribuir para a melhoria das condições de vida da coletividade, preservando, porém, a imagem e assegurando que os participantes da pesquisa não sejam estigmatizados;

n) assegurar aos participantes da pesquisa os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa;

o) assegurar aos participantes da pesquisa as condições de acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação, conforme o caso, enquanto necessário, inclusive nas pesquisas de rastreamento;

p) comprovar, nas pesquisas conduzidas no exterior ou com cooperação estrangeira, os compromissos e as vantagens, para os participantes das pesquisas e para o Brasil, decorrentes de sua realização. Nestes casos deve ser identificado o pesquisador e a instituição nacional, responsáveis pela pesquisa no Brasil. Os estudos patrocinados no exterior também deverão responder às necessidades de transferência de conhecimento e tecnologia para a equipe brasileira, quando aplicável e, ainda, no caso do desenvolvimento de novas drogas, se comprovadas sua segurança e eficácia, é obrigatório seu registro no Brasil;

q) utilizar o material e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, ou conforme o consentimento do participante;

r) levar em conta, nas pesquisas realizadas em mulheres em idade fértil ou em mulheres grávidas, a avaliação de riscos e benefícios e as eventuais interferências sobre a fertilidade, a gravidez, o embrião ou o feto, o trabalho de parto, o puerpério, a lactação e o recém-nascido;

s) considerar que as pesquisas em mulheres grávidas devem ser precedidas de pesquisas em mulheres fora do período gestacional, exceto quando a gravidez for o objeto fundamental da pesquisa;

t) garantir, para mulheres que se declarem expressamente isentas de risco de gravidez, quer por não exercerem práticas sexuais ou por as exercerem de forma não reprodutiva, o direito de participarem de pesquisas sem o uso obrigatório de contraceptivos; e

u) ser descontinuada somente após análise e manifestação, por parte do Sistema CEP/CONEP/CNS/MS que a aprovou, das razões dessa descontinuidade, a não ser em casos de justificada urgência em benefício de seus participantes.

III.3 - As pesquisas que utilizam metodologias experimentais na área biomédica, envolvendo seres humanos, além do preconizado no item III.2, deverão ainda:

a) estar fundamentadas na experimentação prévia, realizada em laboratórios, utilizando-se animais ou outros modelos experimentais e comprovação científica, quando pertinente;

b) ter plenamente justificadas, quando for o caso, a utilização de placebo, em termos de não maleficência e de necessidade metodológica, sendo que os benefícios, riscos, dificuldades e efetividade de um novo método terapêutico devem ser testados, comparando-o com os melhores métodos profiláticos, diagnósticos e terapêuticos atuais. Isso não exclui o uso de placebo ou nenhum tratamento em estudos nos quais não existam métodos provados de profilaxia, diagnóstico ou tratamento;

c) utilizar o material biológico e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, ou conforme o consentimento dado pelo participante da pesquisa; e

d) assegurar a todos os participantes ao final do estudo, por parte do patrocinador, acesso gratuito e por tempo indeterminado, aos melhores métodos profiláticos, diagnósticos e terapêuticos que se demonstraram eficazes:

d.1) o acesso também será garantido no intervalo entre o término da participação individual e o final do estudo, podendo, nesse caso, esta garantia ser dada por meio de estudo de extensão, de acordo com análise devidamente justificada do médico assistente do participante.

IV – DO PROCESSO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.

Entende-se por Processo de Consentimento Livre e Esclarecido todas as etapas a serem necessariamente observadas para que o convidado a participar de uma pesquisa possa se manifestar, de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida.

IV.1 - A etapa inicial do Processo de Consentimento Livre e Esclarecido é a do esclarecimento ao convidado a participar da pesquisa, ocasião em que o pesquisador, ou pessoa por ele delegada e sob sua responsabilidade, deverá:

a) buscar o momento, condição e local mais adequados para que o esclarecimento seja efetuado, considerando, para isso, as peculiaridades do convidado a participar da pesquisa e sua privacidade;

b) prestar informações em linguagem clara e acessível, utilizando-se das estratégias mais apropriadas à cultura, faixa etária, condição socioeconômica e autonomia dos convidados a participar da pesquisa; e

c) conceder o tempo adequado para que o convidado a participar da pesquisa possa refletir, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-los na tomada de decisão livre e esclarecida.

IV.2 - Superada a etapa inicial de esclarecimento, o pesquisador responsável, ou pessoa por ele delegada, deverá apresentar, ao convidado para participar da pesquisa, ou a seu representante legal, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que seja lido e compreendido, antes da concessão do seu consentimento livre e esclarecido.

IV.3 - O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá conter, obrigatoriamente:

a) justificativa, os objetivos e os procedimentos que serão utilizados na pesquisa, com o detalhamento dos métodos a serem utilizados, informando a possibilidade de inclusão em grupo controle ou experimental, quando aplicável;

b) explicitação dos possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, além dos benefícios esperados dessa participação e apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, considerando características e contexto do participante da pesquisa;

c) esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa, inclusive considerando benefícios e acompanhamentos posteriores ao encerramento e/ou a interrupção da pesquisa;

d) garantia de plena liberdade ao participante da pesquisa, de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma;

e) garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa;

f) garantia de que o participante da pesquisa receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

g) explicitação da garantia de ressarcimento e como serão cobertas as despesas tidas pelos participantes da pesquisa e dela decorrentes; e

h) explicitação da garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

IV.4 - O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido nas pesquisas que utilizam metodologias experimentais na área biomédica, envolvendo seres humanos, além do previsto no item IV.3 supra, deve observar, obrigatoriamente, o seguinte:

a) explicitar, quando pertinente, os métodos terapêuticos alternativos existentes;

b) esclarecer, quando pertinente, sobre a possibilidade de inclusão do participante em grupo controle ou placebo, explicitando, claramente, o significado dessa possibilidade; e

c) não exigir do participante da pesquisa, sob qualquer argumento, renúncia ao direito à indenização por dano. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido não deve conter ressalva que afaste essa responsabilidade ou que implique ao participante da pesquisa abrir mão de seus direitos, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais.

IV.5 - O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá, ainda:

a) conter declaração do pesquisador responsável que expresse o cumprimento das exigências contidas nos itens IV. 3 e IV.4, este último se pertinente;

b) ser adaptado, pelo pesquisador responsável, nas pesquisas com cooperação estrangeira concebidas em âmbito internacional, às normas éticas e à cultura local, sempre com linguagem clara e acessível a todos e, em especial, aos participantes da pesquisa, tomando o especial cuidado para que seja de fácil leitura e compreensão;

c) ser aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente; e

d) ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local e da CONEP, quando pertinente.

IV.6 - Nos casos de restrição da liberdade ou do esclarecimento necessários para o adequado consentimento, deve-se, também, observar:

a) em pesquisas cujos convidados sejam crianças, adolescentes, pessoas com transtorno ou doença mental ou em situação de substancial diminuição em sua capacidade de decisão, deverá haver justificativa clara de sua escolha, especificada no protocolo e aprovada pelo CEP, e pela CONEP, quando pertinente. Nestes casos deverão ser cumpridas as etapas do esclarecimento e do consentimento livre e esclarecido, por meio dos representantes legais dos convidados a participar da pesquisa, preservado o direito de informação destes, no limite de sua capacidade;

b) a liberdade do consentimento deverá ser particularmente garantida para aqueles participantes de pesquisa que, embora plenamente capazes, estejam expostos a condicionamentos específicos, ou à influência de autoridade, caracterizando situações passíveis de limitação da autonomia, como estudantes, militares, empregados, presidiários e internos em centros de readaptação, em casas-abrigo, asilos, associações religiosas e semelhantes, assegurando-lhes inteira liberdade de participar, ou não, da pesquisa, sem quaisquer represálias;

c) as pesquisas em pessoas com o diagnóstico de morte encefálica deverão atender aos seguintes requisitos:

c.1) documento comprobatório da morte encefálica;

c.2) consentimento explícito, diretiva antecipada da vontade da pessoa, ou consentimento dos familiares e/ou do representante legal;

c.3) respeito à dignidade do ser humano;

c.4) inexistência de ônus econômico-financeiro adicional à família;

c.5) inexistência de prejuízo para outros pacientes aguardando internação ou tratamento;
e

c.6) possibilidade de obter conhecimento científico relevante, ou novo, que não possa ser obtido de outra maneira;

d) que haja um canal de comunicação oficial do governo, que esclareça as dúvidas de forma acessível aos envolvidos nos projetos de pesquisa, igualmente, para os casos de diagnóstico com morte encefálica; e

e) em comunidades cuja cultura grupal reconheça a autoridade do líder ou do coletivo sobre o indivíduo, a obtenção da autorização para a pesquisa deve respeitar tal particularidade, sem prejuízo do consentimento individual, quando possível e desejável. Quando a legislação brasileira dispuser sobre competência de órgãos governamentais, a exemplo da Fundação Nacional do Índio – FUNAI, no caso de comunidades indígenas, na tutela de tais comunidades, tais instâncias devem autorizar a pesquisa antecipadamente.

IV.7 - Na pesquisa que dependa de restrição de informações aos seus participantes, tal fato deverá ser devidamente explicitado e justificado pelo pesquisador responsável ao Sistema CEP/CONEP. Os dados obtidos a partir dos participantes da pesquisa não poderão ser usados para outros fins além dos previstos no protocolo e/ou no consentimento livre e esclarecido.

IV.8 - Nos casos em que seja inviável a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou que esta obtenção signifique riscos substanciais à privacidade e confidencialidade dos dados do participante ou aos vínculos de confiança entre pesquisador e pesquisado, a dispensa do TCLE deve ser justificadamente solicitada pelo pesquisador responsável ao Sistema CEP/CONEP, para apreciação, sem prejuízo do posterior processo de esclarecimento.

V – DOS RISCOS E BENEFÍCIOS

Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Quanto maiores e mais evidentes os riscos, maiores devem ser os cuidados para minimizá-los e a proteção oferecida pelo Sistema CEP/CONEP aos participantes. Devem ser analisadas possibilidades de danos imediatos ou posteriores, no plano individual ou coletivo. A análise de risco é componente imprescindível à análise ética, dela decorrendo o plano de monitoramento que deve ser oferecido pelo Sistema CEP/CONEP em cada caso específico.

V.1 - As pesquisas envolvendo seres humanos serão admissíveis quando:

a) o risco se justifique pelo benefício esperado; e

b) no caso de pesquisas experimentais da área da saúde, o benefício seja maior, ou, no mínimo, igual às alternativas já estabelecidas para a prevenção, o diagnóstico e o tratamento.

V.2 - São admissíveis pesquisas cujos benefícios a seus participantes forem exclusivamente indiretos, desde que consideradas as dimensões física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual desses.

V.3 - O pesquisador responsável, ao perceber qualquer risco ou dano significativos ao participante da pesquisa, previstos, ou não, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, deve comunicar o fato, imediatamente, ao Sistema CEP/CONEP, e avaliar, em caráter emergencial, a necessidade de adequar ou suspender o estudo.

V.4 - Nas pesquisas na área da saúde, tão logo constatada a superioridade significativa de uma intervenção sobre outra(s) comparativa(s), o pesquisador deverá avaliar a necessidade de adequar ou suspender o estudo em curso, visando oferecer a todos os benefícios do melhor regime.

V.5 - O Sistema CEP/CONEP deverá ser informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal dos estudos por ele aprovados e, especificamente, nas pesquisas na área da saúde, dos efeitos adversos e da superioridade significativa de uma intervenção sobre outra ou outras comparativas.

V.6 - O pesquisador, o patrocinador e as instituições e/ou organizações envolvidas nas diferentes fases da pesquisa devem proporcionar assistência imediata, nos termos do item II.3, bem como responsabilizarem-se pela assistência integral aos participantes da pesquisa no que se refere às complicações e danos decorrentes da pesquisa.

V.7 - Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa.

VI – DO PROTOCOLO DE PESQUISA

O protocolo a ser submetido à revisão ética somente será apreciado se for apresentada toda documentação solicitada pelo Sistema CEP/CONEP, considerada a natureza e as especificidades de cada pesquisa. A Plataforma BRASIL é o sistema oficial de lançamento de pesquisas para análise e monitoramento do Sistema CEP/CONEP.

VII – DO SISTEMA CEP/CONEP

É integrado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/CNS/MS do Conselho Nacional de Saúde e pelos Comitês de Ética em Pesquisa – CEP - compondo um sistema que utiliza mecanismos, ferramentas e instrumentos próprios de inter-relação, num trabalho cooperativo que visa, especialmente, à proteção dos participantes de pesquisa do Brasil, de forma coordenada e descentralizada por meio de um processo de acreditação.

VII.1 - Pesquisas envolvendo seres humanos devem ser submetidas à apreciação do Sistema CEP/CONEP, que, ao analisar e decidir, se torna corresponsável por garantir a proteção dos participantes.

VII.2 - Os CEP são colegiados interdisciplinares e independentes, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criados para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos:

VII.2.1 - as instituições e/ou organizações nas quais se realizem pesquisas envolvendo seres humanos podem constituir um ou mais de um Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, conforme suas necessidades e atendendo aos critérios normativos; e

VII.2.2 - na inexistência de um CEP na instituição proponente ou em caso de pesquisador sem vínculo institucional, caberá à CONEP a indicação de um CEP para proceder à análise da pesquisa dentre aqueles que apresentem melhores condições para monitorá-la.

VII.3 - A CONEP é uma instância colegiada, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa e independente, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde/MS.

VII.4 - A revisão ética dos projetos de pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser associada à sua análise científica.

VII.5 - Os membros integrantes do Sistema CEP/CONEP deverão ter, no exercício de suas funções, total independência na tomada das decisões, mantendo em caráter estritamente confidencial, as informações conhecidas. Desse modo, não podem sofrer qualquer tipo de pressão por parte de superiores hierárquicos ou pelos interessados em determinada pesquisa. Devem isentar-se da tomada de decisões quando envolvidos na pesquisa em análise.

VII.6 - Os membros dos CEP e da CONEP não poderão ser remunerados no desempenho de sua tarefa, podendo, apenas, receber ressarcimento de despesas efetuadas com transporte, hospedagem e alimentação, sendo imprescindível que sejam dispensados, nos horários de seu trabalho nos CEP, ou na CONEP, de outras obrigações nas instituições e/ou organizações às quais prestam serviço, dado o caráter de relevância pública da função.

VIII – DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

ATRIBUIÇÕES:

VIII.1 - avaliar protocolos de pesquisa envolvendo seres humanos, com prioridade nos temas de relevância pública e de interesse estratégico da agenda de prioridades do SUS, com base nos indicadores epidemiológicos, emitindo parecer, devidamente justificado, sempre orientado, dentre outros, pelos princípios da impessoalidade, transparência, razoabilidade, proporcionalidade e eficiência, dentro dos prazos estabelecidos em norma operacional, evitando redundâncias que resultem em morosidade na análise;

VIII.2 - desempenhar papel consultivo e educativo em questões de ética; e

VIII.3 - elaborar seu Regimento Interno.

IX – DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA (CONEP)

ATRIBUIÇÕES:

IX.1 - examinar os aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos, como também a adequação e atualização das normas atinentes, podendo, para tanto, consultar a sociedade, sempre que julgar necessário;

IX.2 - estimular a participação popular nas iniciativas de Controle Social das Pesquisas com Seres Humanos, além da criação de CEP institucionais e de outras instâncias, sempre que tal criação possa significar o fortalecimento da proteção de participantes de pesquisa no Brasil;

IX.3 - registrar e supervisionar o funcionamento e cancelar o registro dos CEP que compõem o Sistema CEP/CONEP;

IX.4 - analisar os protocolos de pesquisa envolvendo seres humanos, emitindo parecer, devidamente justificado, sempre orientado, dentre outros, pelos princípios da impessoalidade, transparência, razoabilidade, proporcionalidade e eficiência, dentro dos prazos estabelecidos em norma operacional, evitando redundâncias que resultem em morosidade na análise;

1. genética humana, quando o projeto envolver:

1.1. envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;

1.2. armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;

1.3. alterações da estrutura genética de células humanas para utilização *in vivo*;

1.4. pesquisas na área da genética da reprodução humana (reprogenética);

1.5. pesquisas em genética do comportamento; e

1.6. pesquisas nas quais esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes de pesquisa;

2. reprodução humana: pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados “participantes da pesquisa” todos os que forem afetados pelos procedimentos delas. Caberá análise da CONEP quando o projeto envolver:

2.1. reprodução assistida;

2.2. manipulação de gametas, pré-embriões, embriões e feto; e

2.3. medicina fetal, quando envolver procedimentos invasivos;

3. equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

4. novos procedimentos terapêuticos invasivos;

5. estudos com populações indígenas;

6. projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

7. protocolos de constituição e funcionamento de biobancos para fins de pesquisa;

8. pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro; e

9. projetos que, a critério do CEP e devidamente justificados, sejam julgados merecedores de análise pela CONEP;

IX.5 - fortalecer a participação dos CEP por meio de um processo contínuo de capacitação, qualificação e acreditação;

IX.6 - coordenar o processo de acreditação dos CEP, credenciando-os de acordo com níveis de competência que lhes possibilitem ser delegadas responsabilidades originárias da CONEP;

IX.7 - analisar e monitorar, direta ou indiretamente, no prazo estipulado em normativa, os protocolos de pesquisa que envolvam necessidade de maior proteção em relação aos seus participantes, em especial os riscos envolvidos. Deve, nesse escopo, ser considerado sempre em primeiro plano o indivíduo e, de forma associada, os interesses nacionais no desenvolvimento científico e tecnológico, como base para determinação da relevância e oportunidade na realização dessas pesquisas;

IX.8 - analisar e monitorar, direta ou indiretamente, protocolos de pesquisas com conflitos de interesse que dificultem ou inviabilizem a justa análise local;

IX.9 - analisar, justificadamente, qualquer protocolo do Sistema CEP/CONEP, sempre que considere pertinente; e

IX.10 - analisar, em caráter de urgência e com tramitação especial, protocolos de pesquisa que sejam de relevante interesse público, tais como os protocolos que contribuam para a saúde pública, a justiça e a redução das desigualdades sociais e das dependências tecnológicas, mediante solicitação do Ministério da Saúde, ou de outro órgão da Administração Pública, ou ainda a critério da Plenária da CONEP/CNS.

X - DO PROCEDIMENTO DE ANÁLISE ÉTICA

X.1 - DA ANÁLISE ÉTICA DOS CEP

DAS COMPETÊNCIAS:

1. compete ao CEP, após análise, emitir parecer devidamente motivado, no qual se apresente de forma clara, objetiva e detalhada, a decisão do colegiado, em prazo estipulado em norma operacional;

2. encaminhar, após análise fundamentada, os protocolos de competência da CONEP, observando de forma cuidadosa toda a documentação que deve acompanhar esse encaminhamento, conforme norma operacional vigente, incluindo a comprovação detalhada de custos e fontes de financiamento necessários para a pesquisa;

3. incumbe, também, aos CEP:

a) manter a guarda confidencial de todos os dados obtidos na execução de sua tarefa e arquivamento do protocolo completo;

b) acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa;

c) o CEP deverá manter em arquivo o projeto, o protocolo e os relatórios correspondentes, por um período de 5 anos após o encerramento do estudo, podendo esse arquivamento processar-se em meio digital;

d) receber denúncias de abusos ou notificação sobre fatos adversos que possam alterar o curso normal do estudo, decidindo pela continuidade, modificação ou suspensão da pesquisa, devendo, se necessário, solicitar a adequação do Termo de Consentimento;

e) requerer a instauração de apuração à direção da instituição e/ou organização, ou ao órgão público competente, em caso de conhecimento ou de denúncias de irregularidades nas pesquisas envolvendo seres humanos e, havendo comprovação, ou se pertinente, comunicar o fato à CONEP e, no que couber, a outras instâncias; e

f) manter comunicação regular e permanente com a CONEP, por meio de sua Secretaria Executiva.

X.2 - DO PROCEDIMENTO DE ANÁLISE ÉTICA DA CONEP:

1. compete à CONEP, dentro do prazo a ser estipulado em Norma Operacional, emitir parecer devidamente motivado, com análise clara, objetiva e detalhada de todos os elementos e documentos do projeto;

2. compete, também, à CONEP, o monitoramento, direto ou indireto, dos protocolos de pesquisa de sua competência; e

3. aplica-se à CONEP, nas hipóteses em que funciona como CEP, as disposições sobre Procedimentos de Análise Ética dos CEP.

X.3 - DAS DISPOSIÇÕES COMUNS AOS CEP E À CONEP:

1. os membros do CEP/CONEP deverão isentar-se da análise e discussão do caso, assim como da tomada de decisão, quando envolvidos na pesquisa;

2. os CEP e a CONEP poderão contar com consultores *ad hoc*, pessoas pertencentes, ou não, à instituição/organização, com a finalidade de fornecer subsídios técnicos;

3. pesquisa que não se faça acompanhar do respectivo protocolo não deve ser analisada;

4. considera-se antiética a pesquisa aprovada que for descontinuada pelo pesquisador responsável, sem justificativa previamente aceita pelo CEP ou pela CONEP;

5. a revisão do CEP culminará em seu enquadramento em uma das seguintes categorias:

a) aprovado;

b) pendente: quando o CEP considera necessária a correção do protocolo apresentado, e solicita revisão específica, modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em prazo estipulado em norma operacional; e

c) não aprovado;

6. o CEP poderá, se entender oportuno e conveniente, no curso da revisão ética, solicitar informações, documentos e outros, necessários ao perfeito esclarecimento das questões, ficando suspenso o procedimento até a vinda dos elementos solicitados;

7. das decisões de não aprovação caberá recurso ao próprio CEP e/ou à CONEP, no prazo de 30 dias, sempre que algum fato novo for apresentado para fundamentar a necessidade de uma reanálise;

8. os CEP e a CONEP deverão determinar o arquivamento do protocolo de pesquisa nos casos em que o pesquisador responsável não atender, no prazo assinalado, às solicitações que lhe foram feitas. Poderão ainda considerar o protocolo retirado, quando solicitado pelo pesquisador responsável;

9. uma vez aprovado o projeto, o CEP, ou a CONEP, nas hipóteses em que atua como CEP ou no exercício de sua competência originária, passa a ser corresponsável no que se refere aos aspectos éticos da pesquisa; e

10. consideram-se autorizados para execução os projetos aprovados pelos CEP, ou pela CONEP, nas hipóteses em que atua originariamente como CEP ou no exercício de suas competências.

XI – DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;

b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

c) desenvolver o projeto conforme delineado;

d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;

f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e

h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

XII - OUTRAS DISPOSIÇÕES

XII.1 - Cada área temática de investigação e cada modalidade de pesquisa, além de respeitar os dispositivos desta Resolução, deve cumprir as exigências setoriais e regulamentações específicas.

XII.2 - As agências de fomento à pesquisa e o corpo editorial das revistas científicas deverão exigir documentação comprobatória de aprovação do projeto pelo Sistema CEP/CONEP.

XII.3 - A presente Resolução, por sua própria natureza, demanda revisões periódicas, conforme necessidades das áreas ética, científica e tecnológica.

XIII - DAS RESOLUÇÕES E DAS NORMAS ESPECÍFICAS

XIII.1 - O procedimento de avaliação dos protocolos de pesquisa, bem como os aspectos específicos do registro, como concessão, renovação ou cancelamento e, também, da acreditação de Comitês de Ética em Pesquisa serão regulamentados por Resolução do Conselho Nacional de Saúde.

XIII.2 - O processo de acreditação dos Comitês de Ética em Pesquisa que compõem o Sistema CEP/CONEP será tratado em Resolução do CNS.

XIII.3 - As especificidades éticas das pesquisas nas ciências sociais e humanas e de outras que se utilizam de metodologias próprias dessas áreas serão contempladas em resolução complementar, dadas suas particularidades.

XIII.4 - As especificidades éticas das pesquisas de interesse estratégico para o SUS serão contempladas em Resolução complementar específica.

XIII.5 - Os aspectos procedimentais e administrativos do Sistema CEP/CONEP serão tratados em Norma Operacional do CNS.

XIII.6 - A tipificação e gradação do risco nas diferentes metodologias de pesquisa serão definidas em norma própria, pelo Conselho Nacional de Saúde.

XIV – DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

Ficam revogadas as Resoluções CNS Nºs 196/96, 303/2000 e 404/2008.

Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA
Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS Nº 466, de 12 de dezembro de 2012, nos termos do Decreto de Delegação de Competência de 12 de novembro de 1991.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA
Ministro de Estado da Saúde



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS TOXINOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS
COMPARATIVOS ENTRE OS VENENOS BRUTOS DE Bothrops leucurus MACHO E

Pesquisador: Diana Pontes da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60981316.6.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.848.748

Apresentação do Projeto:

O presente projeto de mestrado de caráter prospectivo e experimental, apresentado em sua segunda versão aborda a importância do estudo toxinológico da peçonha da serpente Bothrops leucurus machos e fêmeas e o impacto da interação desse veneno sobre os marcadores hematológicos. serão observados os efeitos hemolítico, anti-hemolítico,

oxidante, antioxidante e coagulante do veneno bruto da serpente Bothrops leucurus macho e fêmea sobre eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B, O e AB e sobre o plasma humano citratado. Com isso, pretende-se auxiliar no conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos no acidente ofídico, considerando as possíveis diferenças decorrentes das variações sexuais dentro da espécie. Pretende-se, também, correlacionar os efeitos observados ao perfil protéico da peçonha através da realização de eletroforese e cromatografia específicas. Assim, será possível também fazer uma prospecção preliminar de componentes com possível potencial terapêutico.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores destacam como objetivo primário do projeto:

- Avaliar efeitos bioquímicos, tóxicos e farmacológicos de um pool veneno bruto extraído de serpentes brasileiras de Bothrops leucurus, bem como correlacionar com os efeitos biológicos

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAOPESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br



Continuação do Parecer: 1.848.748

desencadeados por este veneno na tentativa de melhor compreender os possíveis mecanismos de ação destes compostos químicos.

Como objetivo secundário:

- Avaliar a composição molecular do veneno de *Bothrops leucurus* por fracionamento e caracterização da massa molecular;
- Realizar experimentos para avaliar as atividades citotóxicas através da ação hemolítica e sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O na presença do veneno bruto extraídos de *Bothrops leucurus*;
- Correlacionar a composição molecular e a espécie da serpente com os efeitos tóxicos desencadeados por cada amostra de veneno em análise;
- Quantificar os efeitos oxidante e antioxidante do veneno bruto de *B. leucurus* sobre eritrócitos humanos;
- Determinar os efeitos coagulante e anticoagulante do veneno bruto de *B. leucurus* sobre plasma citratado humano;
- Correlacionar a composição molecular com os efeitos bioquímicos desencadeados pelo veneno em estudo;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores destacam como risco inerente a pesquisa:

- O participante (doador da amostra) poderá apresentar algum mal-estar transitório decorrente da coleta de sangue, neste caso, o participante será encaminhado pelos pesquisadores a uma unidade de pronto atendimento (UPA), que conta com serviço de Urgência e Emergência.

- Como benefício é destacado:

Dar subsídio ao desenvolvimento de um soro antiofídico mais eficaz, com ação neutralizante dos efeitos locais dos acidente ofídicos. Pretende-se, também, sugerir moléculas promissoras do ponto de vista farmacológico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa destaca que o pool de veneno bruto liofilizado de *B. leucurus* macho e fêmea, será cedido pelo laboratório de Toxinas Animais da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, PB, Brasil. Os eritrócitos humanos serão cedidos pela Agência Transfusional do HULW-UFPB. Serão doadas bolsas que seriam encaminhadas para descarte. Para obtenção do plasma, serão alocados cinco voluntários escolhidos aleatoriamente, que serão encaminhados ao Cpr-Lab/UFPB para a coleta, em que um dos braços será preparado para a punção venosa para a retirada de 10ml de sangue

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAOPESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br



Continuação do Parecer: 1.848.748

venoso em procedimento realizado por profissional competente. O armazenamento e a utilização do material biológico serão realizados de acordo com a resolução CNS Nº 441 de 12 de maio de 2011.

Após isso, será feita a correlação entre a composição proteica do veneno bruto e os efeitos tóxicos, bioquímicos e farmacológicos desencadeados por este veneno. Estudos estruturais complementares “in silico” poderão ser realizados com programas computacionais e servidores específicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisa destaca que o pool de veneno bruto liofilizado de *B. leucurus* macho e fêmea, será cedido pelo laboratório de Toxinas Animais da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, PB, Brasil. Os eritrócitos humanos serão cedidos pela Agência Transfusional do HULW-UFPB. Serão doadas bolsas que seriam encaminhadas para descarte. Para obtenção do plasma, serão alocados cinco voluntários escolhidos aleatoriamente, que serão encaminhados ao Cpr-Lab/UFPB para a coleta, em que um dos braços será preparado para a punção venosa para a retirada de 10ml de sangue venoso em procedimento realizado por profissional competente. O armazenamento e a utilização do material biológico serão realizados de acordo com a resolução CNS Nº 441 de 12 de maio de 2011.

Após isso, será feita a correlação entre a composição proteica do veneno bruto e os efeitos tóxicos, bioquímicos e farmacológicos desencadeados por este veneno. Estudos estruturais complementares “in silico” poderão ser realizados com programas computacionais e servidores

Recomendações:

Recomenda-se que o pesquisador responsável e demais colaboradores, CUMPRAM, EM TODAS AS FASES DO ESTUDO, A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW. 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 pesquisador 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, somos

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAOPESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br



Continuação do Parecer: 1.848.748

favoráveis ao desenvolvimento da investigação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em Reunião Ordinária realizada no dia 29 de novembro de 2016.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

. O participante da pesquisa deverá receber uma via do Termo de Consentimento na íntegra, com assinaturas do pesquisador responsável e do participante e/ou do responsável legal. O pesquisador deverá manter em sua guarda uma via do TCLE assinado pelo participante por cinco anos.

. Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e apor assinatura na última folha.

. O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer dano ou prejuízo à assistência que esteja recebendo.

. O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/HULW de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

. Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos.

O pesquisador deverá apresentar Relatório parcial no curso do estudo, e Relatório final em no máximo 30 dias após o seu término ao CEP/HULW, via Plataforma Brasil, para emissão da Certidão Definitiva por este CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	08/11/2016		Aceito

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAOPESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.848.748

Básicas do Projeto	ETO_805054.pdf	17:35:49		Aceito
Outros	Carta_resposta_HULW.pdf	08/11/2016 17:34:49	Diana Pontes da Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	08/11/2016 17:33:03	Diana Pontes da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoFinal_modificado.docx	08/11/2016 17:32:31	Diana Pontes da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso2.JPG	13/10/2016 14:59:17	Diana Pontes da Silva	Aceito
Outros	Certidao.pdf	13/10/2016 14:48:08	Diana Pontes da Silva	Aceito
Outros	FICHADECADASTRO.pdf	13/10/2016 14:40:19	Diana Pontes da Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	13/10/2016 14:38:36	Diana Pontes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia.pdf	13/10/2016 14:37:10	Diana Pontes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	13/10/2016 14:32:13	Diana Pontes da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	13/10/2016 14:30:53	Diana Pontes da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 04 de Dezembro de 2016

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador)

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br

