



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



**OTACÍLIO BENÍCIO DA PAIXÃO JÚNIOR**

**ESTUDOS COMPARATIVOS DA COMPOSIÇÃO PROTEICA E DOS  
EFEITOS CITOTÓXICO, OXIDANTE, ANTIOXIDANTE E COAGULANTE  
CAUSADOS PELAS PEÇONHAS BRUTAS DE *Bothrops jararacussu* E  
*Bothrops moojeni***

**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



**OTACÍLIO BENÍCIO DA PAIXÃO JÚNIOR**

**ESTUDOS COMPARATIVOS DA COMPOSIÇÃO PROTEICA E DOS EFEITOS  
CITOTÓXICO, OXIDANTE, ANTIOXIDANTE E COAGULANTE CAUSADOS  
PELAS PEÇONHAS BRUTAS DE *Bothrops jararacussu* E *Bothrops moojeni***

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

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Hilzeth de Luna Freire Pessôa

JOÃO PESSOA - PB  
2017

P149e Paixão Júnior, Otacílio Benício da.  
Estudos comparativos da composição proteica e dos efeitos citotóxico, oxidante, antioxidante e coagulante causados pelas peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* / Otacílio Benício da Paixão Júnior. - João Pessoa, 2017.

85 f.: il. -

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

1. Serpentes. 2. Ofidismo. 3. Lise eritrocitária. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 598.115(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



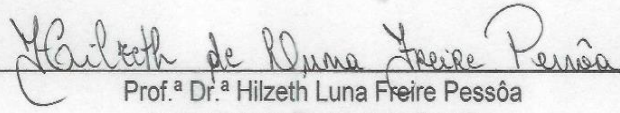
## OTACÍLIO BENÍCIO DA PAIXÃO JÚNIOR

Dissertação de Mestrado avaliada em 25/04/2017

### BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Priscila Marchi Salvador

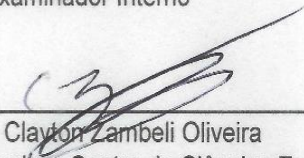
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hilzeth Luna Freire Pessoa

Universidade Federal da Paraíba  
Coorientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cláudio Roberto Bezerra dos Santos

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Interno

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Clayton Zambeli Oliveira

Departamento de Biologia Molecular - Centro de Ciências Exatas e da Natureza  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Externo

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PGBCM), pela oportunidade de realização deste mestrado.

A orientadora, Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador, por sua disposição e contribuição imprescindível para realização deste trabalho, e pelos ensinamentos transmitidos.

A professora doutora Hilzeth Luna Freire Pessoa pela coorientação.

Aos professores, funcionários e colegas do PPGBCM/UEPB pela convivência e aprendizado ao decorrer do mestrado.

Aos meus familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste curso.

À Professora Paula Helena Santa Rita e ao Breno Emanuel Farias Frihling da Universidade Católica Dom Bosco-UCDB em Campo Grande, e a Renner de Souza Leite da Universidade Federal de Campina Grande, por disponibilizarem as peçonhas para o estudo.

Ao Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador do Departamento de Física e Biofísica da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu pela disponibilidade e auxílio.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu, por disponibilizar seu material e espaço físico para uma parte dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa que proporcionou suporte financeiro durante o período do curso.

## RESUMO

Acidente ofídico ou ofidismo é o quadro de envenenamento decorrente da inoculação de toxinas através do aparelho inoculador de serpentes. O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar, *in vitro*, os efeitos citotóxico, oxidativo e na homeostase (sobre eritrócitos, hemoglobinas e plasma humano, respectivamente), causados pela presença das peçonhas brutas das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*. O perfil proteico de cada peçonha foi caracterizado por cromatografia de fase reversa e SDS-PAGE. As composições das peçonhas de ambas as espécies mostraram perfis proteicos similares. As quantidades das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* induziram hemólise indireta significativa na presença de ácido graxo e de ácido graxo mais cloreto de cálcio. A peçonha bruta de *B. jararacussu* apresentou maior potencial citotóxico. As peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, não exibiram efeito anti-hemolítico. A peçonha de *B. jararacussu* apresentou efeito hemaglutinante nas quantidades analisadas de 100 e 1000µg e não apresentou efeito oxidante. A peçonha de *B. moojeni* apresentou efeito oxidante somente na quantidade de 1000µg. As peçonhas de ambas as espécies não mostraram efeito anti-oxidante. A peçonha de *B. moojeni* apresentou maior potencial coagulante em relação a peçonha de *B. jararacussu* e todos coágulos plasmáticos formados eram turvos, rígidos e estáveis. O tempo para formação dos coágulos foi inversamente proporcional à quantidade de peçonha avaliada. Portanto, as informações obtidas das comparações dos efeitos biológicos provocados pelas peçonhas, mostraram que *B. jararacussu* apresentou atividade hemolítica indireta, hemaglutinante e coagulante, e *B. moojeni* apresentou atividade hemolítica indireta, oxidante e coagulante.

**Palavras-chave:** Ofidismo, Efeitos biológicos, Lise eritrocitária, Coagulação plasmática.

## ABSTRACT

Snakebite or snakebite is the chart of poisoning from the inoculation of toxins through the snake inoculation apparatus. The objective of this study was to evaluate and *in vitro* the cytotoxic, oxidative and homeostasis effects (on erythrocytes, hemoglobins and human plasma, respectively) caused by the presence of the crude venoms of *Bothrops jararacussu* and *Bothrops moojeni* snakes. The protein profile of each venom was characterized by reverse phase chromatography and SDS-PAGE. The venom compositions of both species showed similar protein profiles. The amounts of the crude venoms from *B. jararacussu* and *B. moojeni* induced significant indirect hemolysis in the presence of fatty acid and fatty acid plus calcium chloride. The crude venom of *B. jararacussu* presented a higher cytotoxic potential. The venoms of *B. jararacussu* and *B. moojeni*, showed no anti-hemolytic effect. The venom of *B. jararacussu* presented a haemagglutinating effect in the analyzed amounts of 100 and 1000 $\mu$ g and did not present an oxidizing effect. The *B. moojeni* venom presented an oxidizing effect only in the amount of 1000 $\mu$ g. Venoms of both species showed no anti-oxidant effect. The crude venom of *B. moojeni* had a higher coagulant potential compared to *B. jararacussu* venom and all plasma clots formed were turbid, rigid and stable. The clot formation time was inversely proportional to the amount of venom evaluated. Therefore, the information obtained from the comparisons of the biological effects caused by the venoms, showed that *B. jararacussu* showed indirect hemolytic activity, hemagglutinating and coagulant, and *B. moojeni* presented indirect hemolytic activity, oxidant and coagulant.

**Keywords:** Ophidism, Biological effects, Erythrocyte lysis, Plasma coagulation.

### Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de variância
ACN	Acetonitrila
BJcuL	Lectina de <i>Bothrops jararacussu</i>
BjussuMP-I	Metaloprotease da peçonha <i>Bothrops jararacussu</i>
BjussuMP-II	Metaloprotease da peçonha <i>Bothrops jararacussu</i>
BjussuSP-I	Serinoproteinase de <i>Bothrops jararacussu</i>
BmLec	Lectina tipo C de <i>Bothrops moojeni</i>
BmooLAAO-I	L-aminoácido oxidase de <i>Bothrops moojeni</i>
BmooMP $\alpha$ -I	Metaloprotease <i>Bothrops moojeni</i>
BmooSP	Serinoproteinase de <i>Bothrops moojeni</i>
BRAVESdb	Banco de dados de Serpentes Peçonhentas do Brasil, do inglês Brazilian Venomous Snakes Database
BthTX-I	Bothropstoxina-I
BthTX-II	Bothropstoxina-II
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
LAAO	L-aminoácido oxidase
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> , do inglês Phospholipase A <sub>2</sub>
mAU	Mili Unidade de absorbância
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MjTX-I	Moojenitoxina-I
MjTX-II	Moojenitoxina-II
PBS	Solução Salina Tamponada, do inglês Phosphate Buffered Saline.
PB	Tampão Fosfato, do inglês Phosphate Buffer.
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate, Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
SE	Suspensão de Eritrócito
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TP	Tempo de Protrombina
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ L	Microlitro

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - <i>Bothrops jararacussu</i> e sua distribuição geográfica no Brasil.....	13
<b>Figura 2</b> - <i>Bothrops moojeni</i> e sua distribuição geográfica no Brasil.....	13
<b>Figura 3</b> - Cascata de coagulação com ativação pelas vias extrínseca e intrínseca.....	20
<b>Figura 4</b> - Cromatograma de separação proteica da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	29
<b>Figura 5</b> - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das frações, obtidas por cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	30
<b>Figura 6</b> - Cromatograma de separação proteica da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> .....	32
<b>Figura 7</b> - Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das frações, obtidas por cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> .....	33
<b>Figura 8</b> - Atividade hemolítica da peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> em eritrócitos humanos.....	35
<b>Figura 9</b> - Atividade hemolítica da peçonha bruta de <i>B. moojeni</i> em eritrócitos humanos.....	37
<b>Figura 10</b> - Comparação das atividades hemolíticas indiretas causadas pelas peçonhas brutas de <i>B. jararacussu</i> e <i>B. moojeni</i> , na presença de ácido graxo.....	38
<b>Figura 11</b> - Comparação das atividades hemolíticas indiretas causadas pelas peçonhas brutas de <i>B. jararacussu</i> e <i>B. moojeni</i> , na presença de ácido graxo e cloreto de cálcio.....	39
<b>Figura 12</b> - Análise da atividade anti-hemolítica da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> em eritrócitos humanos na presença de diferentes quantidades de cloreto de sódio.....	43
<b>Figura 13</b> - Análise da atividade anti-hemolítica da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> em eritrócitos humanos na presença de diferentes quantidades de cloreto de sódio.....	44
<b>Figura 14</b> – Avaliação da atividade anti-oxidante da peçonha bruta de <i>B. jararacussu</i> .....	47
<b>Figura 15</b> – Avaliação da atividade anti-oxidante da peçonha bruta de <i>B. moojeni</i> .....	47
<b>Figura 16</b> - Avaliação da atividade coagulante, em plasma humano citratado, na presença da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> e pelos testes de coagulação PT HEMOSTASIS e APTT HEMOSTASIS.....	51
<b>Figura 17</b> – Aspecto físico comparativo entre o plasma citratado humano e os coágulos formados na presença da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> , e na presença dos reagentes dos testes de coagulação (PT HEMOSTASIS e APTT HEMOSTASIS).....	52

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Atividade oxidante das peçonhas brutas de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> sobre a hemoglobina.....	47
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 Aspectos gerais sobre os acidentes ofídicos .....	12
1.2 Características do gênero <i>Bothrops</i> .....	12
1.3 <i>Bothrops jararacussu</i> (Lacerda, 1884) .....	12
1.4 <i>Bothrops moojeni</i> (Hoge, 1966) .....	13
1.5 Propriedades das peçonhas botrópicas .....	14
1.6 Proteínas da peçonha botrópica .....	14
1.6.1 Fosfolipases A <sub>2</sub> .....	14
1.6.2 L-aminoácido oxidase .....	15
1.6.3 Metaloproteases .....	16
1.6.4 Serinoproteinases.....	16
1.6.5 Lectinas Tipo C.....	16
1.7 Componentes do sangue humano .....	17
1.7.1 O eritrócito .....	17
1.7.2 Antígenos eritrocitários (Sistema ABO e Rh) .....	18
1.7.3 Hemoglobina .....	18
1.7.4 Plasma sanguíneo e hemostasia .....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos .....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 Peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> .....	22
3.2 Concentrado de hemácias humanas.....	22
3.3 Plasma humano citratado .....	22
3.4 Aspectos éticos .....	23
3.5 Fracionamento das peçonhas brutas de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> ..	23
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> .....	24
3.7 Atividades biológicas .....	24
3.7.1 Avaliação da atividade hemolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> em eritrócitos humanos.....	24

3.7.2 Avaliação da atividade anti-hemolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> em eritrócitos humanos.....	26
3.7.3 Avaliação da atividade oxidante da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> sobre eritrócitos humanos.....	26
3.7.4 Avaliação da atividade antioxidante da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> sobre eritrócitos humanos.....	27
3.7.5 Avaliação da atividade coagulante da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> sobre o plasma citratado humano .....	28
3.8 Análise estatística dos dados .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
4.1 Caracterização da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	29
4.2 Caracterização da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> .....	31
4.3 Avaliação da atividade hemolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> em eritrócitos humanos.....	34
4.4 Avaliação da atividade anti-hemolítica das peçonhas brutas de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> sobre eritrócitos humanos.....	42
4.5 Avaliação da atividade oxidante e antioxidante da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> sobre hemoglobina humana. ....	46
4.6 Avaliação da atividade coagulante das peçonhas brutas de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops moojeni</i> sobre o plasma humano. ....	50
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais sobre os acidentes ofídicos

Acidente ofídico ou ofidismo é o quadro de envenenamento decorrente da inoculação de toxinas através do aparelho inoculador (presas) de serpentes. No Brasil, as serpentes peçonhentas, de interesse em saúde pública, são representadas por quatro gêneros da Família Viperidae (*Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrocophias*) e um único gênero da Família Elapidae (*Micrurus*) (UETZ et al., 2017). O envenenamento ocorre quando a serpente consegue injetar o conteúdo de suas glândulas venenosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No Brasil, no ano de 2015, houve 24.467 casos de acidentes por serpentes peçonhentas e 107 óbitos decorrentes desses acidentes ofídicos (SINAN, 2017).

### 1.2 Características do gênero *Bothrops*

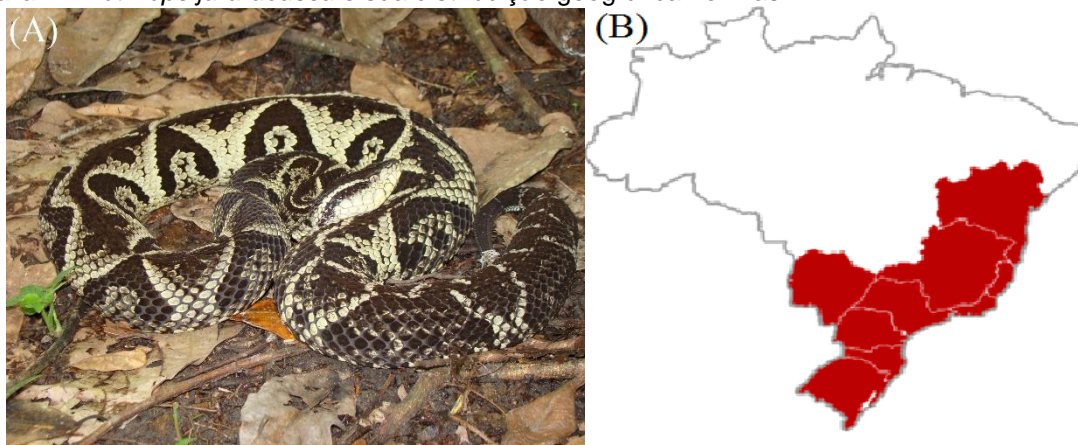
As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam dentição maxilar reduzida a um par de presas canaliculadas de grande mobilidade, as quais estão associadas as glândulas de veneno (condição solenoglifodonte). Os representantes da família Viperidae são caracterizados, pela presença de órgãos sensoriais termorreceptores faciais, as fossetas loreais (CAMPBELL; BRODIE, 1992; MCDOWELL, 2001; CAMPBELL; LAMAR, 1989; 2004). Essas serpentes estão distribuídas em todo o território brasileiro. Algumas espécies apresentam maior importância por sua extensa distribuição geográfica (e, conseqüentemente, apresentam uma maior incidência nos casos de acidentes ofídicos), como por exemplo, a *Bothrops jararacussu* nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste e a *Bothrops moojeni* nas regiões Centro Oeste e Sudeste, com ocorrência também no Nordeste (MELGAREJO, 2003).

As serpentes peçonhentas, predominantes nos casos notificados de ofidismo no Brasil, são os gêneros *Bothrops* (90,0%), *Lachesis* (1,4%), *Crotalus* (7,7%) e *Micrurus* (0,5%) (OLIVEIRA et al., 2011; FERNANDES et al., 2008).

### 1.3 *Bothrops jararacussu* (Lacerda, 1884)

A *Bothrops jararacussu* é uma serpente encontrada no Mato Grosso, extremo sul da Bahia, sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e noroeste do Rio Grande do Sul (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Essa serpente pode atingir até 1,80 m de comprimento. Dentre as *Bothrops*, essa espécie é a que produz a maior quantidade de veneno, sendo, talvez, a mais imponente do gênero (MELGAREJO, 2003).

**Figura 1 - *Bothrops jararacussu* e sua distribuição geográfica no Brasil.**

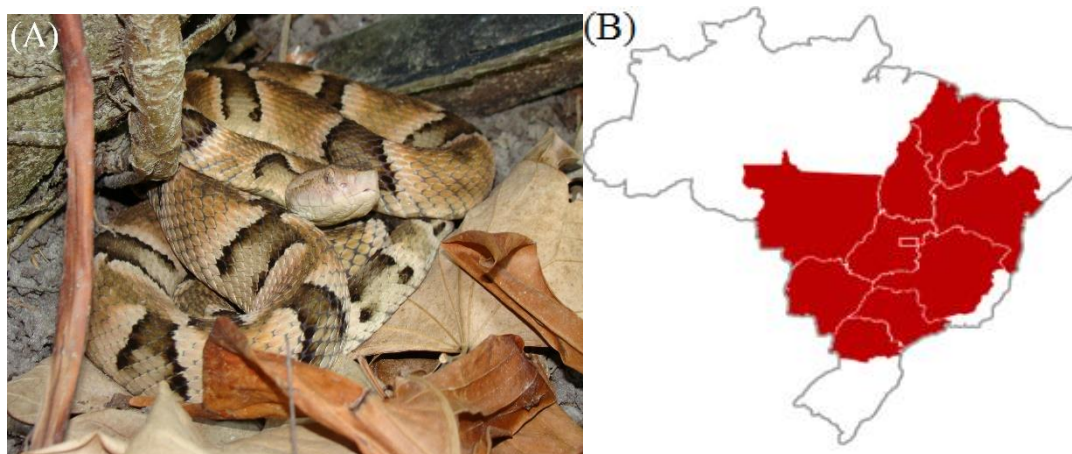


(A) Espécime adulto de *Bothrops jararacussu*. (B) Em vermelho, os estados brasileiros nos quais essa serpente pode ser encontrada. **Fonte:** Brazilian Venomous Snakes Database – BRAVESdb (2017).

#### 1.4 *Bothrops moojeni* (Hoge, 1966)

A *Bothrops moojeni*, popularmente chamada de caissaca, pode ser encontrada em alguns estados do Brasil (Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Bahia, Tocantins, Piauí e Maranhão), Argentina e Paraguai (CAMPBELL; LAMAR 1989). *Bothrops moojeni* é uma serpente de grande porte, com um comprimento máximo registrado de 1,68m (MELGAREJO, 2003).

**Figura 2 - *Bothrops moojeni* e sua distribuição geográfica no Brasil.**



(A) Espécime adulto de *Bothrops moojeni*. (B) Em vermelho, os estados brasileiros nos quais essa serpente pode ser encontrada. **Fonte:** Brazilian Venomous Snakes Database – BRAVESdb (2017).

## 1.5 Propriedades das peçonhas botrópicas

As propriedades biológicas, bioquímicas e farmacológicas das peçonhas ofídicas são decorrentes da presença de uma mistura heterogênea de substâncias (proteínas, peptídeos, íons, nucleotídeos, aminoácidos, lipídeos e compostos inorgânicos) cuja principal função está relacionada à captura de alimento e o processo de digestão da presa (DALTRY et al., 1996; MARKLAND, 1997; SILVA JR.; AIRD, 2001).

A peçonha botrópica é composta por moléculas proteicas, com ou sem atividade catalítica, como as fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidase, lectinas, proteases, hialuronidases, acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C, peptídeos (potencializadores de bradicinina e desintegrinas), e por compostos orgânicos de baixa massa molecular (carboidratos, serotonina, histamina, citrato e nucleosídeos) e íons inorgânicos (cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro, potássio) (STOCKER, 1990). Essa peçonha apresenta grande atividade proteolítica, propriedade responsável pelos principais efeitos locais e sistêmicos observados nos acidentes ofídicos. Os efeitos causados pela peçonha podem, ainda, envolver alterações na coagulação sanguínea e no sistema cardiovascular, hemorragia, mionecrose e inflamação intensa, com edema proeminente e dor (GIRON et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2009; RIVIERO, 2010; WARRELL, 2010).

A relevância do estudo dos componentes das peçonhas ofídicas tem resultado no desenvolvimento de diversos produtos biotecnológicos, como os medicamentos, fundamentados em observações de efeitos causados por ofidismo e, que estão sendo empregados no tratamento de diversas doenças. Um exemplo clássico de um fármaco desenvolvido com base na observação do desencadeamento do efeito sistêmico causado pelo empeçonhamento é o captopril, um dos medicamentos mais vendidos no mundo, eficaz no controle da hipertensão. Esse medicamento possui, como princípio ativo, um oligopeptídeo (piroglutamil) rico em prolina, isolado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. O captopril age como um inibidor da enzima de conversão da angiotensina I em angiotensina II (potente vasoconstritor), produzindo vasodilatação periférica e diminuindo a pressão arterial (BAILEY; WILCE, 2001; HAYASHI; CAMARGO, 2005).

## 1.6 Proteínas da peçonha botrópica

### 1.6.1 Fosfolipases A<sub>2</sub>

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s E.C. 3.1.1.4) compreendem uma grande família de proteínas, as quais possuem a mesma função enzimática e demonstram uma considerável

homologia quanto à sequência de aminoácidos (HIGUCHI et al., 2007). Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de fosfolipídeos de membrana. O ácido graxo resultante da hidrólise de glicerofosfolipídios é o ácido araquidônico, o qual participa da via de síntese dos leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas e prostaciclina (MURAKAMI; KUDO, 2002). A reação de hidrólise é dependente de íons cálcio (YU et al., 1990, 1998; DENNIS et al., 1994).

As PLA<sub>2</sub>s extracelulares possuem massa molecular baixa com relação às intracelulares variando entre 12 kDa e 15 kDa, com aproximadamente 120 e 123 aminoácidos, respectivamente (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA<sub>2</sub>s de peçonha de serpentes apresentam uma variedade de atividades tóxicas e farmacológicas (KINI e EVANS, 1989; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003; KINI, 2003). As *snake venom* fosfolipase A<sub>2</sub> (svPLA<sub>2</sub>s) são muito tóxicas e, em uma única peçonha, podem ocorrer várias isoformas, cujos efeitos farmacológicos podem variar, incluindo ação hemolítica, neurotoxicidade, agregação de plaquetas, anticoagulante, edematogênica, miotóxica, bactericida e pró-inflamatória. As svPLA<sub>2</sub>s estão relacionadas à mionecrose local, que provocam sequelas, como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação do membro afetado (GHAZARYAN et al., 2015).

### 1.6.2 L-aminoácido oxidase

As L-aminoácido oxidases (LAAOs, E.C. 1.4.3.2) encontradas nas peçonhas de serpentes (*snake venom*, svLAAOs) são flavoenzimas que catalizam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos em  $\alpha$ -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (TAN; FUNG, 2008). Muitos dos efeitos biológicos de LAAOs são creditados aos efeitos secundários causados pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produzido durante a reação enzimática, o que induz a apoptose celular (RODRIGUES et al., 2009; DU, CLEMETSON, 2002; LEWIS; GARCIA, 2003; ANDE et al., 2006).

Nos últimos anos, as LAAOs se tornaram objetos de interesse para estudos devido a seus efeitos apoptótico, citotóxico, indutor de agregação plaquetária e antimicrobiano. Esses efeitos biológicos parecem ser mediados pelo peróxido de hidrogênio altamente reativo gerado no processo de oxidação. Entretanto, algumas vezes o efeito não é somente atribuído ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado, mas também, as interações diretas entre a LAAO e a célula-alvo também podem desempenhar funções importantes (TAN; FUNG, 2008).

### 1.6.3 Metaloproteases

As metaloproteases isoladas das peçonhas de serpentes (svMPs E.C. 3.4.24) são um grupo de endopeptidases, dependentes de cálcio ou zinco ligados no sítio ativo para possuírem atividade. As svMPs são os principais fatores hemorrágicos causadores dos mais drásticos efeitos provocados pelo envenenamento (PAULA et al., 2014).

Em geral, a ação das svMPs promovem a proteólise de componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina e fibronectina), proteínas plasmáticas (fibrina, fibrinogênio, fator Von Willenbrand e pró-trombina) e das proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Essas enzimas provocam diversas alterações patológicas, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose, edema, equimose e gera uma resposta inflamatória (BERNADONI et al., 2014).

### 1.6.4 Serinoproteinases

As serinoproteinases estão associadas aos distúrbios hemostáticos devido à sua atuação nos componentes da cascata da coagulação sanguínea e do sistema fibrino(geno)lítico (ZAQUEO et al., 2014). Algumas serinoproteinases encontradas em peçonhas ofídicas (svSPs, E. C. 3.4.21) são denominadas *trombina-like*, pois atuam catalisando a conversão direta do fibrinogênio plasmático em fibrina, sem a necessidade da participação da trombina endógena. Essas enzimas, em função da atividade catalítica, agem no sistema de coagulação sanguínea, promovendo alterações na hemostasia, o que pode contribuir para uma hemorragia local e sistêmica. Elas participam da ativação do fator V da cascata de coagulação, na fibrinogenólise, na ativação de plasminogênio e indução de agregação plaquetária (SERRANO; MAROUN, 2005). Além disso, algumas dessas enzimas têm sido utilizadas como agentes anticoagulantes na área médica, clínica, cirúrgica e, também, como reagentes em testes de coagulação (MARSH; WILLIAMS, 2005).

### 1.6.5 Lectinas Tipo C

As lectinas tipo C são proteínas que possuem a capacidade de se ligar a carboidratos, monossacarídeos ou oligossacarídeos, numa associação dependente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (OGAWA et al., 2005). As lectinas tipo C podem participar de uma grande variedade de atividades biológicas, tais como adesão celular, endocitose e neutralização de agentes patogênicos (WEIS et al., 1992). As lectinas tipo C e as lectinas tipo C *like* são encontradas

em peçonhas ofídicas pertencentes às famílias Viperidae, Elapidae e Crotalidae (ARAGÓN-ORTIZ et al., 1990).

## 1.7 Componentes do sangue humano

### 1.7.1 O eritrócito

O eritrócito humano maduro é uma célula anucleada, com vida útil de aproximadamente 120 dias na circulação periférica e caracteriza-se por apresentar flexibilidade fisiológica notável. Sua função essencial é transportar oxigênio para os tecidos através das moléculas hemoglobina. É caracterizado por acentuadas particularidades metabólicas e estruturais. Os eritrócitos têm sua origem em células progenitoras da medula óssea e, durante o processo de diferenciação, ocorre a perda, por exocitose, do núcleo e outras organelas, como retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos (BRATOSIN et al., 2001; SPRAGUE; STEPHENSON; ELLSWORTH, 2007).

Vários modelos experimentais são utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro*, dentre estes, destaca-se o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos que é utilizado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando, nos eritrócitos, os danos que podem induzir *in vivo* (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005).

A hemólise refere-se à lise ou ruptura das membranas das hemácias permitindo a liberação da hemoglobina para o plasma, tendo como consequência a hemoglobinemia. A quantidade de hemoglobina livre no plasma depende da capacidade e da velocidade de remoção do pigmento pelo organismo de cada indivíduo, sendo fisiológica a quantidade de 6 mg%. Quando este valor supera 100 mg% a hemoglobina passa a ser filtrada pelos rins e quando excessivamente alto (superiores a 3.000 mg%), pode promover lesão renal (CARVALHO et al., 2008; PAULA et al., 2014).

A membrana plasmática tem papel chave na manutenção da forma do eritrócito, sendo constituída por 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. Entre os lipídios, o colesterol e os fosfolipídios estão organizados na bicamada em quantidades quase equimolares (HARRIS, 1991). Os tipos predominantes de fosfolipídios presentes na face interna da membrana são a fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilserina (PS) e a fosfatidilcolina (PC) e a esfingomiélnina (SM) mais abundantes na face externa da membrana (JAIN, 1985).

Atualmente acredita-se que os esfingolipídios são componentes importantes da membrana plasmática eucariótica, pois, estes compostos têm numerosas funções, tais como

a regulação da transdução nas vias de sinalização intracelular, direcionando proteínas, mediando interações e reconhecimento célula-célula (TANI, ITO, IGARASHI, 2007).

### 1.7.2 Antígenos eritrocitários (Sistema ABO e Rh)

O sistema de grupo sanguíneo ABO, descoberto por Karl Landsteiner, no começo do século XX é, até hoje, considerado o mais importante sistema de grupos sanguíneos na medicina clínica transfusional. Os epítomos do sistema ABO são resíduos terminais encontrados nos hidratos de carbono presentes na superfície das células e nas secreções que são biossintetizadas por glicosiltransferases específicas codificadas no *locus* ABO. O *locus* ABO está localizado no braço longo do cromossomo 9 (BATISSOCO et al., 2003; OLSSON et al., 2001; WATKINS, 1980; FERGUSON-SMITH et al., 1976; BENNETT et al., 1995).

A heterogeneidade fenotípica do sistema sanguíneo ABO é devido à diferença estrutural do gene das glicosiltransferases, o qual é responsável pela transferência dos resíduos específicos de açúcar,  $\alpha 1 \rightarrow 3$ -N-acetil-galactosamina transferase ou  $\alpha 1 \rightarrow 3$ -N-galactosil transferase ao substrato H, e os convertem ao antígeno A ou B, respectivamente (ZAGO et al., 1996; YOSHIDA et al., 1979; YAMAMOTO et al., 1990; YAMAMOTO et al., 1992; YAMAMOTO et al., 1990). O antígeno H é um carboidrato produzido pela ação da enzima  $\alpha$ -2-L-fucosiltransferase codificada no *locus* FUT1 do cromossomo 19, na posição q13.3, sendo, portanto, geneticamente independente do *locus* ABO (LEE et al., 2000; SCHENBEL-BRUNNER, 2000).

### 1.7.3 Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína globular formada por quatro subunidades: duas  $\alpha$  (141 resíduos cada uma) e duas  $\beta$  (146 resíduos). A estrutura quaternária da hemoglobina é mantida por ligações não covalentes, as quais são muito mais numerosas entre subunidades diferentes –  $\alpha/\beta$  – do que entre subunidades iguais –  $\alpha/\alpha$  e  $\beta/\beta$ . O resultado desta associação desigual é uma molécula tetramérica, composta por dois dímeros, denominados  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_2$ , dispostos simetricamente ao redor de um eixo central (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Cada cadeia da hemoglobina ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) está associada a um grupo heme (grupo prostético) contendo um átomo de ferro no estado  $Fe^{2+}$ . Os grupos prostéticos de cada subunidade da hemoglobina encontram-se localizados dentro de cavidades hidrofóbicas, as

quais tornam possível a ligação reversível do oxigênio ao ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou oxihemoglobina, sem que ele seja oxidado ao estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou metaemoglobina (KNIRSCH, 2015).

A hemoglobina é a proteína transportadora do oxigênio na corrente sanguínea, facilitando o seu acesso às células do organismo. Exerce ainda funções no transporte do dióxido de carbono e na regulação do equilíbrio ácido-base (STEINBERG et al., 2009).

#### **1.7.4 Plasma sanguíneo e hemostasia**

O plasma é um líquido tecidual e o maior componente do sangue (55%). É constituído principalmente por água (92%), age como solvente, apresenta pH de 7.4 e contém substâncias de diversas massas moleculares que perfazem 7% do seu volume. Os componentes dissolvidos são maioritariamente proteínas plasmáticas mas, também, se incluem nutrientes, gases respiratórios, hormonas e íons inorgânicos (MESCHER, 2013).

A hemostasia é um sistema complexo – que envolve a participação de fatores reológicos, parede vascular, plaquetas e outras células sanguíneas, fatores da coagulação, fibrinólise e diversos inibidores da coagulação e fibrinólise – que é responsável tanto por manter o sangue fluido em condições fisiológicas, quanto interromper a perda de sangue quando há uma lesão vascular (ASAZUMA, 1997).

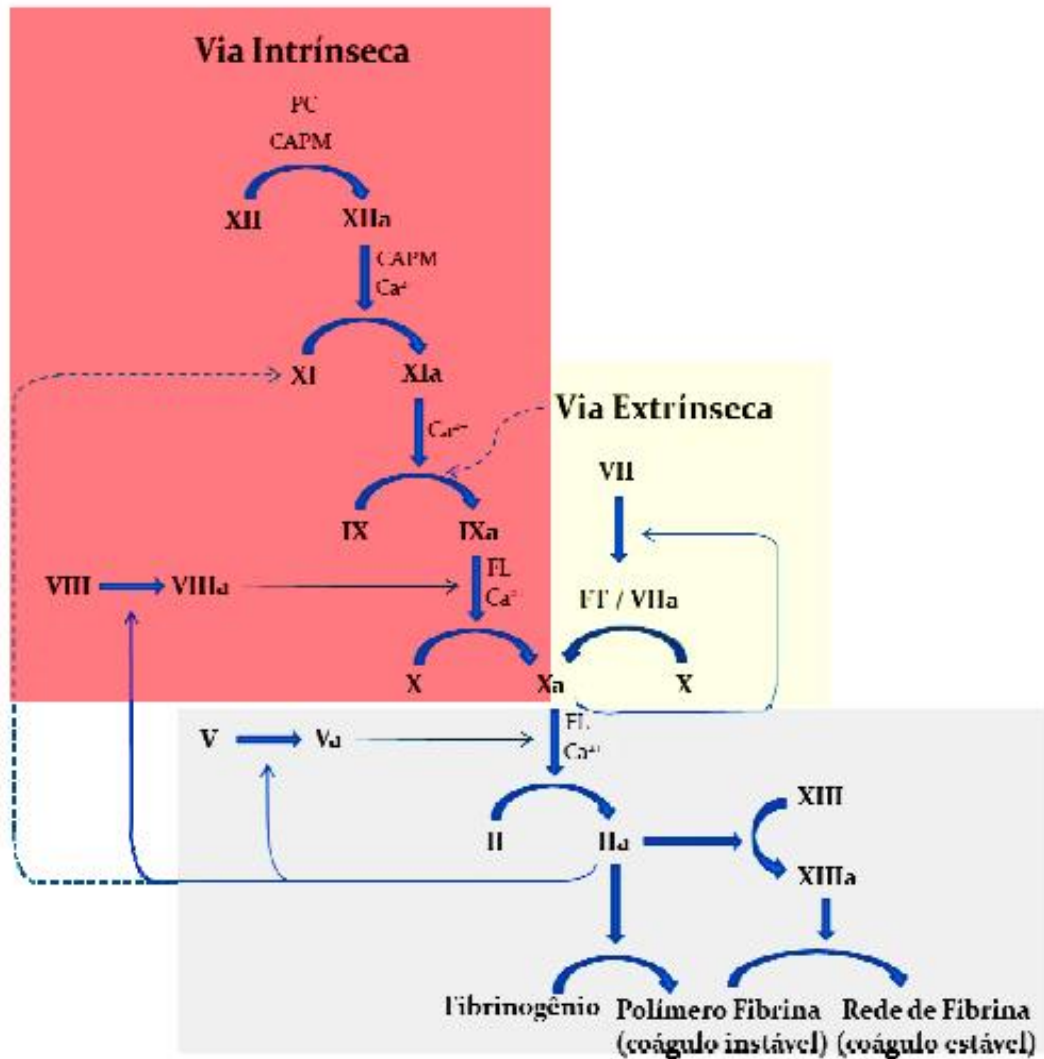
A hemostasia pode ser dividida em hemostasia primária e hemostasia secundária. A primária ocorre quando há interação entre os componentes celulares, tais como a parede do vaso lesado e as plaquetas, envolvendo uma série de eventos que incluem a adesão das plaquetas ao subendotélio, ativação, mudança de forma e a liberação do conteúdo granular das plaquetas. Já os fatores plasmáticos, cofatores, proteínas tissulares, serinaproteases, fosfolípidos e íons cálcio participam da hemostasia secundária (IWANAGA, 1993; TRIPLETT, 2000).

A ativação do sistema de coagulação simultaneamente à lesão é de fundamental importância durante o reparo hemostático. A cascata de coagulação sanguínea (Figura 3) foi didaticamente dividida em duas vias, a extrínseca (principal via para o início da sua ativação) e a intrínseca, sendo que as duas vias são fisiologicamente interdependentes. Suas proteínas plasmáticas pró-coagulantes são referidas como fatores e designadas por numerais romanos (GENTRY, 2004), e, em sua maioria, são enzimas que circulam normalmente na sua forma inativa, denominadas zimogênios (FURIE, 1992).

De um modo geral, a cascata ocorre na superfície da membrana fosfolipídica e durante esse processo o cálcio age como um importante fator que, juntamente com outros

fatores, ativam as etapas subsequentes da cascata com o objetivo de estancar o sangramento com a formação da rede de fibrina (SMITH, 2009).

**Figura 3** – Cascata de coagulação com ativação pelas vias extrínseca e intrínseca.



Modelo clássico da cascata de coagulação: vias intrínseca e extrínseca. As reações das vias extrínseca, intrínseca e via comum estão destacadas pelas cores bege, vermelha e cinza, respectivamente. PC: Pré-caliceína. CAPM: Cinogênio de Alto Peso Molecular. FL: Fosfolípido.  $Ca^{2+}$ : ion cálcio. **Fonte:** SARTIM, 2014.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar, *in vitro*, os efeitos citotóxico, oxidativo e na homeostase (sobre eritrócitos, hemoglobinas e plasma, respectivamente) causados pela presença das peçonhas brutas das serpentes *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni*, bem como estabelecer a relação das composições moleculares de cada peçonha com os efeitos biológicos desencadeados.

### 2.2. Objetivos Específicos

✓ Avaliar a composição molecular de cada uma das peçonhas brutas extraídas de serpentes brasileiras *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* por fracionamento e caracterização da massa molecular;

✓ Caracterizar as atividades citotóxicas através da ação hemolítica e sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B, AB e O na presença das peçonhas brutas extraídas das serpentes *B. jararacussu* e *B. moojeni*;

✓ Quantificar os efeitos oxidante e antioxidante das peçonhas brutas extraídas de serpentes *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre hemoglobinas humanas;

✓ Determinar a atividade coagulante das peçonhas brutas extraídas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre o plasma humano citratado;

✓ Correlacionar a composição molecular e a espécie da serpente com os efeitos tóxicos, bioquímicos e farmacológicos desencadeados por cada amostra da peçonha em análise.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni***

As peçonhas brutas das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* foram cedidas por colaboradores. Um *pool* da peçonha bruta foi coletado, liofilizado e cedido pela Professora Doutora Paula Helena Santa Rita coordenadora do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Conforme “Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UCDB” (ANEXO 01) e “Termos de Procedência de Venenos Ofídicos” (ANEXO 02).

As peçonhas brutas liofilizadas foram acondicionadas em congelador (-4°C). A liofilização ou criodessecação é um processo de desidratação em que as amostras são rapidamente congeladas, em nitrogênio líquido, e submetidas à sublimação sob vácuo, preservando as características físico-químicas das proteínas. E, para realização dos experimentos, as peçonhas brutas foram solubilizados em Tampão Fosfato Salino (PBS - 10x, pH 7,4) e utilizados imediatamente (durante a realização dos experimentos, as amostras solubilizadas eram mantidas em banho de gelo para evitar a desnaturação de proteínas).

#### **3.2 Concentrado de hemácias humanas**

As bolsas de sangue contendo concentrado de hemácias humanas foram cedidas para a pesquisa pela Agência Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW) da Universidade Federal da Paraíba, cidade de João Pessoa, estado da Paraíba. Foram utilizadas bolsas contendo hemácias dos grupos sanguíneos (A, B, AB e O) com fator Rh positivo. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Biossegurança. O armazenamento e a utilização de todo o material biológico utilizado foram realizados de acordo com a resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011.

#### **3.3 Plasma humano citratado**

Um *pool* de plasma foi obtido do sangue periférico de 05 voluntários aparentemente saudáveis, que não estavam fazendo uso de nenhuma medicação que pudesse interferir no processo de coagulação. O sangue foi colhido em tubos de coleta à vácuo (BD Vacutainer®) contendo 3,2% (0,109M) de citrato de sódio (1:9). O citrato de sódio age como um quelante, ligando-se aos íons de cálcio e interrompendo a cascata de coagulação (AMORIN et al, 2010).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, o plasma foi separado e armazenado.

Para obter os controles do tempo de protrombina – TP e o tempo de tromboplastina parcial ativada – TTPA nos experimentos de coagulação, foram utilizados os respectivos kits PT HEMOSTASIS Ref. 501 e APTT HEMOSTASIS Ref. 502, comercializados pela Labtest Diagnóstica S.A.

### 3.4 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais e a coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley CEP/HULW, com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) sob o número: 61023116.3.0000.5183 (ANEXO 03), de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional nº 001/2013 - Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução nº 466/12 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde (CONEP) do Ministério da Saúde.

### 3.5 Fracionamento das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni*

O perfil cromatográfico da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni* foram obtidos por Cromatografia Líquida de Fase Reversa utilizando cromatógrafo UFLC (Ultra Flow Liquid Chromatography – LC-6AD, Shimadzu Corporation) e coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (M) - comprimento da coluna: 25cm x 4,6mm, diâmetro do poro: 100Å, diâmetro da partícula: 5µm) utilizando a metodologia proposta por Calvete e colaboradores (2007).

Para obter as frações proteicas foram utilizados 3,43mg da peçonha bruta de *B. jararacussu* e 2,65mg da peçonha bruta de *B. moojeni* solubilizados em 500µL de 0,05% de Ácido Trifluoroacético (TFA) / 5% Acetonitrila (ACN) centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. A coluna foi previamente 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% Tampão B (66,5% de ACN em 0,1% de TFA).

O gradiente linear empregado para eluição das frações de *Bothrops jararacussu* foi de 0% de Tampão B por 5 minutos seguidos por 0 a 75% de Tampão B durante 75 minutos; 75 a 100% de Tampão B durante 10 minutos e 100% de Tampão B por 5 minutos. O fluxo de eluição empregado foi de 1,0mL/min. O gradiente linear empregado para eluição das frações de *B. moojeni* foi de 0% de Tampão B por 5 minutos seguidos por 0 a 20% de Tampão B

durante 10 minutos; 20 a 75% de Tampão B durante 80 minutos; 75 a 100% de Tampão B durante 10 minutos e 100% de Tampão B por 5 minutos.

O fluxo de eluição empregado foi de 1,0mL/min. Os picos proteicos foram monitorados através da determinação da absorbância a 280nm e as frações obtidas foram coletadas automaticamente sob temperatura de 4°C acima de 25mAU.

A concentração teórica das frações proteicas foi aferida em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) com absorbância (ABS) de 280nm, considerando 1 ABS= 1,0mg/mL.

### **3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni***

As eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram realizadas com gel de separação e empilhamento a 13% e 4% de Bis-Acrilamida, respectivamente. Foi utilizado um sistema desnaturante e reduzido conforme adaptações da técnica descrita por Laemmli (1970).

As amostras aplicadas em gel continham 10µL de cada fração obtida dissolvida em 5µL de tampão de amostra. Após preparadas, as amostras foram aquecidas por cinco minutos a 100°C, rapidamente centrifugadas e aplicadas no gel. As amostras foram separadas sob corrente e constante de 25mAU, em temperatura ambiente utilizando Tampão de Corrida Tris-Glicina. Os padrões de massa molecular utilizado foram: o PageRuler Plus™ comercializado pela Thermo Scientific™. O gel foi corado com Azul de Coomassie Brilhante g-250 durante 2 horas sob agitação a 40°C e descorado com água deionizada: etanol: ácido acético (6:3:1).

A análise eletroforética das frações foi realizada em colaboração com o Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador do Departamento de Física e Biofísica, Laboratório de Biologia Molecular Estrutural, Instituto de Biociências (IBB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

### **3.7 Atividades biológicas**

#### **3.7.1 Avaliação da atividade hemolítica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos**

A avaliação do potencial citotóxico, *in vitro*, das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre eritrócitos humanos foram realizados conforme algumas adaptações da

metodologia descrita por Hubert et al (1997) e Rangel et al (1997) e a porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com os Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010).

Para a realização da atividade hemolítica direta e indireta foram utilizadas as quantidades de 1000, 100, 10, 1 e 0,1µg dos *pools* de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, solubilizados em Tampão Fosfato Salino (PBS – 10x, pH 7,4) nas respectivas concentrações: 10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001mg/mL.

Amostras de sangue dos tipos A, B, AB e O, fator Rh positivo foram lavados três vezes com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (150mM) por centrifugação (3.000rpm) por 5 minutos em temperatura ambiente ( $\pm$  27°C). Foi preparada uma suspensão de eritrócitos (SE) a 5%, contendo 0,5mL de eritrócitos diluído em 99,5mL de cloreto de sódio a 0,9% (150mM). Em cada microtubo foram adicionados 2000µl da SE acrescida de 100µl das diferentes diluições da peçonha bruta a serem testadas.

Para determinar a capacidade de hemólise direta das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni*, foi adicionado, em cada tubo, 2mL de suspensão de eritrócitos, acrescido de 100µl das diferentes quantidades das peçonhas brutas a serem avaliadas (1000, 100, 10, 1 e 0,1µg). Já, para a avaliar a capacidade hemolítica indireta, adicionou-se 0,5µl de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e/ou 20µl de um complexo de ácidos graxos (Ácido Eicosapentanoico – EPA e Ácido Docosahexaenóico – DHA) na concentração de 100%, de acordo a metodologia descrita por Hubert et al. (1997) considerando algumas adaptações.

Posteriormente, as amostras foram incubadas (incubadora Shaker) durante 1 hora, a 37°C, com agitação de 100 rpm e em seguida centrifugadas (3.000rpm) por 5 minutos a 24°C. O controle positivo foi preparado com 2000µl da suspensão de eritrócitos acrescido de 20µl de Triton X-100 e, corresponde a 100% de hemólise. Para o controle negativo usou-se 2000µl da suspensão de eritrócitos acrescido de 10µl de tampão fosfato salino (PBS - Phosphate Buffered Saline, 10x, pH 7.4). Ambos os controles foram incubados a 37°C durante 1 hora e centrifugadas (3.000rpm) por 5 minutos, a 24°C.

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada através da análise da concentração de hemoglobina livre no sobrenadante, o que reflete a quantidade de lise celular. A leitura foi realizada por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000c, Thermo Scientific) em um comprimento de onda de 540nm. O percentual de hemólise foi calculado de acordo com a metodologia descrita por Montagner (2007). Todas os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados foram expressos em percentual hemolítico, utilizando os valores de absorbância (Abs) obtidos, de acordo com a Equação #1.

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

### **3.7.2 Avaliação da atividade anti-hemolítica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos**

O teste de fragilidade osmótica de eritrócitos avaliou a resistência dos eritrócitos quando expostos a uma solução salina hipotônica (JAIN, 1973). Os eritrócitos foram inicialmente lavados com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (150mM). Em seguida, a SE foi preparada utilizando 0,5mL de eritrócitos diluídos em 99,5mL de cloreto de sódio a 0,9% (150mM). Em cada tubo foram adicionados 2000µl de suspensão acrescidos de 100µL da concentração de peçonha bruta testada, e incubadas por 1h, a 37°C, com agitação de 100rpm. De cada amostra foram retirados 500µl da solução e distribuídos em quatro tubos. As amostras foram centrifugadas (3000rpm) por 5 minutos, a 24°C e o sobrenadante descartado. Os eritrócitos foram ressuspensos em quatro diferentes concentrações, e, em seguida, foi adicionando 350µl de cloreto de sódio (NaCl - 0,9%, 0,6%, 0,3% e 0,15%), incubados (37°C) por 1 hora e as amostras centrifugadas (3000rpm), por 5 minutos, a 24°C.

A leitura foi realizada por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000c, Thermo Scientific) em um comprimento de onda de 540nm e o percentual de hemólise calculado (MONTAGNER, 2007). O controle positivo do experimento foi a menor concentração de cloreto de sódio (0,15%) e os valores do controle negativo obtidos no teste hemolítico foram utilizados como controle negativo. Todas os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.7.3 Avaliação da atividade oxidante da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* sobre eritrócitos humanos**

A avaliação do potencial oxidante, *in vitro*, das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre eritrócitos humanos foi realizada conforme algumas adaptações da metodologia descrita por Hubert et al. (1997) e Rangel et al. (1997) e a porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com os Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010).

Os eritrócitos humanos foram lavados três vezes com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (150mM). Para a preparar 100mL de suspensão de eritrócitos (SE) a 30%, foram adicionados 30mL de eritrócitos dissolvidos em 69,4mL de PBS (10x, pH 7,4), acrescidos de 0,6mL de glicose a 10% e 400µL de Triton X-100 para lise celular.

Para a realização da atividade oxidante foram adicionados 1000µL de SE a 30% e 100µL das diferentes concentrações da peçonha bruta a ser testada (1000, 100, 10, 1 e 0,1µL). As amostras foram incubadas por 1h, a 37°C, com agitação de 100rpm. De cada amostra foram retiradas 25µL de solução e as mesmas foram ressuspensas em 750µL de tampão fosfato (PB). A leitura espectrofotométrica foi realizada no NanoDrop™ 2000c em um comprimento de onda de 630nm, para quantificar a metahemoglobina livre no sobrenadante. Após a primeira leitura, foi retirado 75µL de cada amostra e novamente ressuspensa em 750µL de PB. A leitura foi realizada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 540nm e o percentual de metahemoglobina calculado segundo (NAOUM et al., 2004) com o emprego da Equação #2 e expressos em percentual de hemoglobina oxidada a metahemoglobina (mHb).

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

Os valores de referência para as taxas de metahemoglobina (MetHb) foram: 1,9% - 3,8% normal; acima de 4% elevado. Todos os testes foram realizados em triplicata (n=3).

#### **3.7.4 Avaliação da atividade antioxidante da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni* sobre eritrócitos humanos**

A avaliação quantitativa, *in vitro*, da formação de metahemoglobina após exposição da hemoglobina frente as peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* foi realizada conforme a metodologia (com adaptações) proposta por Naoum et al (2004).

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada a partir da atividade oxidante. As amostras contendo a SE a 30% e as peçonhas brutas foram utilizadas para o teste. Em cada amostra, foram adicionadas 50µL de fenilhidrazina (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NHNH<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich) a 1M, posteriormente encaminhadas para incubação por 1h, a 37°C com agitação de 100rpm. O controle positivo foi 1000µL de SE a 30%, acrescidos de 50 µL de fenilhidrazina a 1M. Retirou-se 25µL de cada amostra, conduzindo-o a um novo tubo com 750µL de PB, posteriormente as amostras foram centrifugadas (3000rpm/5min/24°C) e lidas a 630nm no espectrofotômetro. Após a primeira leitura foi realizado uma nova diluição. Foi retirado 75µL de cada amostra e

novamente ressuspensa em 750µL de PB; estas foram centrifugadas (3000rpm/5min/24°C) e lidas no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540nm. O cálculo para avaliar a quantidade de hemoglobina que foi oxidada à metahemoglobina permaneceu o mesmo adotado para análise da atividade oxidante (Equação #2), bem como, foram mantidos os mesmos valores de referência. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

### **3.7.5 Avaliação da atividade coagulante da peçonha de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni* sobre o plasma citratado humano**

A avaliação da atividade coagulante dos das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* nas quantidades (1,25; 2,5; 5; 10µg), solubilizados em PBS (10x, pH 7,4) sobre o plasma humano citratado foi realizada de acordo com o método previamente descrito por Alvarado e Gutiérrez (1988) com adaptações.

Para a realização dos experimentos de coagulação, 100 µL de um *pool* de plasma humano citratado foi distribuído em cada tubo de ensaio e mantido em banho-maria à 37°C. As diferentes quantidades das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e de *B. moojeni* foram adicionadas, separadamente, em cada tubo e o tempo (em segundos) para a formação do coágulo foi anotado. Todos os experimentos para avaliar o tempo de coagulação foram realizados em triplicata.

Os kits de coagulação, comercializados pela Labtest Diagnóstica S.A., PT HEMOSTASIS, ref 501 (tempo de protrombina, TP) e APTT HEMOSTASIS, Ref 502, (tempo de tromboplastina parcial ativada, TTPA) foram utilizados como controles de referência, seguindo as recomendações do fabricante.

### **3.8 Análise estatística dos dados**

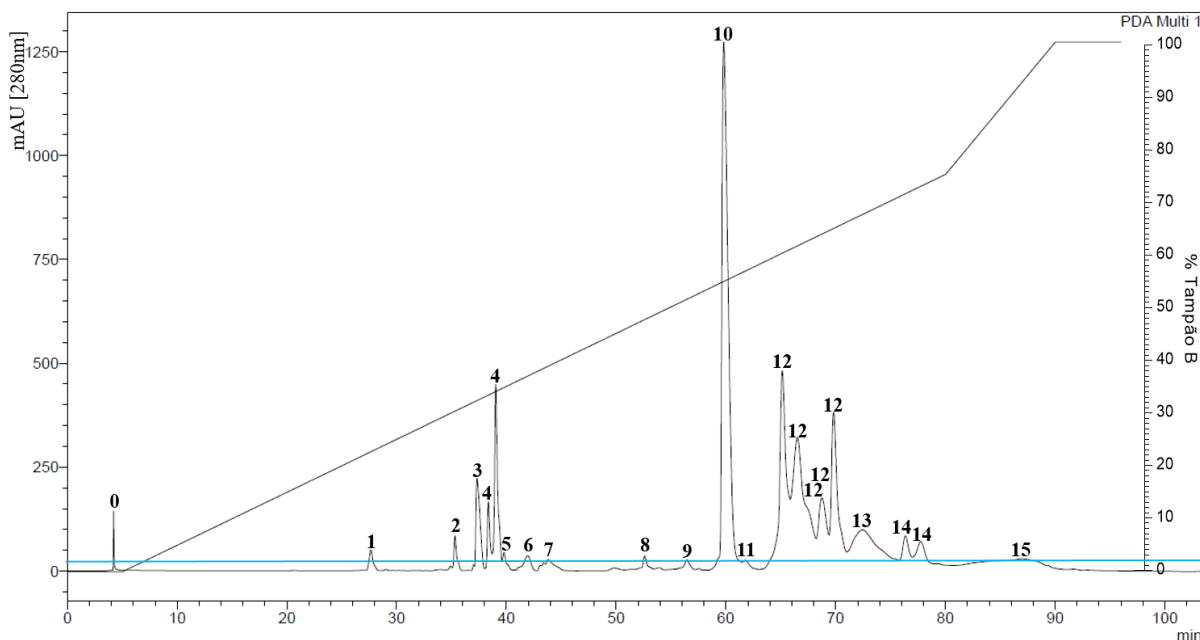
Os resultados das análises foram expressos com base à média e o erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística utilizada foi One-way ANOVA, seguido de teste de Dunnett. Foram consideradas diferenças significativas valores com  $p < 0,05$  (ns: não significante; \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,011$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  e \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ). Os dados foram analisados pelo software Prism for Windows (GraphPad Prism®) versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*

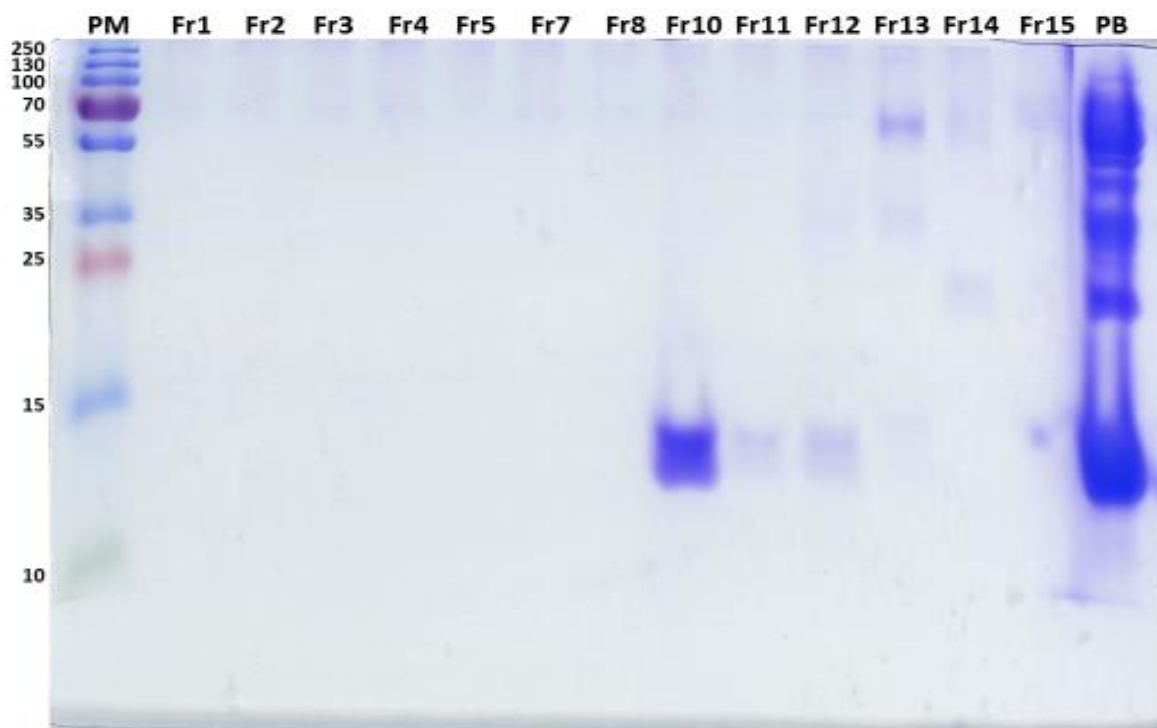
A peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* foi separada em dezesseis frações, denominadas *Fr0-Fr15*. A *Fr0* foi coletada, antes dos cinco minutos iniciais, quando ainda não havia iniciado o gradiente linear (0% de Tampão B) e foi descartada. As frações *Fr1*, *Fr2*, *Fr3*, *Fr5*, *Fr6*, *Fr7*, *Fr8*, *Fr9*, *Fr11*, *Fr13* e *Fr15* foram obtidas, em diferentes quantidades, com 23%, 30%, 33%, 35%, 37%, 39%, 48%, 52%, 55%, 68% e 94% de Tampão B, respectivamente. A *Fr4*, apresentou, ao menos, 2 picos e foi separada com 35% de Tampão B. A *Fr10*, apresentou o maior pico e sua coleta foi iniciada aos 59 minutos e finalizada com 61 minutos decorridos, sendo eluída com 55% de tampão B. A *Fr12* apresentou, ao menos, 5 picos superpostos recolhidos entre 60% até 65% de Tampão B. Já a *Fr14* apresentou, ao menos, 2 picos superpostos recolhidos após 72% de Tampão B (Figura 4).

**Figura 4:** Cromatograma de separação proteica da peçonha de *Bothrops jararacussu*.



Cromatografia Líquida de Fase Reversa em coluna C18 (250 x 4,6mm, tamanho da partícula: 5µm). As condições cromatográficas foram isocriticamente (0% B) durante 5 min., seguida por 0-75% de tampão B durante 75 minutos, de 75-100% de B por 10 minutos e 100% de tampão B durante 5 minutos. As frações foram coletadas automaticamente, em temperatura constante de 4°C e acima de 25mAU (linha azul).

**Figura 5** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das frações, obtidas por cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*.



PM: padrão de massa molecular - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, comercializado pela Thermo Scientific™, contendo 9 padrões de massa molecular entre 250 e 10kDa (250, 130, 100, 55, 35 e 15kDa em azul, 70 e 25 kDa em vermelho e 10kDa em verde); *Fr1 – Fr15*: frações proteicas; PB: peçonha bruta.

A análise da SDS-PAGE permitiu inferir que não é possível afirmar, através da coloração do gel por Azul de Coomassie Brilhante g-250, a presença de proteínas nas frações (*Fr1-Fr5*; *Fr7-Fr8*). A *Fr10* e *Fr11* apresentaram apenas uma única banda proteica, formada por uma proteína de massa molecular de, aproximadamente, 14 kDa. A análise do perfil cromatográfico da *Fr12*, sugere a presença de, pelo menos, duas proteínas, de massa molecular aproximada de 14 kDa e 35 kDa. A *Fr13* apresentou duas bandas, com massa molecular aproximada de 35 kDa e 70 kDa. A *Fr14* também apresentou duas bandas, com massa molecular aproximada de 24 kDa e 60 kDa. A *Fr15* apresentou apenas uma banda de massa molecular aproximada de 70 kDa (Figura 5).

Uma análise comparativa entre os valores de massa molecular estimados pela SDS-PAGE e os descritos na literatura, nos possibilitou dizer que a banda proteica referente a massa molecular de 14 kDa da *Fr10* representa uma fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>). As bandas proteicas de massa molecular aproximada de 14 kDa, presentes nas frações (*Fr10*, *Fr11*) condizem com isoformas de fosfolipase  $A_2$ . Algumas PLA<sub>2</sub> já foram isoladas e caracterizadas

da peçonha de *B. jararacussu* como as PLA<sub>2</sub> básicas, bothropstoxina-I (BthTX-I) uma Lys49, desprovida de atividade enzimática (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988), e a bothropstoxina-II (BthTX-II) uma Asp49, com atividade enzimática (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000). Ambas possuem massa molecular de aproximadamente 14 kDa e são miotóxicas. Algumas PLA<sub>2</sub> ácidas também já foram isoladas, e destacam-se por possuírem pouca ou nenhuma atividade miotóxica. A BthA-I, uma Asp49- PLA<sub>2</sub> possui atividade antiplaquetária e hipotensora (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002).

A *Fr12* pôde ser relacionada a BJcuL, uma lectina, com massa molecular de 15kDa, em condições desnaturantes (CARVALHO, 1997). A banda proteica referente a massa molecular de 25 kDa da *Fr14* pôde ser relacionada com a BjussuMP-II, uma metaloproteinase fibrinogenolítica não hemorrágica de 24 kDa, isolada da peçonha de *B. jararacussu* (MARCUSI et al., 2007). Já a banda proteica de massa molecular de aproximadamente 30 kDa observada na *Fr12*, quando comparada com dados descritos na literatura, pôde ser referida a uma serinoproteinase, glicoproteínas com massas moleculares relativas que variam entre 28 a 64 kDa, apresentando pl (ponto isoelétrico) ácido, como a Jararacussina-I de *B. jararacussu* com 28 kDa e pl 5,0 (BORTOLETO et al., 2002).

A *Fr13* pôde estar relacionada a uma L-aminoácido oxidase, como a LAAO de *B. jararacussu* descrita por Costa (2012), com massa molecular estimada de 68 kDa (COSTA, 2012). A *Fr14* pôde ser relacionada a BjussuSP-I, uma serinoproteinase de com massa molecular de 61 kDa (SANT'ANA et al., 2008).

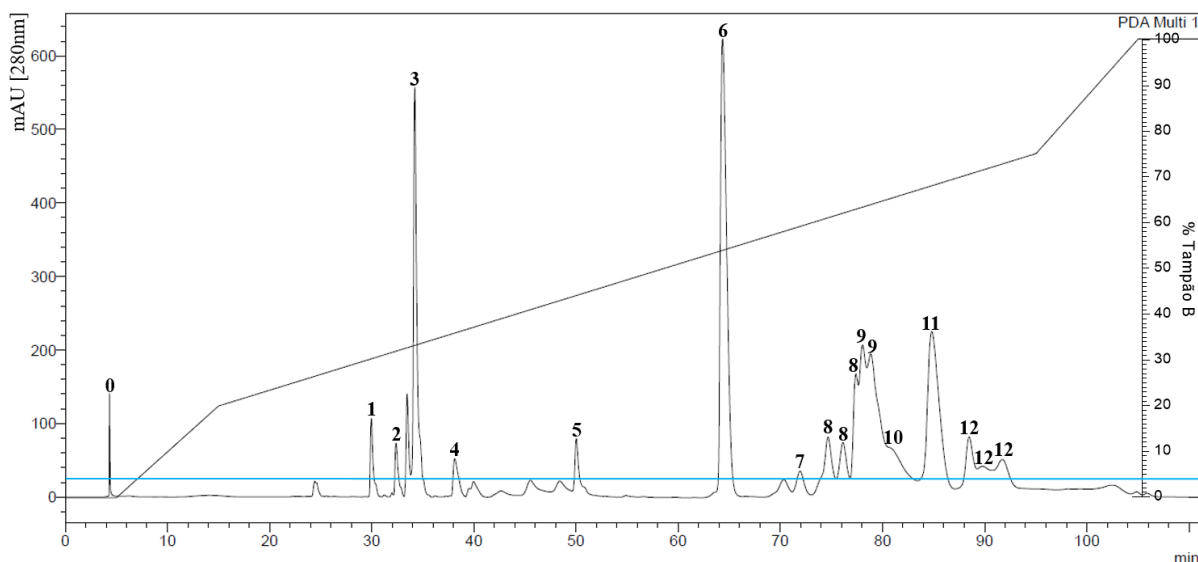
A *Fr15* está representada no SDS-PAGE por uma banda proteica de aproximadamente 70 kDa, a qual pôde ser associada à metaloprotease da peçonha *B. jararacussu* (BjussuMP-I) uma proteína com massa molecular de 60 kDa, com atividade hemorrágica (MAZZI et al., 2007).

#### **4.2 Caracterização da peçonha bruta de *Bothrops moojeni***

A peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi fracionado, em treze frações, denominadas *Fr0* a *Fr12*. A *Fr0* foi coletada, automaticamente, antes dos cinco minutos iniciais, quando ainda não havia iniciado o gradiente linear (0% de Tampão B) e foi descartada. As *Fr1*, *Fr2*, *Fr4*, *Fr5*, *Fr7*, *Fr10* e *Fr11* foram obtidas, com 30%, 32%, 36%, 44%, 59%, 66% e 68% de Tampão B, respectivamente. A *Fr3* apresentou, ao menos, 2 picos recolhidos após 32% de Tampão B e 33% de Tampão B. A coleta da *Fr3* foi iniciada com 33 minutos e finalizada com 35 minutos. A *Fr6* apresentou o maior pico recolhido após 55% de Tampão B. A coleta da *Fr6* foi iniciada aos 63 minutos e finalizada com 66 minutos. A *Fr8* apresentou 3 picos, recolhidos após 61% de Tampão B e sua coleta foi iniciada com 73 minutos e finalizada com 77,5

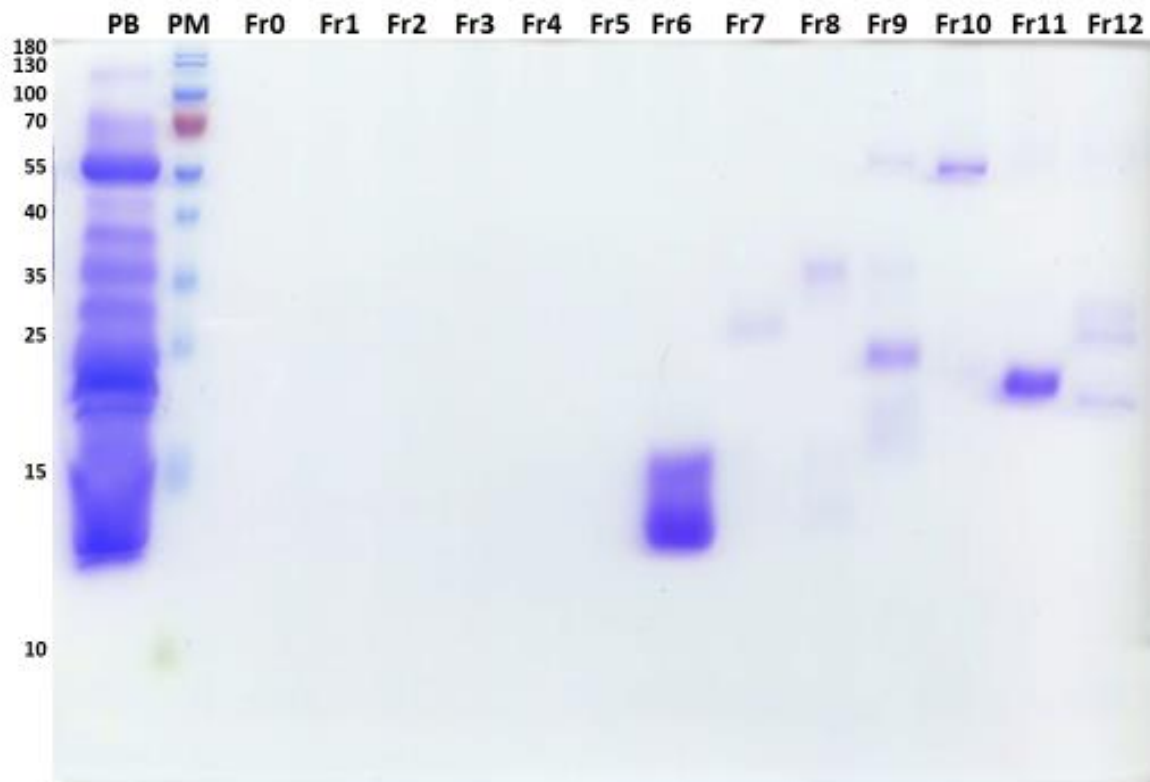
minutos. A *Fr9* apresentou, ao menos, 2 picos recolhidos após 63% a 64% de Tampão B e sua coleta foi iniciada com 75,5 minutos e finalizada com 80 minutos. A coleta da *Fr12* apresentou 3 picos, recolhidos após 71% a 73% de Tampão B, entre 87,5 minutos e 93 minutos (Figura 6).

**Figura 6** - Cromatograma de separação proteica da peçonha de *Bothrops moojeni*.



Cromatografia Líquida de Fase Reversa em coluna C18 (250 x 4,6mm, tamanho da partícula: 5µm). As condições cromatográficas foram isocraticamente (0% B) durante 5 min., seguida por 0-20% de tampão B durante 10 minutos, de 20-75% de B por 80 minutos, de 75-100% de B por 10 minutos e 100% de tampão B durante 5 minutos. As frações foram coletadas automaticamente, em temperatura constante de 4°C e acima de 25mAU (linha azul).

**Figura 7** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das frações, obtidas por cromatografia líquida de fase reversa, da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*.



PB: peçonha bruta. PM: padrão de massa molecular – PageRuler™ Prestained Protein Ladder comercializado pela Thermo Scientific™, contendo 10 padrões de massa molecular entre 180 e 10kDa (180, 130, 100, 55, 40, 35, 25 e 15kDa em azul, 70kDa em vermelho e 10kDa em verde); Fr0 – Fr15: frações proteicas.

A análise da SDS-PAGE permitiu observar, através da coloração do gel por Azul de Coomassie Brilhante g-250, a presença de proteínas nas frações Fr0-Fr5. As frações Fr6, Fr7, Fr10 e Fr11 apresentaram apenas uma única banda proteica, com massa molecular aproximada de 14kDa, 30kDa, 60kDa, 20kDa, respectivamente. A análise do perfil cromatográfico das Fr8 e Fr12 sugeriram a presença de, pelo menos, três proteínas em cada fração, sendo que, três bandas proteicas, de massa molecular aproximada de 14kDa, 14,5kDa e 35kDa da fração (Fr8) e 20kDa, 25kDa e 30kDa da fração (Fr12), estão visíveis na SDS-PAGE. A Fr9 apresentou, ao menos, duas bandas proteicas de massa molecular aproximada de 25 kDa e 65 kDa (Figura 7).

Uma análise comparativa entre os valores de massa molecular estimados pela SDS-PAGE e os descritos na literatura, nos possibilitou dizer que a banda proteica referente a massa molecular de 14 kDa da Fr6 representa uma fosfolipase A<sub>2</sub>. Entre elas, a Moojenitoxina-I (MjTX-I) e Moojenitoxina-II (MjTX-II) são fosfolipases A<sub>2</sub> Lys-49, com massa aproximada de 14 kDa, já descritas (LOMONTE et al., 1990; SOARES et al., 1998; 2000; 2004).

A banda proteica referente a massa molecular de 20 kDa da *Fr11* pôde ser relacionada a uma metaloprotease (BmooMP $\alpha$ -I), dependente de zinco de classe P-I, a qual possui massa molecular de 22,6 kDa, apresenta atividades azocaseinólítica, fibrinogenólítica e desfibrinante, porém é desprovida de atividades tipo trombina e hemorrágica (BERNARDES et al., 2008).

A *Fr7* está representada no SDS-PAGE por uma banda proteica de aproximadamente 30 kDa, a qual pôde ser associada a BmooSP, uma serinoproteinase de *B. moojeni*, com massa molecular de 30kDa (OLIVEIRA et al., 2016). A *Fr8* está representada no SDS-PAGE por uma banda proteica de aproximadamente 15 kDa, a qual pôde ser relacionada a BmLec, uma lectina tipo C de *B. moojeni* com massa molecular entre 14-15 kDa (BARBOSA, 2010).

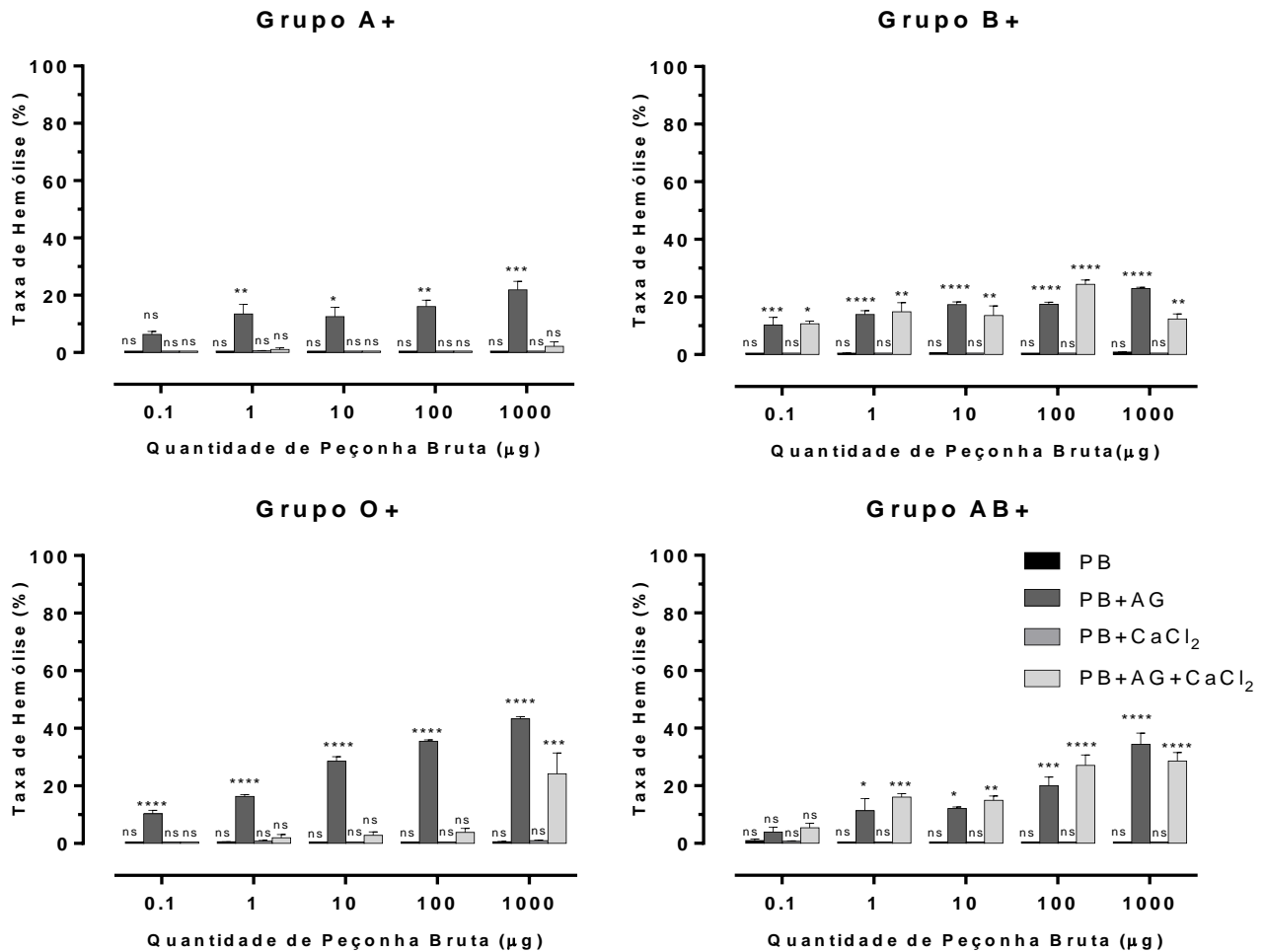
A banda proteica referente a massa molecular de 60 kDa da *Fr10* pôde ser associada à uma L-aminoácido oxidase, a BmooLAAO-I de massa molecular de 64,889 kDa, em condições desnaturantes (STÁBELI et al., 2007).

#### **4.3 Avaliação da atividade hemolítica da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos**

A peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* foi capaz de induzir hemólise em eritrócitos humanos pertencentes aos quatro tipos sanguíneos do sistema ABO, com fator Rh+, com porcentagem considerável quando utilizado de forma indireta, isto é, na presença de um complexo de ácidos graxos e cloreto de cálcio, entretanto, em porcentagens muito baixas quando utilizados de forma direta (Figura 8).

O efeito hemolítico da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* em eritrócitos lavados humanos foi de maneira concentração-dependente, quando utilizado apenas com o ácido graxo ou com ácido graxo mais cloreto de cálcio. Apenas o tipo sanguíneo A, quando utilizado com a peçonha bruta com ácido graxo mais cálcio não apresentou efeito hemolítico considerável ( $p>0,05$ ). Nos grupos sanguíneos O, AB e B, a hemólise foi significativa (Figura 8).

**Figura 8** - Atividade hemolítica da peçonha bruta de *B. jararacussu* em eritrócitos humanos (grupos sanguíneos ABO).



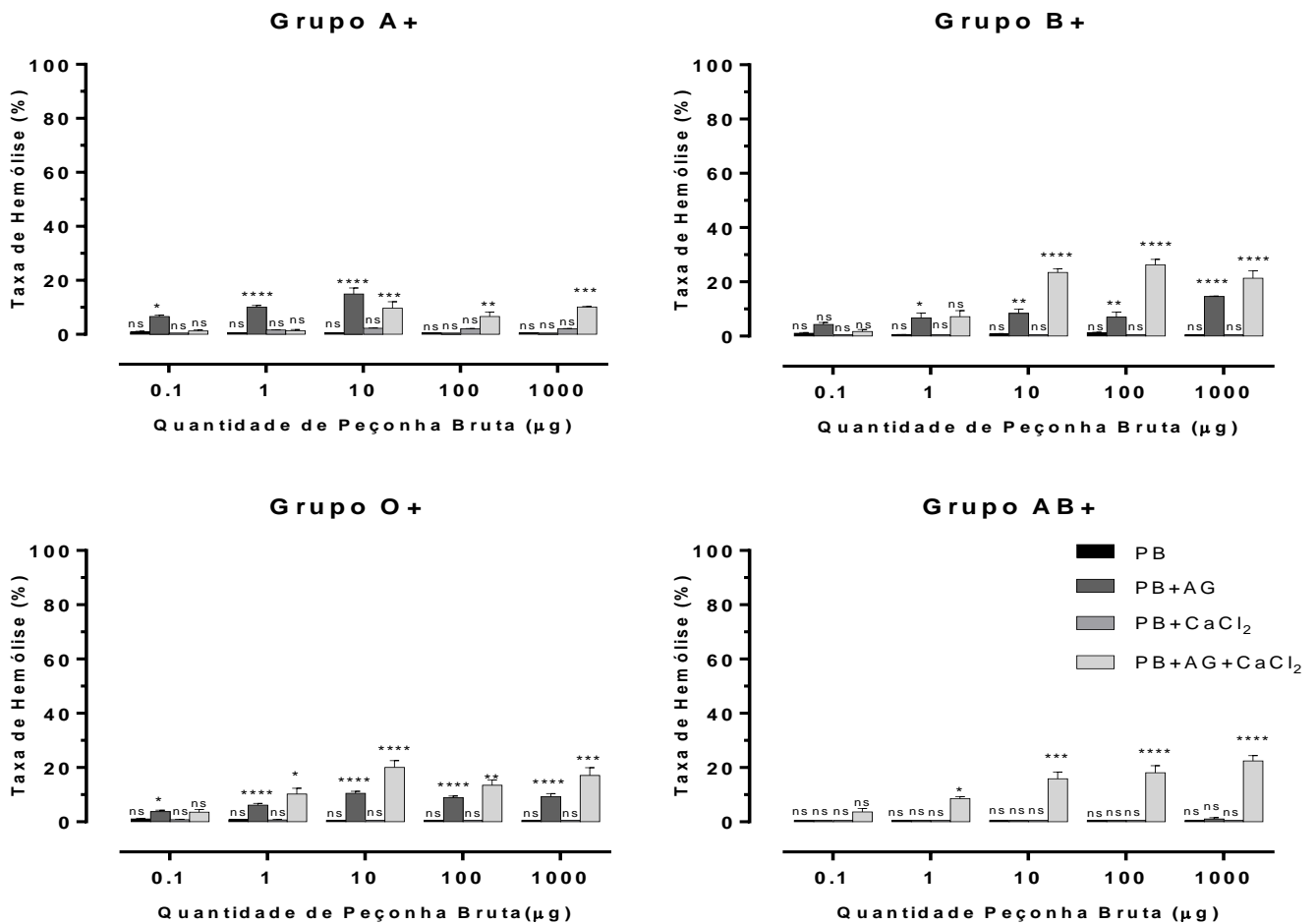
### *Bothrops jararacussu*

% de hemólise direta e indireta sobre eritrócitos dos grupos sanguíneos ABO, provocada pela peçonha de *B. jararacussu* incubados com complexo de ácidos graxos (PB+AG), ácidos graxos mais cálcio (PB+AG+CaCl<sub>2</sub>) e apenas cloreto de cálcio (PB+CaCl<sub>2</sub>). PB: peçonha bruta; AG: ácido graxo; CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio. Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). ns: não significativa. \*: p<0,01; \*\*: p<0,001; \*\*\*: p<0,0001 e \*\*\*\*: p<<0,0001 (ANOVA e Dunnett).

A peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi capaz de induzir hemólise em eritrócitos humanos pertencentes aos quatro tipos sanguíneos do sistema ABO, entretanto em porcentagens muito baixas quando utilizados de forma direta e com porcentagem considerável quando utilizado de forma indireta, na presença de um complexo de ácidos graxos e cloreto de cálcio ( $p < 0,01$ ) (Figura 9).

O efeito hemolítico causado pela peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em eritrócitos lavados humanos apresentou variação quando utilizado com o ácido graxo mais o cloreto de cálcio e apenas com ácido graxo, principalmente nos eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B e O. No grupo sanguíneo AB, a atividade hemolítica foi de maneira concentração-dependente. Nos eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O, a hemólise foi significativa quando utilizado apenas a peçonha bruta com o ácido graxo ( $p < 0,01$ ). Não houve hemólise significativa de eritrócitos do grupo sanguíneo AB na presença da peçonha bruta mais o ácido graxo. Eritrócitos do grupo sanguíneo A, apresentaram hemólise dose-variando, na presença da peçonha bruta mais ácido graxo e do ácido graxo mais cloreto de cálcio (Figura 9).

**Figura 9** - Atividade hemolítica da peçonha bruta de *B. moojeni* em eritrócitos humanos (grupos sanguíneos ABO).

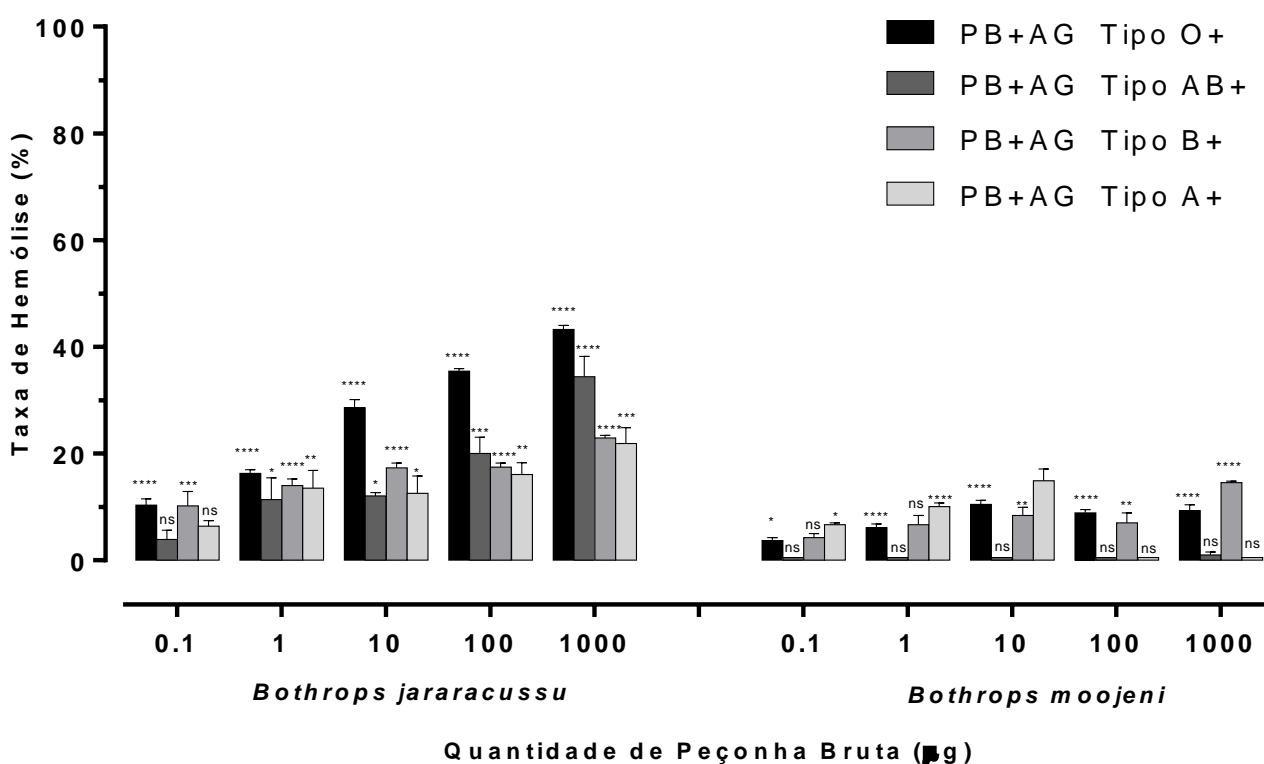


### *Bothrops moojeni*

% de hemólise direta e indireta sobre eritrócitos dos grupos sanguíneos ABO, provocada pela peçonha de *B. moojeni* incubados com complexo de ácidos graxos (PB+AG), ácidos graxos mais cloreto de cálcio (PB+AG+CaCl<sub>2</sub>) e apenas cloreto de cálcio (PB+CaCl<sub>2</sub>). PB: peçonha bruta; AG: ácido graxo; CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio. Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). ns: não significante. \*: p<0,01; \*\*: p<0,001; \*\*\*: p<0,0001 e \*\*\*\*: p<<0,0001 (ANOVA e Dunnett).

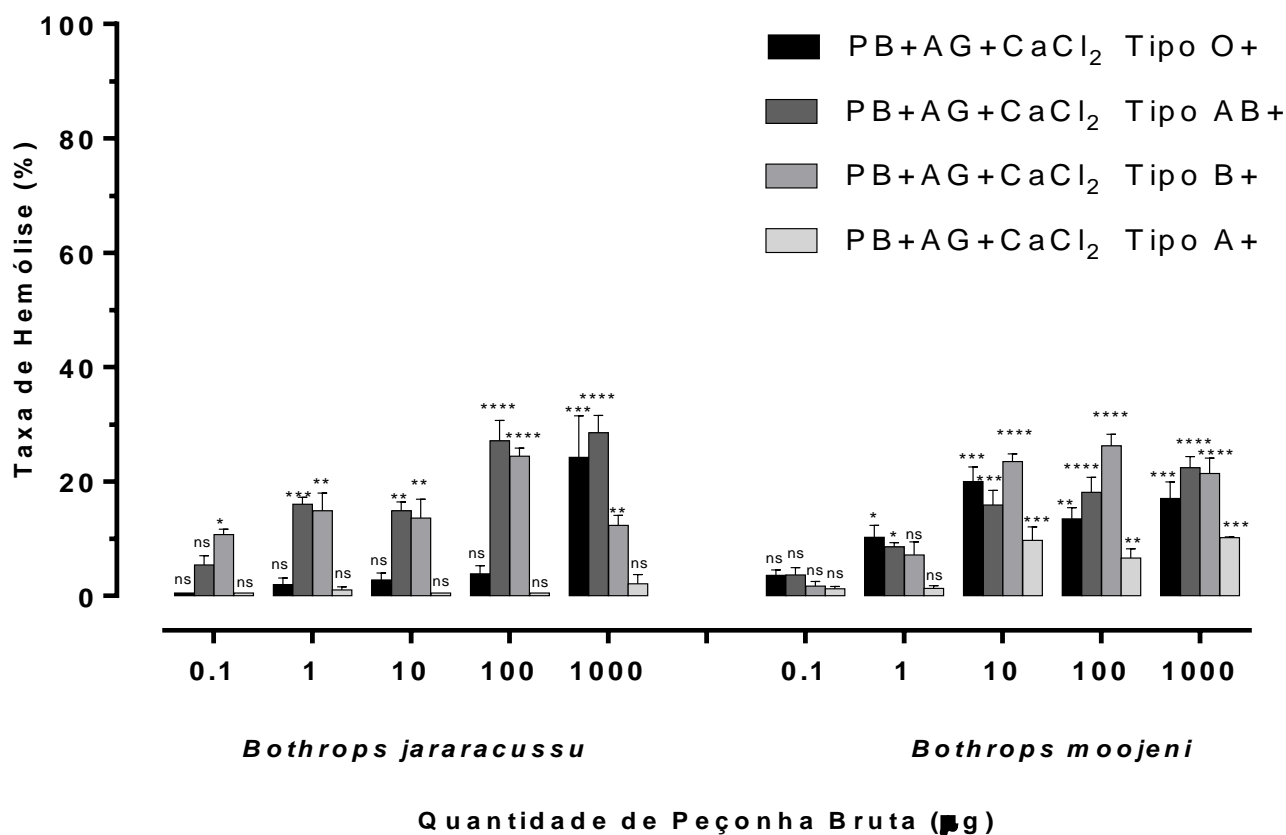
Quando comparado as atividades citotóxicas sobre eritrócitos humanos das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, em relação aos grupos sanguíneos e, ainda na presença de ácido graxo mais cloreto de cálcio ou na presença apenas de cloreto de cálcio, verificou-se que a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* apresentou efeito hemolítico em relação a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (Figura 10). Já, quando utilizada a peçonha bruta mais ácido graxo e cloreto de cálcio, o efeito citotóxico foi mais evidente nas quantidades 10, 100 e 1000µg, em ambas espécies analisadas (Figura 11).

**Figura 10** - Comparação das atividades hemolíticas indiretas causadas pelas peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, na presença de ácido graxo.



PB: peçonha bruta; AG: ácido graxo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n = 3). Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n = 3). ns: não significativo. \*: p<0,01; \*\*: p<0,001; \*\*\*: p<0,0001 e \*\*\*\*: p<<0,0001 (ANOVA e Dunnett).

**Figura 11** - Comparação das atividades hemolíticas indiretas causadas pelas peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, na presença de ácido graxo e cloreto de cálcio.



PB: peçonha bruta; AG: ácido graxo e CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n = 3). ns: não significante. \*: p<0,01; \*\*: p<0,001; \*\*\*: p<0,0001 e \*\*\*\*: p<0,0001 (ANOVA e Dunnett).

O efeito hemolítico indireto, *in vitro*, apresentado pelas peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, pode estar relacionado com a ação das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) presentes nas peçonhas. Ao analisar o perfil proteico da peçonha bruta de *B. jararacussu* foi possível detectar a presença de proteínas dessa classe nas frações *Fr10* e *Fr11* e em *B. moojeni* na fração *Fr6* (Figuras 5 e 7). Estes resultados corroboram outros dados da literatura que afirmam que o veneno botrópico causa hemólise *in vitro* (KELLEN et al., 1962).

Dentre as proteínas com atividades enzimáticas encontradas em peçonhas de serpentes, as fosfolipases A<sub>2</sub> são particularmente abundantes nas peçonhas do gênero *Bothrops*. Essas enzimas têm sido muito estudadas devido suas propriedades químicas e atividades biológicas, tais como, neurotóxica, miotóxica, hemolítica, anticoagulante e edematogênica (VALENTIN & LAMBEAU, 2000).

As PLA<sub>2</sub> ou fosfatidil-acil-hidrolases, compreendem uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de fosfolipídeos de membrana. A reação de hidrólise é dependente de íons cálcio, sendo a unidade catalítica formada pelos aminoácidos His 48, Asp49 e Asp99 uma molécula de água (YU et al., 1990, 1998; DENNIS et al., 1994).

Ao menos três PLA<sub>2</sub> já foram isoladas da peçonha de *B. jararacussu*. A BthTX-I, uma PLA<sub>2</sub> homóloga (Lys49- PLA<sub>2</sub>) é completamente destituída de atividade enzimática *in vitro*, ao passo que a BthTX-II, uma PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativa (Asp49-PLA<sub>2</sub>), porém apresenta atividade fosfolipásica muito baixa e é citotóxica (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; CINTRA et al., 1993). Já a BthA-I-PLA<sub>2</sub> (*B. jararacussu*) 13.700 Da (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002).

A peçonha de *B. moojeni* também apresenta PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas (Asp49- PLA<sub>2</sub>) como a BmooPLA<sub>2</sub> de 13.601 Da (SILVEIRA et al., 2013) e a BmooTX-I 15.000 Da (SANTOS-FILHO et al., 2008). E PLA<sub>2</sub> cataliticamente inativas (Lys49-PLA<sub>2</sub>) como a Moojenitoxina-I (MjTX-I) e Moojenitoxina-II (MjTX-II) (LOMONTE et al., 1990; SOARES et al., 1998; 2000; 2004).

Geralmente, existe uma tendência em correlacionar a habilidade hidrolítica *in vitro* das PLA<sub>2</sub>s com seus efeitos farmacológicos. Esta é uma conduta equivocada, pois *in vivo* a atividade catalítica é grandemente influenciada por vários fatores, tais como, a preferência de ligação às proteínas específicas, presença de diferentes classes de fosfolipídios nas proximidades de proteínas-alvo, e habilidade de penetração das PLA<sub>2</sub>s (ROSENBERG, 1979, 1986, 1997).

Em nossos experimentos, quando foi utilizado apenas as peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, sobre os eritrócitos lavados humanos, verificou-se que essas peçonhas não induziram hemólise *in vitro*. Nos sistemas *in vitro*, essas enzimas não atuam em eritrócitos humanos lavados, pois as porções hidrofóbicas dos lipídeos da membrana, ao contrário das lipoproteínas séricas, não são acessíveis. Algumas substâncias como a gramicidina S, copolímeros sintéticos básicos de  $\alpha$ -aminoácidos, Fator Lítico Direto (FLD), entre outros, facilitam a ação das PLA<sub>2</sub>s com atividade hemolítica. Estes compostos básicos atacam a membrana por atração eletrostática e expõem os fosfolipídios das membranas celulares às PLA<sub>2</sub>s (VITAL BRAZIL, 1982).

A penetrabilidade das PLA<sub>2</sub>s é particularmente importante, tanto nos efeitos farmacológicos dependentes como independentes de sua atividade catalítica. Grande parte das PLA<sub>2</sub>s básicas apresentam maior poder de penetração quando comparadas àquelas neutras e ácidas (VERHEIJ et al., 1980), provavelmente devidas à abundância de resíduos positivos, o que lhes conferem maior potência na indução de efeitos farmacológicos, como,

danos teciduais e toxicidade. No entanto, é importante ter em mente que, a basicidade e penetrabilidade, não são as únicas variáveis que determinam a potência farmacológica (KINI, 2003).

No presente estudo, foram utilizados um complexo de ácidos graxos (Ácido Eicosapentanóico – EPA e Ácido Docosahexaenóico – DHA) e cloreto de cálcio, para verificar a o potencial citotóxico da peçonha bruta *in vitro*, sobre os eritrócitos lavados. A análise da hemólise indireta foi significativa quando utilizado um complexo de ácidos graxos com as peçonhas brutas. Os ácidos graxos adicionados estão relacionados com a alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária, expondo os fosfolípidios da membrana. Nos empeçonhamentos ofídicos, a fosfolipase A<sub>2</sub> está relacionada com atividade hemolítica, através da hidrólise dos fosfolípídeos e liberação de ácidos graxos e lisofosfolípídeos. Os fosfolípídeos são compostos tenso-ativos que, mesmo em doses pequenas alteram a permeabilidade das membranas celulares, produzindo hemólise indireta (VITAL BRAZIL, 1982). Dentre os ácidos graxos liberados está o ácido araquidônico, que funciona como um segundo mensageiro e como o precursor de eicosanóides, que são potentes mediadores da inflamação (NUNES et al., 2011).

O mecanismo de atuação das Lys49-PLA<sub>2</sub>s, proposto por Fernandes et al (2014) relaciona a entrada de ácido graxo no canal hidrofóbico da proteína com uma ativação alostérica dessas proteínas. A interação dessas proteínas na membrana celular ocorre pela interação de resíduos proteicos carregados positivamente com os fosfolípídeos de membranas. A penetração de resíduos hidrofóbicos da proteína, desestabiliza a membrana causando a lise celular. Conforme observado em nossos estudos, o uso de ácidos graxos pôde facilitar a atuação das fosfolipase A<sub>2</sub>, presentes nas peçonhas brutas. O uso das peçonhas brutas associadas aos ácidos graxos aumentou significativamente o grau de hemólise.

Os dados de atividade hemolítica encontrados na literatura são, em sua grande maioria, resultados de experimentos com eritrócitos do tipo O+. Segundo Chaves-Moreira (2015), isso se deve ao fato de que normalmente os ensaios avaliaram a hemólise dependente de complemento, e nestes casos, o uso de amostra de outro tipo sanguíneo seria inviável, pois devido à presença de anticorpos anti-A e/ou anti-B, as proteínas do complemento poderiam reconhecer esses anticorpos e desencadear hemólise *in vitro*.

Chaves-Moreira (2015) em seu experimento, realizou a avaliação da hemólise direta, em que possibilitou avaliar se os antígenos dos sistemas ABO e Rh poderiam apresentar algum tipo de interferência na atividade hemolítica da toxina recombinante LiRecDT1, uma isoforma de fosfolipase-D, do veneno loxoscélico (*Loxosceles intermedia*). Nas condições experimentais estudadas, não foi observada nenhuma diferença significativa na taxa de

hemólise dos eritrócitos A+, B+, AB+, O+ e O- induzida pela presença da LiRecDT1. Esses resultados indicaram que as diferenças entre os antígenos A e B do sistema ABO, e o D, do sistema Rh não interferiram na atividade hemolítica direta causada pela toxina recombinante LiRecDT1.

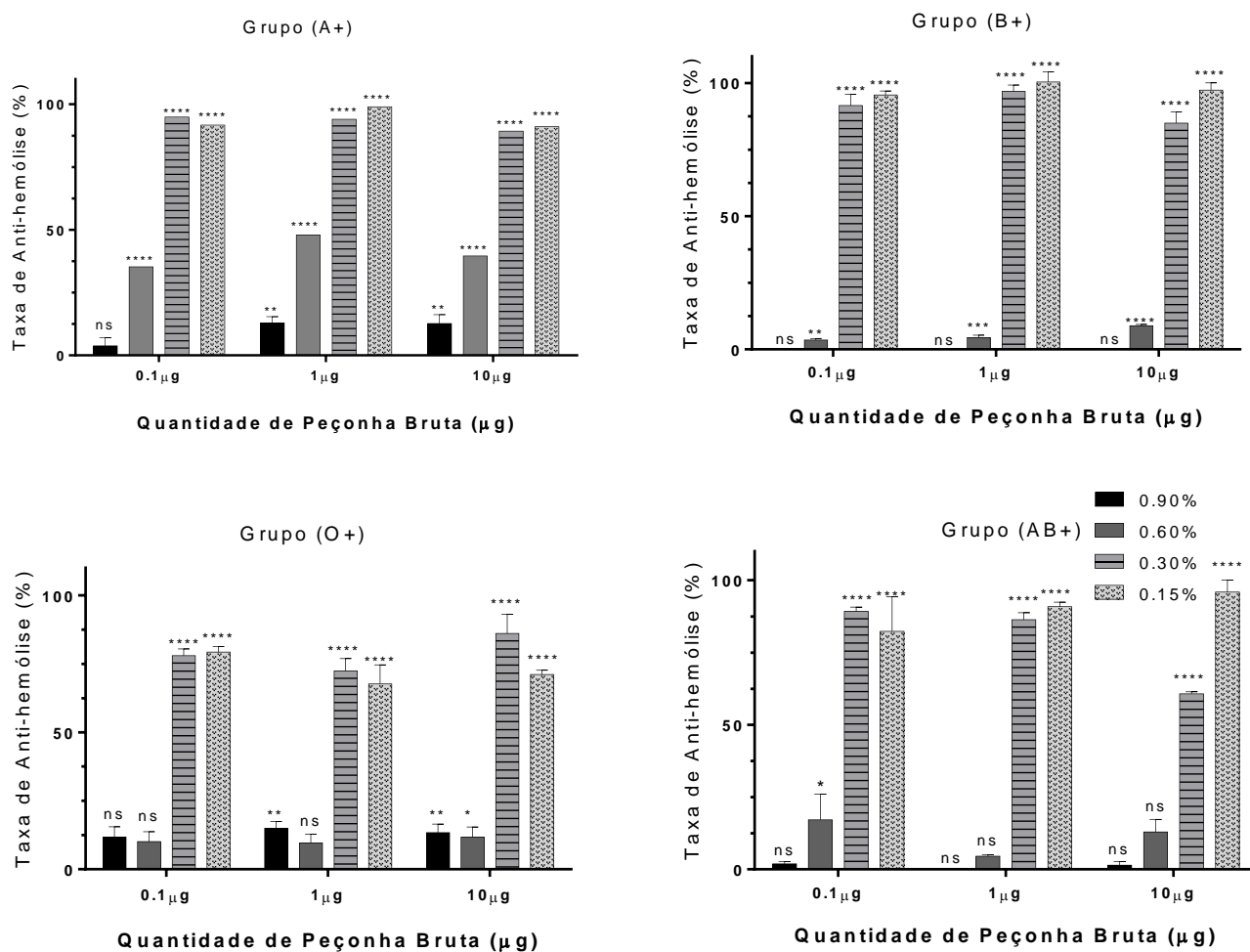
Em nossos estudos, o sistema ABO, não influenciou na ação hemolítica das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*. A avaliação do potencial citotóxico das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* demonstrou que essas possuem a capacidade de causar danos na membrana eritrocitária (hemólise indireta), *in vitro*, dos quatro tipos sanguíneos do sistema ABO, fator Rh+.

Não foi encontrado relato de estudos que avaliaram o efeito citotóxico, *in vitro*, das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, sobre os quatro tipos sanguíneos do sistema ABO, fator Rh positivo, sendo esse o primeiro estudo utilizando este tipo de comparação.

#### **4.4 Avaliação da atividade anti-hemolítica das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* sobre eritrócitos humanos.**

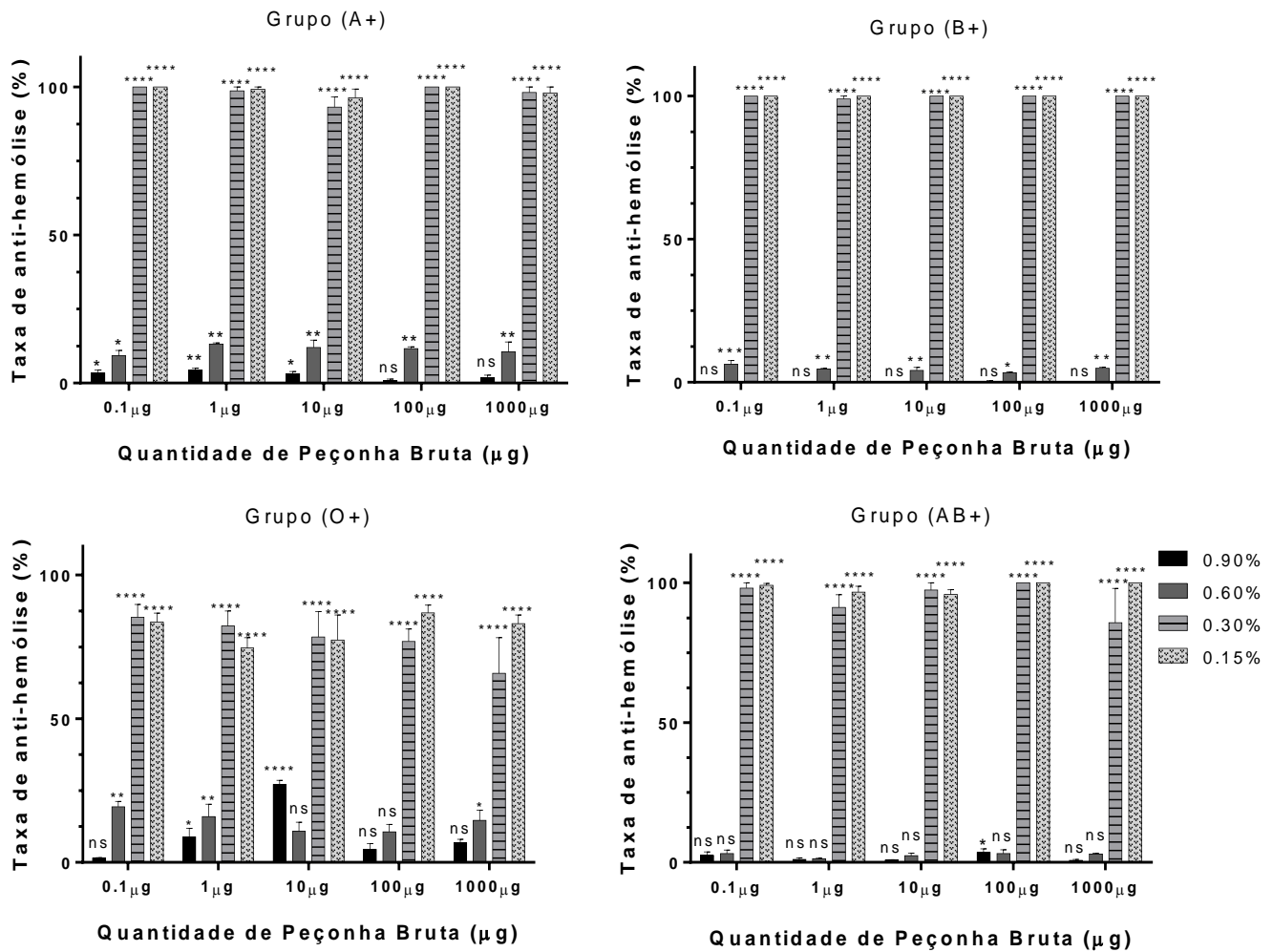
Nas figuras 12 e 13 estão representados os dados referentes aos efeitos da peçonha bruta de *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre a fragilidade osmótica eritrocitária, dos quatro tipos sanguíneos ABO, em relação as concentrações de NaCl testadas. As peçonhas brutas de ambas espécies não apresentaram atividade anti-hemolítica, ocorrendo o rompimento dessas células, principalmente nas concentrações de NaCl entre 0,15% e 0,30%. No entanto, nas quantidades de 100µg e 1000µg da peçonha bruta de *B. jararacussu*, nos quatro tipos sanguíneos ABO, observou-se hemaglutinação eritrocitária, não podendo ser avaliado as porcentagens de anti-hemólise nessas quantidades.

**Figura 12** – Análise da atividade anti-hemolítica da peçonha de *Bothrops jararacussu* em eritrócitos humanos na presença de diferentes quantidades de cloreto de sódio.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). ns: não significativa. \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  (ANOVA e Dunnett).

**Figura 13** – Análise da atividade anti-hemolítica da peçonha de *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos na presença de diferentes quantidades de cloreto de sódio.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). ns: não significante. \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  (ANOVA e Dunnett).

Ambas as peçonhas avaliadas não apresentaram atividade anti-hemolítica em nenhuma das quantidades avaliadas e em nenhum tipo sanguíneo do sistema ABO (Figuras 12 e 13). No entanto, na presença das quantidades de 100 e 1000 µg da peçonha bruta de *B. jararacussu* foi observado hemaglutinação eritrocitária. A atividade hemaglutinante produzida pela peçonha bruta está relacionado com ação das lectinas tipo C. Ao analisar o perfil proteico da peçonha bruta de *B. jararacussu* foi possível observar, na eletroforese (SDS-PAGE), a presença de uma banda proteica de aproximadamente 14kDa (Figura 5). Esse resultado

corroborar com o estudo de Kayano (2006), no qual a lectina do tipo C de *B. jararacussu* (Bjcul) apresentou elevada capacidade hemaglutinante, tanto sobre eritrócitos de coelho quanto de humanos dos tipos A, B, AB e O.

Na literatura, já foram descritas algumas atividades biológicas das lectinas de serpentes, tais como, capacidade de aglutinar eritrócitos *in vitro*, atividade mitogênica sobre linfócitos (DJALDETTI et al., 1980), agregação plaquetária (GARTNER et al., 1980); modulação de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético (OHKURA et al., 1996; HIRATA et al., 1999) e inibição de proliferação de diversas linhagens de célula tumorais (MARCINKIEWICZ et al., 2000).

As lectinas do tipo C (dependentes de íons cálcio) ligantes de galactose, ou lectinas verdadeiras, são proteínas de caráter não enzimático capazes de interagir não covalentemente a resíduos específicos de carboidratos através do domínio de reconhecimento de carboidrato presente nessa molécula. São proteínas homodiméricas (com monômero de aproximadamente 14 kDa) ligadas por pontes dissulfeto, e apresentam atividade de interação a glicoconjugados podendo induzir aglutinação de eritrócitos e processos inflamatórios (MENDONÇA-FRANQUEIRO et al., 2011).

O teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) foi definido como sendo uma das formas de avaliar a resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, quando essas células são expostas à ação de soluções salinas hipotônicas. Essas células, quando suspensas em meio hipotônico, aumentam até atingir um volume crítico e a hemólise ocorre. Assim sendo, a fragilidade celular varia conforme a concentração de sal e segue uma distribuição normal em organismos sadios, ocorrendo diferenças entre espécies. A fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, as diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas (ELIAS et al., 2004).

Interação de lectinas com os determinantes de superfície do eritrócito pode alterar as propriedades da membrana fragilizando a hemácia ou a impedindo a lise celular quando estas são expostas a ambientes hipotônicos (GRUPTA et al., 2006).

A análise da atividade anti-hemolítica das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* demonstrou que, nas quantidades testadas, essas não protegeram dos danos na membrana eritrocitária (hemólise), *in vitro*, causados pela hipotonicidade, nos quatro tipos sanguíneos testados do sistema ABO, Fator Rh+.

#### 4.5 Avaliação da atividade oxidante e antioxidante da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* sobre hemoglobina humana.

Na atividade oxidante, a quantidade de metahemoglobina formada na presença da peçonha bruta de *B. jararacussu* em todas as quantidades avaliadas não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1). A peçonha bruta de *Bothrops moojeni* apresentou efeito oxidante, em relação ao controle, na maior quantidade da peçonha testada (1000 $\mu$ g), com diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).

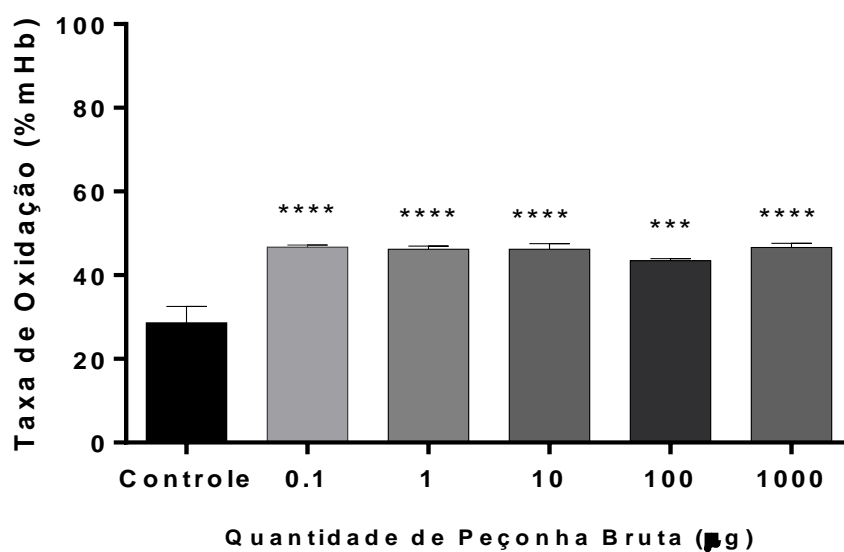
**Tabela 1:** Atividades oxidante da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* sobre a hemoglobina em porcentagem.

Espécies:	Taxa de oxidação (%mHb Formada)					
	C-	0,1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	10 $\mu$ g	100 $\mu$ g	1000 $\mu$ g
<i>Bothrops jararacussu</i>	3,71 $\pm$ 0,25	4,15 $\pm$ 0,07	4,03 $\pm$ 0,10	4,12 $\pm$ 0,06	4,24 $\pm$ 0,19	4,31 $\pm$ 0,20
<i>Bothrops moojeni</i>	3,72 $\pm$ 0,14	2,93 $\pm$ 0,18	2,93 $\pm$ 0,15	2,48 $\pm$ 0,11	2,72 $\pm$ 0,10	5,24 $\pm$ 0,38**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n = 3). \*\*:  $p < 0,001$ ; (ANOVA e Dunnett).

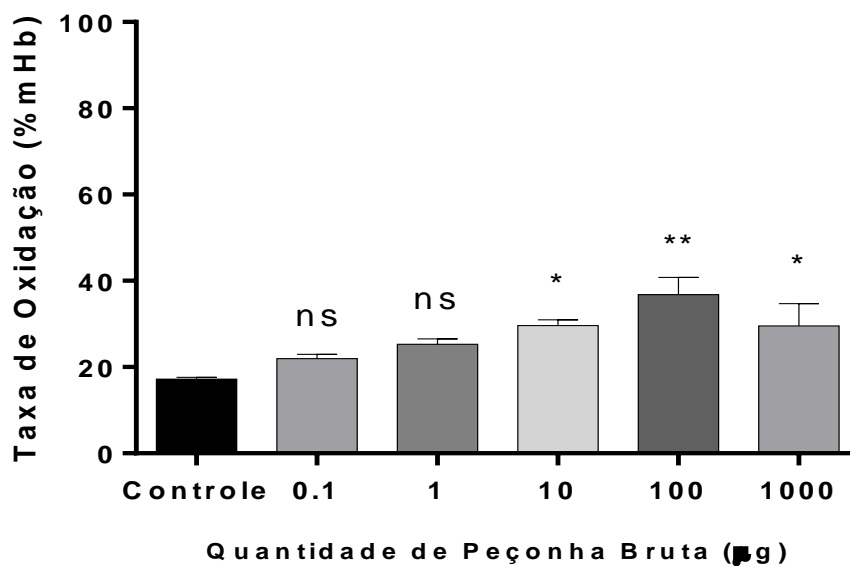
Na atividade anti-oxidante sobre a hemoglobina, as peçonhas brutas de ambas espécies, apresentaram efeito oxidante significativo, quando utilizado a fenilhidrazina (PH) (um agente oxidante) ( $p < 0,01$ ). A peçonha bruta de *B. jararacussu* quando associado com fenilhidrazina, em todas as concentrações testadas, apresentou efeito oxidante significativo, maior do que a peçonha bruta de *B. moojeni* ( $p < 0,001$ ) (Figuras 14 e 15).

**Figura 14** - Atividade anti-oxidante da peçonha bruta de *B. jararacussu*.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n = 3). ns: não significante. \*\*\*:  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*:  $p < < 0,0001$  (ANOVA e Dunnett).

**Figura 15** - Atividade anti-oxidante da peçonha bruta de *B. moojeni*.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n = 3). ns: não significante. \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$  (ANOVA e Dunnett).

Na atividade oxidante, a peçonha bruta de *B. jararacussu* não promoveu a formação de metahemoglobina após a exposição da hemoglobina contra diferentes quantidades da peçonha bruta. A metahemoglobina é a forma oxidada da hemoglobina (oxihemoglobina), cujo  $\text{Fe}^{2+}$  da porção heme está oxidado ao estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e, por isso, não consegue se ligar ao oxigênio (BARAKA, 2001). A oxihemoglobina pode reagir com a fenilhidrazina, formando não somente peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e metahemoglobina, mas também o radical fenilhidrozil, o qual pode gerar  $\text{O}_2$  e radicais intermediários, como fenildiazeno e íon benzenodiazônico (GOLDBERG; STERN, 1976; MISRA; FRIDOVICH, 1976; CHAKRABARTI et al, 1995).

A ação oxidante da peçonha bruta de *B. moojeni*, na quantidade de 1000  $\mu\text{g}$ , pôde ser relacionada com a ação das L-aminoácido oxidase. Ao analisar o perfil proteico da peçonha bruta de *B. moojeni* foi possível detectar, na SDS-PAGE, a presença dessa proteína na *Fr10*, com bandas proteicas de aproximadamente de 70 kDa (Figura 7). No perfil proteico da peçonha bruta de *B. jararacussu* também foi possível observar a presença desta proteína, na SDS-PAGE, na *Fr13* (Figura 5).

As LAAOs são flavoenzimas diméricas, glicosiladas, que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de uma vasta gama de L-aminoácidos, para formar alfacetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia. O peróxido de hidrogênio formado já foi relacionado à toxicidade do veneno (RODRIGUES et al., 2009; NAUMANN et al., 2011).

Em condições desnaturantes, analisadas por SDS-PAGE, ou por espectrometria de massa (MALDI-TOF), a massa de cada monômero das LAAOs isoladas de peçonhas de serpentes, é entre 50 a 70 kDa (DU; CLEMETSON, 2002). Stábelli et al (2007) isolaram e caracterizaram uma L-aminoácido oxidase de *B. moojeni*, denominada BmooLAAO-I com massa molecular de 64,889 kDa.

O papel fisiológico das LAAOs das peçonhas de serpentes, ainda não foi totalmente descrito. Especula-se que essa proteína estocada nas glândulas de peçonha, pode estar relacionada com a conservação e estabilização da peçonha e das próprias glândulas, em virtude de suas propriedades antibacterianas (FOX, 2013). Apesar dos mecanismos de ação dessas enzimas serem pouco conhecidos, muitos trabalhos já descreveram uma ampla variedade de efeitos farmacológicos, como indução de apoptose, edema, hemólise, hemorragia e efeito bactericida, citotóxico, microbicida, antiparasitário, antitumoral, na agregação plaquetária, dentre outros (CISCOTTO et al., 2009; DU; CLEMETSON, 2002; GUO et al., 2012; IZIDORO et al., 2006; 2014; NAUMANN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2009; STÁBELI et al., 2004, 2007; TEMPONE et al., 2001).

Muitos desses efeitos farmacológicos podem estar relacionados, ao menos em parte, com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) produzido durante a reação química catalisada pelas LAAOs, o qual contribui para a toxicidade do empeçonhamento através do estresse oxidativo decorrente (FOX, 2013; GUO et al., 2012; NAUMANN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2009; STÁBELI et al., 2007; WEI et al., 2003).

Na atividade anti-oxidante as peçonhas brutas de ambas espécies, não protegeram a oxidação da hemoglobina pela fenilhidrazina (um agente oxidante). Em contrapartida, observou-se que, quando adicionado as diferentes quantidades da peçonha bruta após adição da fenilhidrazina, o efeito oxidante foi potencializado (Figura 14 e 15).

A fenilhidrazina é um exemplo clássico de droga que induz dano oxidativo ao eritrócito de indivíduos saudáveis. Historicamente, esta droga foi usada no tratamento de policitemia *vera* e foi relacionada, *in vivo*, com hemólise intravascular associada à metahemoglobinemia e formação de corpos de Heinz. Em eritrócitos normais, a fenilhidrazina causa, *in vitro*, a desnaturação oxidativa da hemoglobina e efeitos deletérios sobre as proteínas e lipídios da membrana (STERN, 1989).

A fenilhidrazina age causando degradação do citoesqueleto da membrana, principalmente da espectrina, sem afetar as glicoproteínas. Esta degradação pode ser gerada pelos radicais intermediários formados da reação entre fenilhidrazina e hemoglobina. A proteína banda 3 e a espectrina também podem sofrer agregação causando o aumento da rigidez e alterações da forma do eritrócito. Estas alterações podem causar o sequestro e a destruição, pelo baço, dos eritrócitos lesados (CHAKRABARTI et al, 1995; HASHMI; SALEEMUDDIN, 1996).

Os eritrócitos podem ser considerados como sequestradores de radicais livres, pois eles podem fornecer proteção antioxidante não só para si mas também para outros tecidos e órgãos do corpo (MENDIRATTA, 1998; SIEMS, 2000). As atividades antioxidantes observadas em eritrócitos não necessariamente refletem as atividades antioxidantes do organismo como um todo. Além disso, existem variações genéticas entre os indivíduos que resultam em expressão gênica alterada levando a efeitos variados e potencialmente indesejados na atividade antioxidante (ARBOS et al., 2008).

#### 4.6 Avaliação da atividade coagulante das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* sobre o plasma humano.

A atividade coagulante das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni* foram avaliados sobre plasma humano citratado e a análise dos resultados permitiu nos inferir que, em ambas as espécies, o tempo de coagulação observado foi de forma dose-dependente, pois quanto maior foi a dose da peçonha bruta utilizada, menor foi o tempo observado de formação do coágulo (Figura 16).

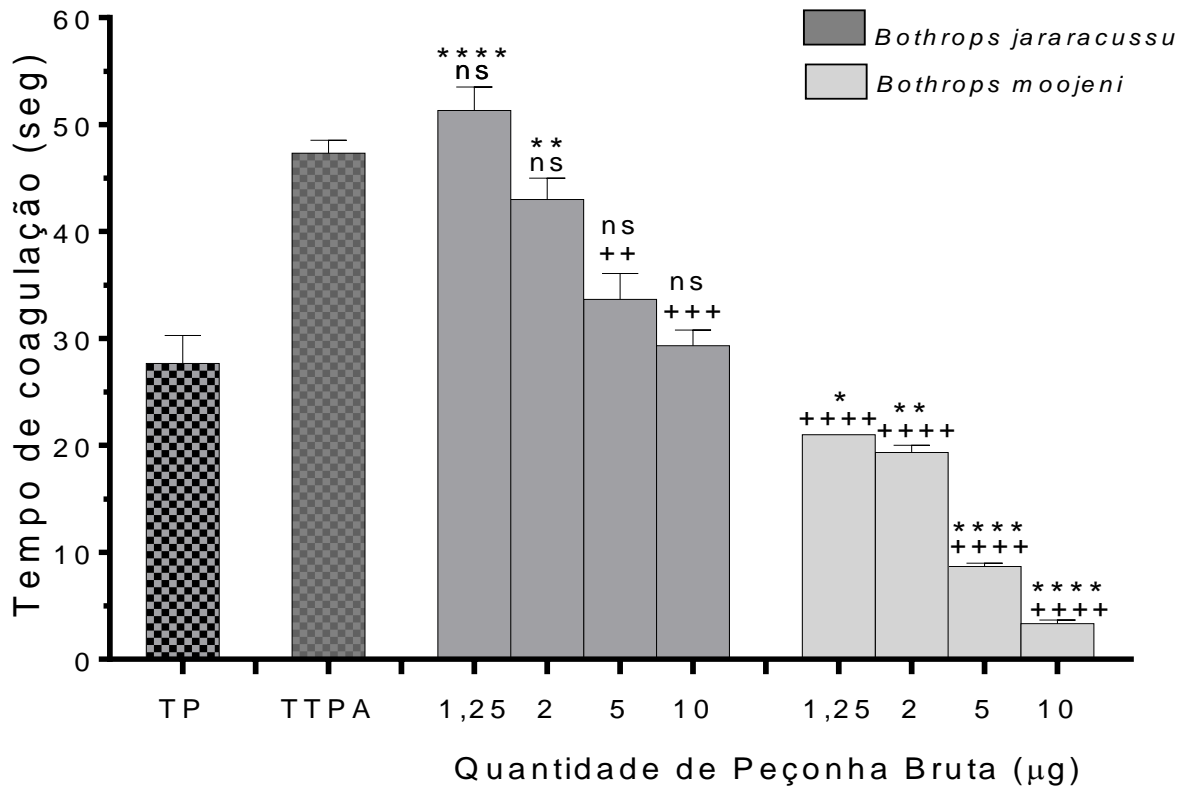
As peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* apresentaram atividade coagulante *in vitro* significativa, sendo que esse efeito farmacológico foi mais evidente na peçonha bruta de *B. moojeni*. Observou-se a diminuição do tempo, em segundos, da formação do coágulo do plasma humano citratado, causado pelas presenças das peçonhas brutas de *B. jararacussu* (51, 43, 34, 29s) e *B. moojeni* (21, 19, 9, 3s) devido à presença de quantidades crescentes da peçonha bruta (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 $\mu$ g) (Figura 16).

Como controle do tempo de formação do coágulo e, também, para avaliar as vias de atuação das peçonhas brutas, foram utilizados os testes de coagulação TP e TTPA. A via extrínseca ou comum da coagulação pode ser avaliada utilizando o tempo de protrombina (TP), enquanto que a via intrínseca pode ser avaliada utilizando o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) (SMITH, 2009).

O teste mais comumente empregado para verificação do mecanismo intrínseco da coagulação é o tempo tromboplastina parcial ativado (TTPA) (SWENSON, 1996). Após adição de cálcio, fosfolípidios de carga negativa e de uma substância particulada, como caulim (silicato de alumínio), os fatores XII e XI são ativados por essas substâncias, há formação do coágulo e, o TTPA pode ser determinado (MAJERUS, 2003). Já o TP fornece indicação sobre a quantidade total de protrombina presente no sangue. Esse teste é usado para identificar as anormalidades dos fatores envolvidos no sistema no sistema extrínseco, (protrombina e fatores V, VII e X) (GUYTON; HALL, 2002).

Os tempos dos testes TP (Tempo de Protrombina - 28s) e TTPA (Tempo Tromboplastina Parcial Ativada - 47s) foram avaliados sobre um *pool* de plasma humano e, quando comparados com o tempo de formação de coágulo na presença da peçonha bruta de *B. jararacussu*, o tempo para formar os coágulos pela presença da peçonha bruta de *B. moojeni* foi menor em relação ao teste TP (Figura 16).

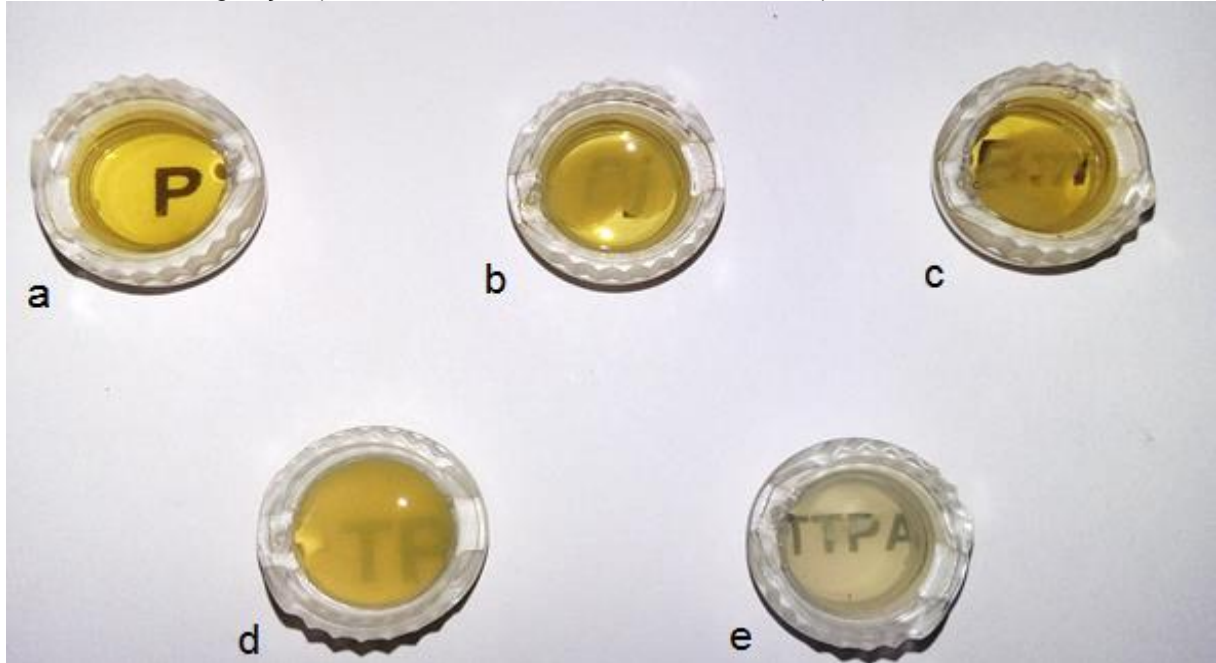
**Figura 16** – Avaliação da atividade coagulante, em plasma humano citratado, na presença da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* e pelos testes de coagulação PT HEMOSTASIS e APTT HEMOSTASIS.



Tempo de coagulação induzido pelas peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*. PB: peçonha bruta, TP (Tempo de Protrombina) e TTPA (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n=3). ns: não significativo. \* : p<0,01; \*\* ou ++: p<0,001; \*\*\* ou +++: p<0,0001 e \*\*\*\*: p<<0,0001 (\*: TP e +: TTPA).

A visualização do coágulo formado na presença das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, apresentaram características macroscópicas semelhantes, descritas como um coágulo de aspecto turvo, textura flexível e estável (Figura 17).

**Figura 17**– Aspecto físico comparativo entre o plasma citratado humano e os coágulos formados na presença da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, e na presença dos reagentes dos testes de coagulação (PT HEMOSTASIS e APTT HEMOSTASIS).



Em (a) plasma citratado humano e os coágulos formados na presença de 10 $\mu$ g da peçonha bruta de (b) *Bothrops jararacussu* e (c) *Bothrops moojeni*, na presença dos reagentes dos testes de coagulação (d) PT HEMOSTASIS Ref. 501 (lote #5005) e (e) APTT HEMOSTASIS Ref. 502 comercializado pelo Labtest Diagnóstica S.A. **Fonte:** Pesquisa direta, 2017.

O aspecto físico dos coágulos formados na presença das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* foram comparados com o plasma humano citratado, com os coágulos formados na presença do teste de coagulação PT HEMOSTASIS e APTT HEMOSTASIS, comercializados pela Labtest Diagnóstica S/A. A aparência física do coágulo formado na presença do teste de coagulação PT HEMOSTASIS pôde ser descrita como um coágulo turvo, rígido e estável; características visualmente parecidas com as observadas na presença da peçonha bruta de *B. jararacussu* e *B. moojeni*. Já, a aparência física do coágulo formado na presença do teste de coagulação APTT HEMOSTASIS pôde ser descrita como um coágulo hialino e instável; características visualmente distintas das observadas nos coágulos formados na presença das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* (Figura 17).

Na maioria das peçonhas do gênero *Bothrops*, a ação coagulante ocorre devido à ação de enzimas capazes de hidrolisar o fator X (metaloproteases), a protrombina (metaloproteases) e/ou o fibrinogênio (serinoproteases) (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003). A peçonha botrópica ativa a hemostasia, provocando coagulopatia e trombopatia (TANJONI et al., 2003). Os acidentes botrópicos provocam incoagulabilidade sanguínea,

hipofibrinogenemia, aumento dos produtos de degradação da fibrina e fibrinogênio (PDFs) e redução da antiplasmina; prolongamentos dos tempos de protrombina (TP), de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e de coagulação (TC), além do consumo dos fatores de coagulação V e VIII (BOGARIN et al., 2000, JÁCOME et al., 2002).

A peçonha bruta de *B. moojeni* apresentou tempo de formação do coágulo, menor do que a peçonha de *B. jararacussu*, que pôde ser relacionada com a via de atuação das proteínas coagulantes presentes em cada peçonha.

As enzimas trombina-like, pertencentes à uma classe de serinoproteinases, estão presentes na peçonha de serpentes da família Viperidae. *In vitro*, causam coagulação do sangue, porém, *in vivo*, tornam o sangue incoagulável, pois, esgota o fibrinogênio (MAGALHÃES et al., 2007). Ao analisar o perfil proteico da peçonha bruta de *B. jararacussu* foi possível detectar, na SDS-PAGE, a presença dessa classe de proteína na fração *Fr12*, com banda proteica de aproximadamente de 28 kDa, que pode ser associada a Jararacussina-I (BORTOLETO et al., 2002). (Figura 5). Já, no perfil proteico de *B. moojeni* foi possível observar, na SDS-PAGE, a presença dessa proteína na fração *Fr12*, com banda proteica de aproximadamente de 30 kDa, a qual pôde ser associada a BmooSP, uma serinoproteinase (OLIVEIRA et al., 2016) (Figura 7).

Serrano e colaboradores (1993) descreveram uma toxina da peçonha de *Bothrops moojeni*, a serinoproteinase 2 (MSP<sub>2</sub>), com massa molecular de 38 kDa; com atividade proteolítica e sobre a coagulação. Uma enzima semelhante à trombina (trombina-like), chamada BjussuSP-I, isolada da peçonha de *B. jararacussu*, foi caracterizada como uma glicoproteína de cadeia única ácida com massa molecular de 61 kDa, (pI ~3,8). A BjussuSP-I apresentou elevada atividade proteolítica sobre substratos sintéticos e mostrou atividade procoagulante semelhante à calicreína, mas foi incapaz de atuar sobre plaquetas e plasmina (SANT'ANA et al., 2008).

Já foram descritos, na literatura, metaloprotease ativadoras de protrombina e do fator X. Uma proteína isolada da peçonha de *Bothrops atrox* com massa molecular de 70 kDa e outra proteína isolada de *Bothrops neuwiedi* de 60 kDa são exemplos de metaloprotease ativadora de protrombina. Metaloproteases ativadoras do Fator X, já foram isoladas das peçonhas de *B. atrox* (65 kDa), *B. erythromelas* e *B. jararaca* e todas foram descritas como sendo dependentes de íon cálcio (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003). Ao analisar o perfil proteico da peçonha bruta de *B. jararacussu* é possível detectar a presença desta proteína na fração *Fr11*, com bandas proteicas de aproximadamente de 20 kDa, que pode ser relacionada a uma metaloprotease (BmooMP $\alpha$ -I), dependente de zinco de classe P-I, possui massa molecular de 22,6 kDa (BERNARDES et al., 2008) (Figura 5). Já no perfil proteico da peçonha bruta de *B. moojeni* é possível detectar a presença desta proteína na fração *Fr14*, com bandas

proteicas de aproximadamente de 25 kDa, pode ser relacionada com a à metaloprotease da peçonha *B. jararacussu* (BjussuMP-II), uma metaloproteinase fibrinogenolítica não hemorrágica de 24 kDa (MARCUSSEI et al., 2007) (Figura 7). Já na fração Fr15 a peçonha bruta de *B. moojeni* é possível detectar a presença desta proteína, que pode ser associada à metaloprotease da peçonha *B. jararacussu* (BjussuMP-I), caracterizada como metaloprotease hemorrágica de classe P-III, de 60 kDa (MAZZI et al., 2007).

Suntravat e colaboradores (2010) realizaram um estudo com 28 peçonhas de serpentes da família Viperidae e Elapidae, onde analisaram a capacidade pró coagulante dessas peçonhas. Dentre os resultados obtidos, a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi capaz de induzir não apenas uma atividade pró coagulante sobre plasma humano, mas também foi capaz de ativar fator X, gerando fator X ativado.

A moojenactivase (MooA) é uma metaloprotease do veneno de *B. moojeni*, de 85,746.22 Da, que possui ação pró-coagulante, por induzir a formação da rede de fibrina no plasma pela ativação dos fatores de coagulação II e X e protrombina. Isso leva a ativação do fator Xa e, conseqüentemente, trombina, sendo a última responsável pela formação da rede de fibrina (SARTIM, 2016).

A análise comparativa entre os tempos de coagulação do plasma citratado humano na presença das peçonhas brutas avaliadas (*B. jararacussu* e *B. moojeni*) e os tempos de formação dos coágulos formados pelos testes comerciais de coagulação TP e TTPA possibilitou inferir que ambas as peçonhas atuam na cascata de coagulação pela via extrínseca (fatores do complexo protrombínico) e via comum (fibrinogênio e fibrina).

## 5. CONCLUSÕES

✓ A composição das peçonhas brutas de *Bothrops jararacussu* e *B. moojeni* mostraram perfis proteicos similares. Na eletroforese, foram observadas bandas proteicas comuns as duas espécies, relacionados com as proteínas de massas moleculares das classes, fosfolipases A<sub>2</sub>, lectinas, LAAOs, serinoproteases e metaloproteases.

✓ O efeito hemolítico indireto (na presença de ácido graxo e ácido graxo mais cloreto de cálcio) sobre eritrócitos humanos do sistema ABO, fator Rh+, causado pela presença das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* foram estatisticamente significativos. Quando comparados, a peçonha bruta de *B. jararacussu* apresentou maior potencial citotóxico do que a peçonha bruta de *B. moojeni*.

✓ A fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B, O e AB na presença das peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni*, foram avaliados em diferentes concentrações de cloreto de sódio e, foi observado que não apresentou efeito anti-hemolítico.

✓ Durante a realização dos experimentos para avaliar a atividade anti-hemolítica causada pela peçonha *B. jararacussu* sobre os eritrócitos de todos os grupos sanguíneos do sistema ABO foi observada hemaglutinação eritrocitária causada na presença das quantidades 100 e 1000µg, da peçonha.

✓ O efeito oxidante, sobre a hemoglobina humana, da peçonha bruta de *B. jararacussu* não apresentou diferença estatisticamente significativa e, portanto, não apresentou atividade oxidante das concentrações testadas. A peçonha bruta de *B. moojeni*, apresentou diferença estatisticamente significativa, promovendo a formação de metahemoglobina, apenas na última quantidade testada 1000µg.

✓ Na atividade anti-oxidante, em ambas espécies exibiram diferenças significativas, o efeito oxidante apresentado foi potencializado quando utilizados as peçonhas brutas concomitantemente a fenilhidrazina, não apresentando atividade anti-oxidante.

✓ As peçonhas utilizadas proporcionaram a formação de coágulos plasmáticos de forma dose-dependente e foram indiretamente proporcionais à quantidade utilizadas. Pôde-se verificar que a peçonha bruta de *B. moojeni* apresentou maior potencial coagulante em relação a peçonha de *B. jararacussu*.

## REFERÊNCIAS

- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic fosfolipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of *Bothrops asper* (Viperidae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 36, p. 263-265, 1988.
- AMORIM, A. M. V., et al. Eficácia do citrato como anticoagulante na hemodiálise veno-venosa contínua com ciclo de 60 horas em unidade de terapia intensiva. **ConScientiae Saúde**, vol. 9, n. 2, p. 187-193, 2010.
- APARICIO, R. M. et al. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.
- ANDE, S. R.; KOMMOJU, P. R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P. GHISLA, S.; FERRANDO-MA Y, E. Mechanism Cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of opidian venom. **Apoptosis**, v. 11, n.8, p. 1439-1451, 2006.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755-763, 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES MRM, FULY AL, CORRÊA FMA, ROSA JC, GREENE LJ, GIGLIO JR. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem Pharmacol.**, v. 64, p. 723-732, 2002.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v. 1, 904p., 2010.
- ARAGÓN-ORTIZ, F.; BRENES-BRENES, J. R.; GUBENSEK, F. Characterization and properties of a lectin-like protein from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 28, p.143, 1990.
- ARBOS, K. A.; CLARO, L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT- SANTOS, M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008.
- ASAZUMA, N.; OZAKI, Y.; SATOH, K.; YATOMI, Y.; HANDA, M.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; KUME, S. Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets. **Blood.**, v. 90, p. 4789-98, 1997.
- BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecular. **Emergency Medicine**, v. 13, p. 28-36, 2001.
- BARAKA, A. S.; AYOUB, C. M.; KADDOUM, R. N. et al. Severe oxyhemoglobin desaturation during induction of anesthesia in a patient with congenital methemoglobinemia. **Anesthesiology**, v. 95, p. 1296-1297, 2001.
- BARBOSA, P. S. F. et al. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 16, n. 3, p. 493-504, 2010.

BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do Sistema Sar ABO. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 25, n. 1, p. 47-58, 2003.

BENNETT, E. P.; STEFFENSEN, R.; CLAUSEN, H.; WEGHUIS, D. O.; VAN KESSEL, A. G. Genomic cloning of the human histo-blood group ABO locus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 206, p. 318-325, 1995.

BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; COSTA, T. R.; GOMES, M. S.; TORRES, F. S.; COSTA, J.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; SANTOS, D.M.; CASTRO PIMENTA, A. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 574–584, 2008.

BERNADONI, J. L. et al. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109651, 2014.

BOGARÍN, G. et al. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, v. 38, n. 10, p.1429-41, 2000.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1307-12, 2002.

BRATOSIN, D.; ESTAQUIER, J.; PETIT, F.; ARNOULT, D.; QUATANNENS, B.; TISSIER, J.P.; SLOMIANNY, C.; SARTIAUX, C.; ALONSO, C.; HUART, J.J.; MONTREUIL, J.; AMEISEN, J. C. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. **Cell Death Differ.**, v. 8, p. 1143-1156, 2001.

BRAVESdb. **Brazilian Venomous Snakes Database**. Disponível em: <[http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index.php?lan=pt\\_br](http://www.luar.dcc.ufmg.br/bravesdb/index.php?lan=pt_br)> Acesso em: 07 mar. 2017.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake Venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins Bitisgabonin-1 and Bitisgabonin-2. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 326-336, 2007.

CAMPBELL, J. A.; BRODIE, JR. **Biology of the pitvipers**. Selva, Tyler, Texas, p. 466, 1992.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of latin america. **Cornell Univ. Press.**, Ithaca, p. 425, 1989.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of western hemisphere. **Cornell Univ. Press.**, Ithaca, p. 1032, 2004.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

CARVALHO, D. D. **Purificação e caracterização de BJcuL, uma lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu***. 1997. 89f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. 1997.

CHAKRABARTI, S.; SONAYE, B.; NADC, A.; NADKARNI, B. Erythrocyte membrane protein damage by oxidation products of phenylhydrazine. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Marrickville, v. 35, n. 2, p. 255-263, 1995.

CHAVES-MOREIRA, D. **Estudo da atividade hemolítica do veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) e seus mecanismos moleculares**. Curitiba, 2008.107 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular e Molecular. 2008.

CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Prot Chem.**, v. 12, p. 57-64, 1993.

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

COSTA, N. C. S. **Caracterização parcial e avaliação do potencial antibacteriano e antitumoral de uma L-aminoácido oxidase isolada de *Bothrops jararacussu***. 2012. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, 2012.

DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537-540, 1996.

DJALDETTI, M.; FISHMAN, P.; BESSLER, H. Lectin-like effect of *Echis coloratus* Venom on human and mouse lymphocytes. **Exp Hematol.**, v. 8, p. 200- 208, 1980.

DU, X.Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. Review. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 659-665, 2002.

ELIAS, F., et al. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 413-418, 2004.

FERGUSON-SMITH, M.A.; AITKEN, D.A.; TURLEAU, C.; GROUCHY, J. Localization of the human ABO:Np-1:AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34. **Hum Genet.**, v. 34, p. 35-43, 1976.

FERNANDES, T. A.; AGUIAR, C. N.; DAHER, E. F. Envenenamento Crotálico: Epidemiologia, Insuficiência Renal Aguda e Outras Manifestações Clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2008.

FERNANDES, C. A. H.; BORGES, A. R. J.; LOMONTE B. B.; FONTES, M. R. F. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>-like proteins from viperid snake venoms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1844, p. 2265–2276, 2014.

FOX, J.W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-Amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75-82, 2013.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Molecular and cellular biology of blood coagulation. **New England Journal Medicine**, v. 326, p. 800-806, 1992.

GARTNER, T.K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D.C. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Lett.**, v. 117, p.13–16, 1980.

GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **Vet. J.**, v. 168, p. 238-51, 2004.

GHAZARYAN, N. A. et al. Phospholipases A<sub>2</sub> from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, p. 463-82, 2015.

GIRON, M. E.; SALAZAR, A. M.; AGUILAR, I.; PEREZ, J. C.; SANCHEZ, E. E.; AROCHA-PINANGO, C. L.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; GUERRERO, B. Hemorrhagic, coagulante and fibrino(geno)lytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology C.**, v. 147, n. 1, p. 113-121, 2008.

GOLDBERG, B.; STERN, A. The mechanism of superoxide anion generation by the interaction of phenylhydrazine with hemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry, Baltimore**, v. 251, n. 10, p. 3045-3051, 1976.

GRUPTA, R. K. PANDEA, A. H. GULLAA, K. C. GABIUS, H. J. HAJELA, K. Carbohydrate-induced modulation of cell membrane. VIII. Agglutination with mammalian lectin galectin-1 increases osmofragility and membrane fluidity of trypsinized erythrocytes. **FEBS Letters**, n. 580, p. 1691–1695, 2006.

GUO, C. et al. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, p. 302-311, 2012.

GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub> insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.

GUTIERREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n.7, p. 976-987, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiología Médica**, 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

HARRIS, J. R. **Blood cell biochemistry**. London: Plenum Press,. v. 3, Erythroid Cells. Cap. 7. 1991.

HASHMI, A.; SALEEMUDDIN, M. Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Marrickville, v. 40, n. 3, p. 543-550, 1996.

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

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M.; BINCOLETTA, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* (white-tailed-*jararaca*) snake venom, **Biochimie**, v. 89, n.3, p. 319-328, 2007.

HIRATA, Y.; ITO, M.; NIKAI, T.; KATO, S.; KOMORI, Y.; SUGIURA, H.; OHIZUMI, Y. Himehabu lectin, a novel inducer of Ca<sup>2+</sup> - release from the venom of the snake *Trimeresurus okinavensis*, in sarcoplasmic reticulum. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 51, p. 1207–1211, 1999.

HOGUE, A. R. **Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae)**. Mem. Inst. Butantan, p. 109-184, 1966.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. L.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n.7, p. 615-627, 1988.

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.

IWANAGA, S. Primitive coagulation systems and their message to modern biology. **Thromb Haemost.**, v. 70, p. 48-55, 1993.

IZIDORO, L.F.M. et al. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

JÁCOME, D., MELO, M.M., SANTOS, M.M.B. et al. Kinetics of venom and antivenom serum and clinical parameters and treatment efficacy in *Bothrops alternatus* envenomed dogs. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 44, n. 6, p. 334-338, 2002.

JAIN, N. C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Vet.**, 63: 411-23, 1973.

JAIN, S. K. *In vivo* Externalization of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in the membrane Bilayer and hipercoagulability by the Lipid Peroxidation of Erythrocytes in Rats. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 281-286, 1985.

KAYANO, A. M. **Isolamento, caracterização bioquímica e funcional de lectina do veneno de *Bothrops jararacussu***. 2016. 69 f. Dissertação (Biologia Experimental). Universidade Federal de Rondônia, 2006.

KELLEN, E.M.A.; ROSENFELD, G.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. II Variation in relation to erythrocyte species. **Mem. Inst. Butantan**, v. 30, p. 133-142, 1962.

KNIRSCH, M. C. **Síntese e caracterização de derivados de hemoglobina para aplicação terapêutica**. 2005. 112 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). São Paulo, 2015.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 27, p. 613-35, 1989.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-40, 2003.

LACERDA, J. B. **Leçons sur le venin des serpents du Brésil et sur la méthode de traitement des morsures venimeuses par le permanganate de potasse**. Rio de Janeiro, Lombaerts & C., p. 194, 1884.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-85, 1970.

LEE, A. H.; REID, M. E. ABO blood group system: a review of molecular aspects. **Immunohematology**, v. 16, n.1, p. 01-06, 2000.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev. Drug Disc.**, London, v. 2, n.10, p. 790-802, 2003.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v. 28, p. 1137–1146, 1990.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R. N. et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.146, p. 565-575, 2007.

MAJERUS P. W., TOLLEFSEN, D. M. **Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários**. In: Hardman J. G., Limbird L. E. & Gilman A. G. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica, 10 ed. McGraw Hill, Rio de Janeiro, 2003.

MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R. R.; MARCINKIEWICZ, M. M.; DANIEL, J. L.; SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C. Isolation and characterization of EMS16, a C-lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alpha2beta1 integrin. **Biochemistry**, v. 39, p. 9859– 9867, 2000

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; OLIVEIRA, C. Z.; IZIDORO, L. F. M.; FULY, A. L.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v. 28, p. 2328-2339, 2007.

MARKLAND, F. S. JR. Snake venoms. **Drugs**, v. 54, n.3, p. 1-10, 1997.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1171-1181, 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MAZZI, V. M.; MAGRO, A. J.; AMUI, S. F.; OLIVEIRA, C. Z.; TICLI, F. T.; STÁBELI, R. G.; FULY, A. L.; ROSA, J. C.; BRAZ, A. S. K.; FONTES, M. R. M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjussuMP-I: A RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.*, v. 26, n. 1, p. 69–85, 2007.

MCDOWELL, S. B. Snakes: ecology and evolutionary biology. **Blackburn Press**, New Jersey, p. 3-50, 2001.

MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonhentas do Brasil**. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sarvier, São Paulo – SP, 2003.

MENDIRATTA, S.; QU, Z. C.; MAY, J. M. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. **Free Radic Biol Med.**, 24, 789-97, 1998.

MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. E. P. et al. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from *Bothrops atrox* snake venom. **Acta Biochim. Biophys. Sin.** (Shanghai), v. 43, n. 3, p. 181-92, 2011.

MESCHER, A. L. **Junqueiras's Basic Histology**. 13 ed. Bloomington, Indiana: McGraw Hill. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/acidentes-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 02 mar. 2017.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The oxidation of Phenylhydrazine: superoxide and mechanism. **Biochemistry**, Washington, v. 15, p. 681-687, 1976.

MONTAGNER, C. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A<sub>2</sub>. **J. Biochem.**, v. 131, n.3, p. 285- 292. 2002

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, 2004.

NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F. F, EBLE, J. A, SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.

NUNES, D. C.; RODRIGUES, R. S.; LUCENA, M. N.; COLOGNA, C. T.; OLIVEIRA, A. C.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; ARANTES, E. C.; TEIXEIRA, D. N.; UEIRA-VIEIRA, C.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 154, n. 3, p. 226-233, 2011.

OGAWA, T.; CHIJIWAB, T.; ODA-UEDAB, N.; OHNOB, M. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1-14, 2005.

OHKURA, M.; MIYASHITA, Y.; NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; OHIZUMI Y. Properties of Ca<sup>++</sup> release induced by puff adder lectin, a novel lectin from the snake *Bitis arietans*, in sarcoplasmic reticulum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 277, p. 1043-1048, 1996.

OLIVEIRA, H. F. A.; LEITE, R. S.; COST, C. F. Aspectos clínico epidemiológicos de acidentes com serpentes no município de Cuité, Brasil. **Gazta Médica da Bahia**, v. 81(1):14-19, 2011.

OLIVEIRA, F.; DE SOUSA, B. B.; MAMEDE, C. C. N.; DE MORAIS, N. C. G.; DE QUEIROZ, M. R.; CUNHA PEREIRA, D. F.; MATIAS, M. S.; HOMI BRANDEBURGO, M. I. Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 111, p.130-138, 2016.

OLSSON, M. L; IRSHAID, N. M; HOSSEINI-MAAF, B; HELBERG, A; MOULDS, M. K; SARENEVA, H; CHESSER, A. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood

grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 585-1.593, 2001.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B. C. K.; MIGUEL, O. G. M.; MIGUEL, M. D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 189-195, 2014.

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.

RIVIERO, J. V. R. **Avaliação da atividade não citotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu* em células mononucleares do sangue periférico**. 2010. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde). Goiânia, 2010.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, F. J.; FRANÇA, B. J.; FONSECA, P. P. F.; OTAVIANO, R. A.; SILVA, H. F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, J. A.; BRAZ, K. S. A.; SANTOS, I. J.; HOMSI-BRANDEBURGO, I. M.; FONTES, M. R. M.; FULY, L. A.; SOARES, M. A.; RODRIGUES, M. V. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-aminoacid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochemie**, v. 91, p. 490-501, 2009.

ROSENBERG, P. **Pharmacology of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms**. Snake Venoms: Handbook for experimental pharmacology. Berlin: Ed. Springer, 1979. p. 403-447, v. 53.

ROSENBERG, P. The Relationship Between Enzymatic Activity and Pharmacological Properties of Phospholipases In: HARRIS, J. B. **Natural Toxins**, Oxford' Ed. Oxford University Press, p. 129—74. 1986.

ROSENBERG, P. Pitfalls to avoid in the study of correlations between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. In: KINI, R. M. **Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism**. England: Ed. Wiley, Chichester, p. 155—83, 1997.

SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Sarvier, p. 289-309, 2003.

SANT'ANA, C. D. et al. BjuSSuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 151, n. 3, p. 443-54, 2008.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. Y. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F. D.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub> inducer phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

SARTIM, M. A. **Isolamento, caracterização bioquímica e funcional *in vitro* e *in vivo* de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação**. 2014. 178 f. Tese (Toxicologia). Universidade de São Paulo, 2014.

SARTIM, M. A., et al. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIII<sup>d</sup> metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Arch. Toxicol.**, v. 90, n. 5, p. 1261-1278. 2016.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SCHENBEL-BRUNNER, H. **Human Blood Groups. Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity**. 2 ed. Springer Wien New York, 2000.

SCHREIER, H. et al. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 215-223, 1997.

SERRANO, S. M. T.; MATOS, M. F. C.; MANDEULBAUM, F. R. & SAMPAIO, C. A. M. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom-I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP<sub>1</sub> and MSP<sub>2</sub>, on syntetic substrates and platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 471-481, 1993.

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.

SIEMS, W. G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clin. Nephrol.**, 53, S9-S17, 2000.

SILVA, JR.; AIRD, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 128, p. 425-456, 2001.

SILVEIRA, L. B.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVA, F. P. JR.; MARCUSSI, S.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops moojeni* snake venom. **J. Pharm. Biomed. Anal**, 2013.

SINAN. **Sistema Nacional de Agravos de Notificação / Ministério da Saúde**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/1-Casos-Ofidismo-2000-2015.pdf>> Acesso em: 06 mar. 2017.

SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. **J. Vet. Emerg. Crit. Care**, v. 19, p. 3-10, 2009.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503–514, 1998.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of a myotoxin I from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 7–15, 2000.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipases A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, p. 1677–1690, 2004.

SPRAGUE, R.S.; ALAN H. STEPHENSON, A.H.; ELLSWORTH, M.L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 18, n. 9, p. 350-355, 2007.

STÁBELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STÁBELI, R.G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 132-140, 2007.

STEINBERG, M. H.; BENZ JR, E. J.; ADEWOYE, A. H.; EBERT, B. L. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. **Hematology: Basic Principles and Practice**. 5 ed. Elsevier Inc.; p. 427–438, 2009.

STERN, A. Drug-induced oxidative denaturation in red blood cells. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 26, n. 4, p. 301-306, 1989.

STOCKER, K. Composition of snake venom, Medical Use of Snake Venom Proteins. **CRC Press**, Boca Raton. p. 33-56, 1990.

SUNTRAVAT, M.; NUCHPRAYOON, I.; PÉREZ, J. C. Comparative study of anticoagulant and procoagulant properties of 28 snake venoms from families Elapidae, Viperidae, and purified Russell's viper venom-factor X activator (RVV-X). **Toxicon**, 2010.

SWENSON, M. J. **Circulação sanguínea e sistema cardiovascular**. In: Swenson M.J. & Reece W.O. *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*, 11 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

TAN, N. H.; FUNG, S. Y. Snake venom L-amino acid oxidases and their potencial biomedical applications. **Mal. J. Biochem.**, Mol. Biol., 2008.

TANI, M.; ITO, M.; IGARASHI, Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. **Cell Signal**, v. 19, p. 229–237, 2007.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L. et al. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 801-808, 2003.

TEMPONE, A.G. et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 620-624, 2001.

TRIPLETT, D. A. Coagulation and bleeding disorders: review and update. **Clin. Chem.**, v. 46, p. 1260-9, 2000.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A<sub>2</sub> and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1488, p. 59-70, 2000.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochimie**, v. 82, p. 815-31, 2000.

VERHEIJ, H.; VOLWERK, J.; JANSEN, E. H.; PUYK, W.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J. et al. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A<sub>2</sub>. **Eur. J. Biochem.**, v. 1, n. 12, p. 2532, 1980.

VITAL BRAZIL, O. **Peçonhas**. In: Farmacodinâmica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1044-1072, 1982.

UETZ, P.; FREED, P.; JIRÍ HOŠEK. **The Reptile Database**. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>> Acesso em: 06 mar. 2017.

WARRELL, D. A. Snake Bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

WATKINS, W. M. **Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems**. Ed. Advances in Human Genetics, v.10. New York: Plenum Press; 1980:1-136.

WEI, J.F. et al. Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica-Chinese Edition**, v. 35, p. 219-228, 2003.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of a Ctype mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. **Nature**, v. 360, p. 127-134, 1992.

YAMAMOTO, F.; CLAUSEN, H.; WHITE, T., MARKEN, J.; HAKOMORI, S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. **Nature**, v. 345, p. 229-233, 1990.

YAMAMOTO, F.; HAKOMORI, S. Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferase is based on amino acid substitutions. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n.19, p. 257-262. 1990.

YAMAMOTO, F.; MCNEILL, P. D.; HAKOMORI, S. Human histoblood group A<sub>2</sub> transferase coded by A<sub>2</sub> allele, one of the A subtypes, is characterized by a results in an additional domain at the carboxyl terminal. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.187, p. 366-374, 1992.

YOSHIDA, A.; YAMAGUCHI, Y. D.; DAVE, V. Immunologic homology of human blood group glycosyltransferases and genetic background of blood group (ABO) determination. **Blood**, v. 59, p. 344-350, 1979.

YU, L.; DEEMS, R. A.; HAJDU, L.; DENNIS, E. A. The interaction of phospholipase A<sub>2</sub> with phospholipid analogues and inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 5, p. 2657-2664, 1990.

YU, C. L.; HUANG, M. H; KUNG, Y., Y; TSAI, Y. Y; TSAI, S. T; HUANG, D. F; SUN, K. H; HAN, S. H; YU, H. S. Interleukin-13 increases prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. **Inflamm. Res.**, v. 47, n. 4, p. 167-173, 1998.

ZAGO MA, TAVELLA MH, SIMÕES BP, FRANCO RF, GUERREIRO JF, SANTOS SB. Racial heterogeneity of DNA polymorphisms linked to the A and the O alleles of the ABO blood group gene. **Ann Hum. Genet.**, v. 60, p. 67-72, 1996.

ZAQUEO, K. D. et al. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 13, 2014.

**ANEXO 01**

Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UCDB

**ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA QUE ENTRE SI CELEBRAM, DE UM LADO, A UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO - UCDB E, DE OUTRO, UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB**

A **UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO**, mantida pela **MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO**, pessoa jurídica de direito privado, associação civil sem fins lucrativos, inscrita no CNPJ/MF sob nº 03.226.149/0015-87, estabelecida na Av. Tamandaré, 6.000, em Campo Grande/MS, doravante designada simplesmente **UCDB**, neste ato representada por seu Magnífico Reitor **Pe. José Marinoni**, portador do RG nº 219039 SSP/MS, e do CPF nº 127554511-49, e de outro lado, a **UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**, inscrita no CNPJ/MF sob o n.º 24.098.477/0001-10, sediada na Cidade Universitária, bairro Castelo Branco, em João Pessoa/PB, doravante designada simplesmente **CPr-Lab - UFPB**, neste ato representada por sua Magnífica Reitora professora **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, portadora da Cédula de Identidade nº 394.612 SSP-PB, CPF n.º 323.157.164-20, domiciliada na cidade de João Pessoa/PB, resolvem celebrar o presente Acordo de Cooperação Técnica e Científica, regido pelas cláusulas e condições seguintes:

**CLÁUSULA PRIMEIRA - DO OBJETO**

O presente Acordo objetiva a conjunção de esforços entre as partes, mediante utilização de recursos técnicos e/ou materiais disponíveis, para a implementação de atividades de aprofundamento do conhecimento técnico-científico de qualificação e capacitação voltadas à formação de recursos humanos e obtenção de resultados científicos na área de Biologia Molecular Estrutural com a utilização de toxinas isoladas de venenos de serpentes e/ou venenos brutos.

**SUBCLÁUSULA PRIMEIRA** - A implementação dos objetivos deste Acordo será realizada em conformidade com as descrições constantes do documento anexo denominado **Plano de Trabalho**, o qual, uma vez rubricado pelas partes, passa a integrar o presente instrumento, independentemente de transcrição sob a forma de termos aditivos.

**SUBCLÁUSULA SEGUNDA** - As atividades de aprofundamento do conhecimento técnico-científico de qualificação e capacitação incluem a participação em cursos, seminários, congressos, palestras, e outras atividades inerentes e correlatas à área de Biologia Molecular Estrutural.

**CLÁUSULA SEGUNDA - DO LOCAL DE EXECUÇÃO**

As atividades de qualificação e capacitação, bem como outras atividades inerentes e necessárias para a consecução do objeto deste instrumento, poderão ser executadas nas áreas físicas, complexos educacionais e de treinamentos estabelecidos em ambas às instituições.



### **CLÁUSULA TERCEIRA - DA COORDENAÇÃO**

A Coordenação do objeto deste Acordo ficará, por parte da UFPB, sob a responsabilidade da Professora **DANIELA PRISCILA MARCHI SALVADOR**, Matrícula SIAPE 1775477, Coordenadora do Laboratório de Cristalografia de Proteínas, CPr-Lab do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB, a qual será responsável por todas as ocorrências relacionadas à sua execução, determinando o que for necessário para a regularização das faltas ou incorreções observadas.

### **CLÁUSULA QUARTA - DAS OBRIGAÇÕES**

Visando à consecução dos objetivos propostos, além das demais obrigações constantes desse instrumento, as partes comprometem-se especificamente a:

#### **I - OBRIGAÇÕES DA UCDB:**

- a) Permitir que técnicos, pesquisadores (docentes) e discentes integrantes do seu quadro de pessoal desenvolvam ações voltadas ao desenvolvimento dos objetivos propostos com efetivação do presente Acordo;
- b) Possibilitar acesso à infraestrutura disponível no *campus* necessárias para execução dos objetivos propostos no presente Acordo;
- c) Disponibilizar e ceder material biológico (veneno bruto e/ou toxinas isoladas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*) para realização de experimentos biológicos propostos nos objetivos do presente Acordo;
- d) Captar, capacitar e qualificar recursos humanos para executar ações (extração de peçonhas de serpentes) relacionadas ao cumprimento dos objetivos propostos no presente Acordo;

#### **II - OBRIGAÇÕES DO UFPB, através do CPr-Lab:**

- a) Disponibilizar discentes integrantes de projetos de pesquisa coordenados pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **DANIELA PRISCILA MARCHI SALVADOR** e/ou por docentes colaboradores para desenvolverem ações voltadas à execução dos objetivos propostos no presente acordo e seus termos aditivos;
- b) Disponibilizar pesquisadores (docentes), mediante autorização do setor de lotação competente e respeitando a compatibilidade entre a carga horária acadêmica e as horas dispensadas as atividades abrangidas por este acordo;
- c) Permitir acesso à infraestrutura e aos materiais consumíveis disponíveis no Laboratório de Cristalografia de Proteínas - CPr-Lab ou em demais laboratórios parceiros para proporcionar condições necessárias para executar os objetivos propostos no presente Acordo;
- d) Realizar experimentos de avaliação de efeitos biológicos de venenos brutos e de suas respectivas frações proteicas isolados de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* na ausência e/ou na presença inibidores naturais e/ou



sintéticos bem como elucidar e analisar estruturas oligoméricas de proteicas isoladas de peçonhas de serpentes por cristalografia de raios X;

- e) Realizar estudos computacionais (topológicos, *docking*, de dinâmica molecular e filogenéticos) para avaliar as características pertinentes às PLA<sub>2</sub>s isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por estas enzimas;
- f) Captar e capacitar e qualificar recursos humanos para realização de ensaios biológicos e caracterização biofísicoquimicamente dos venenos brutos e as frações isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*;
- g) Publicar os resultados obtidos no decorrer da execução da presente parceria em eventos científicos e/ou na forma de artigos científicos, relatórios de iniciação científica, dissertações de mestrado e teses de doutorado.

#### **CLÁUSULA QUINTA - DOS RECURSOS HUMANOS**

Os recursos humanos utilizados pelas partes convenientes na execução deste Acordo, na condição de empregado, autônomo, empreiteiro, ou a qualquer outro título, nenhuma vinculação ou direito terá em relação à outra parte, ficando a cargo exclusivo da parte conveniente a integral responsabilidade no que se referem a todos os direitos das pessoas que contratar, mormente os trabalhistas e previdenciários, inexistindo qualquer solidariedade entre as partes neste sentido.

#### **CLÁUSULA SEXTA - DA TRANSFERÊNCIA DE RECURSOS**

Para execução do presente Acordo não haverá transferência ou repasse de recursos financeiros de quaisquer naturezas entre as Instituições convenientes.

**SUBCLÁUSULA ÚNICA** - Havendo a necessidade de transferência de recursos as partes deverão celebrar instrumento específico para tal finalidade.

#### **CLÁUSULA SÉTIMA - DA VIGÊNCIA**

O presente instrumento terá vigência de 5 (cinco) anos, a contar da data de sua assinatura.

**SUBCLÁUSULA ÚNICA** - O presente Acordo poderá, a qualquer tempo, ser denunciado, mediante aviso prévio de 45 (quarenta e cinco) dias.

#### **CLÁUSULA OITAVA - DA RESCISÃO**

Por decisão, em comum acordo por ambos os convenientes, o presente poderá ser rescindido ou, ainda, o mesmo poderá ser anulado por descumprimento de quaisquer de suas cláusulas ou condições por um dos contratados e, a parte prejudicada poderá rescindir o presente Acordo, mediante simples comunicação, escrita e fundamentada, à outra, respondendo a parte inadimplente pelas perdas

m  


e danos decorrentes, ressalvadas as hipóteses de caso fortuito ou de força maior, devidamente caracterizadas.

#### **CLÁUSULA NONA - DO FORO**

Para a solução de quaisquer controvérsias porventura oriundas da execução deste Acordo, em relação às quais não tenha havido entendimento amigável, as partes elegem o Foro da Justiça Federal da Cidade de João Pessoa-PB, com renúncia expressa a qualquer outro, por mais privilegiado que seja.

Estando assim justas e contratadas, firmam o presente instrumento em 03 (três) vias de igual teor e forma, na presença das testemunhas abaixo nomeadas e subscritas.

Campo Grande/MS, 21 de outubro de 2014.



**Pe. José Marinoni**

Reitor da Universidade Católica Dom Bosco



**Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**

Reitora da Universidade Federal da Paraíba

Testemunhas:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

**PLANO DE TRABALHO**  
**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPE**

**I - IDENTIFICAÇÃO**

<b>CONCEDENTE</b>	<b>CNPJ</b>
UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO	03.226.149/0015-87

<b>RESPONSÁVEL</b>	<b>CPF</b>	<b>RG</b>
JOSÉ MARINONI	127.554.511-49	219.039 SSP/MS

<b>CONVENENTE</b>	<b>CNPJ</b>
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	24.098.477/0001-10

<b>ENDEREÇO</b>	<b>CEP</b>
CIDADE UNIVERSITARIA, CASTELO BRANCO, JOÃO PESSOA/PB	58051-900

<b>ESFERA ADMINISTRATIVA</b>
Administração Pública Federal

<b>RAMO DE ATUAÇÃO</b>
EDUCAÇÃO SUPERIOR

<b>REPRESENTANTE LEGAL</b>	<b>CPF</b>	<b>RG</b>
Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz	323.157.164-20	394.612 SSP-PB

<b>OBJETO</b>
Execução de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> .

*MO*  


**PLANO DE TRABALHO**  
**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB**

**II - OBJETO/JUSTIFICATIVA**

**OBJETO**

*Execução de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus.*

**JUSTIFICATIVA**

O presente convênio possibilitará a extração de venenos de serpentes para realização de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus na tentativa de melhor compreender o(s) possível(eis) mecanismo(s) de ação(ões) destas enzimas.



PLANO DE TRABALHO  
Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPE

III - METAS

Meta	Descrição das metas e etapas	Data Inicial	Data Final
1	Extraír e caracterizar biologicamente os venenos brutos de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> ;	outubro/2014	outubro/2019
2	Isolar frações proteicas que compõem peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> ;	outubro/2014	outubro/2019
3	Caracterizar efeitos tóxicos, bioquímicos e farmacológicos das frações proteicas inéditas isoladas no desenvolvimento deste projeto e/ou frações proteicas isoladas na presença de inibidores naturais e/ou sintéticos através de ensaios biológicos;	outubro/2014	outubro/2019
4	Cristalizar e/ou co-cristalizar (na presença de inibidores naturais e/ou sintéticos) frações proteicas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> isoladas no decorrer do presente projeto e/ou disponibilizadas por colaboradores;	janeiro/2015	outubro/2019
5	Coletar dados de difração de raios X dos cristais obtidos nas estações experimentais MX1 ou MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS/Campinas-SP;	março/2015	outubro/2019
6	Elucidar e analisar a(s) estrutura(s) tridimensional(is) das PLA2s cristalizadas que geraram bons conjuntos de dados de difração de raios X;	abril/2015	outubro/2019
7	Determinar regiões de reconhecimento de PLA2s isoladas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> frente aos soros antiofídicos anticrotálico e antibotrópico;	junho/2015	outubro/2019
8	Analisar as regiões imunogênicas das diferentes PLA2s botrópicas e crotálicas que reagiram com os diferentes soros antiofídicos e realizar um estudo comparativo entre as PLA2s isoladas de venenos de serpentes da família Viperidae;	junho/2015	outubro/2019
9	Envolver estudantes de graduação e pós-graduação a fim de inserir na comunidade científica e repassar a metodologia experimental utilizada para obtenção de estruturas oligoméricas de macromoléculas biológicas.	outubro/2014	outubro/2019
10	Realizar estudos computacionais (topológicos, docking, de dinâmica molecular e filogenéticos) para avaliar as características pertinentes às PLA2s isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por estas enzimas;	fevereiro/2015	outubro/2019
11	Divulgar os resultados parciais e/ou completos obtidos no decorrer da execução da presente parceria em congressos científicos e/ou na forma de artigos científicos, relatórios de iniciação científica, dissertações de mestrado e teses de doutorado.	outubro/2014	outubro/2019

**PLANO DE TRABALHO**  
**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB**

**IV - DECLARAÇÃO DO CONVENIENTE E APROVAÇÃO DO CONCEDENTE**

**Declaração**

Na qualidade de representante legal, declaro para fins de prova junto a Universidade Federal da Paraíba, para os efeitos e sob penas da lei, que inexistem qualquer débito em mora ou situação de inadimplência com o Tesouro Nacional ou qualquer órgão ou entidade da Administração Pública Federal, Direta e Indireta, que impeça a celebração do presente Acordo de Cooperação Técnica.

Pede Deferimento,

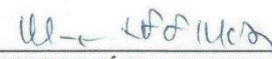
Campo Grande - MS, 21 de outubro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
**JOSÉ MARITONI**  
Reitor da UCDB

**Aprovação**

Aprovo,

João Pessoa - PB, 21 de outubro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
**MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ**  
Reitora da UFPB

**ANEXO 02**

Termo de Procedência de Venenos Ofídicos



Missão Salesiana de Mato Grosso  
**Universidade Católica Dom Bosco**  
 Instituição Salesiana de Educação Superior  
 Biotério MSMT – UCDB /  $\beta$ ioToxX



Campo Grande-MS, 20 de Maio de 2014.

#### TERMO DE PROCEDÊNCIA

Seguem 03 frascos contendo 04 gramas cada um de veneno cristalizado de serpentes do gênero *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus* código/nº: B. m/s8-0021, oriundas do plantel do Biotério/UCDB com o número de registro 718.682, junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, localizado no *campus* da **Universidade Católica Dom Bosco**, situada na Av. Tamandaré, 6000, Bairro Jd. Seminário, CEP 79117-900, Cx.P. 100 em Campo Grande – Mato Grosso do Sul.

**Paula Helena Santa Rita**  
 Biotério/UCDB

Paula Helena Santa Rita  
 Médica Veterinária  
 CRMV/MS 3383  
 Biotério - UCDB

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
 Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900 - CAMPO GRANDE - MS - BRASIL  
 CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87 - Fone: 55 67 3312-3300 - Fax: 55 67 3312-3301 - www.ucdb.br

**ANEXO 03**

Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE)



UFPB - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO LAURO  
WANDERLEY



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDOS TOXINOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS COMPARATIVOS DOS VENENOS BRUTOS DE Bothrops jararacussu e Bothrops

**Pesquisador:** Otacílio Benício da Paixão Júnior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 61023116.3.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.848.744

#### Apresentação do Projeto:

O projeto em questão apresentado em sua primeira versão compõe uma pesquisa de mestrado, a qual analisará os efeitos dos venenos brutos de Bothrops jararacussu e Bothrops moojeni, sobre eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos ABO nas atividades hemolítica/anti-hemolítica, estresse oxidativa/antioxidante e coagulante. Trata-se de uma pesquisa experimental, laboratorial "in vitro" e qualitativa. A presente pesquisa terá como público-alvo uma população de 05 indivíduos aparentemente saudáveis, maiores de 18 anos, sem distinção de sexo, tamanho, cor/raça, etnia, orientação sexual e identidade de gênero, classes e grupos sociais, para coleta de sangue venoso (um pool de plasma) para a atividade coagulante.

#### Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores destacam como objetivo primário:

- Avaliar os efeitos bioquímicos, tóxicos e farmacológicos dos venenos brutos extraídos das serpentes brasileiras Bothrops jararacussu e Bothrops moojeni, bem como correlacionar a composição molecular e a espécie da serpente relacionada a cada amostra de veneno bruto com os efeitos biológicos desencadeados por estes venenos.

Como objetivos secundários são destacados:

- Avaliar a composição molecular de cada um dos venenos brutos extraídos de serpentes

**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

Dr.ª Ma Eltane Moreira Freire  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa  
HULW - UFPB  
2005



UFPB - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO LAURO  
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.848.744

brasileiras *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* 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 dos venenos brutos extraídos das serpentes brasileiras *B. jararacussu* e *B. moojeni*;
- 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 dos venenos brutos extraídos de serpentes brasileiras *B. jararacussu* e *B. moojeni* sobre hemoglobinas humanas;
- Correlacionar a composição molecular e a espécie da serpente com os efeitos bioquímicos desencadeados por cada amostra de veneno em estudo;
- Correlacionar a composição molecular e a espécie da serpente com os efeitos farmacológicos desencadeados por cada amostra de veneno em estudo.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos da pesquisa mostrados pelos pesquisadores são:

- Que a pesquisa poderá trazer eventual desconforto, como uma leve dor ao ser coletado o sangue, jejum de no mínimo 4 horas. Tais riscos serão minimizados mediante o manuseio e coleta correta seguindo todas as normas de biossegurança, diante de qualquer desconforto ou que sejam detectadas alterações que necessitem de assistência imediata ou tardia, o pesquisador responsável encaminhará o participante para o Setor de urgência e emergência em uma unidade de pronto atendimento (UPA), na cidade de João Pessoa.

Em relação aos benefícios da pesquisa, o projeto destaca:

- Compreender as propriedades do veneno bruto extraído das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, correlacionando seus efeitos toxicológicos, farmacológicos e bioquímicos à sua composição molecular, na tentativa de inferir proteínas importantes do mecanismo de ação nestes efeitos biológicos.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa analisará os efeitos dos venenos brutos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* sobre eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos ABO nas atividades hemolítica/anti-hemolítica, estresse oxidativa/anti-oxidante e coagulante. Trata-se de uma pesquisa experimental e qualitativa. Os critérios de inclusão destacados pelos pesquisadores serão: jejum de no mínimo 4 horas e não fazer uso de

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

17/04/2015  
Márcia Elitane Moreira Freire  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa  
UFPB  
Página 02 de 05



UFPB - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO LAURO  
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.848.744

medicamentos nos últimos 10 dias anteriores à coleta.

- A atividade hemolítica dos venenos brutos de serpentes serão avaliados nas concentrações (1000, 100, 10, 1 e 0,1 ug/mL) contra eritrócitos humanos, na presença de cálcio, na presença de ácido graxo e na presença de ambos. A atividade oxidante e antioxidante dos venenos brutos serão avaliados nas concentrações (1000, 100, 10, 1 e 0,1 ug/mL).

- A atividade coagulante dos venenos brutos serão avaliados nas concentrações (10, 5, 2,5, 1,25 ug/mL) contra o plasma humano citratado.

- Para a análise de dados será utilizado o software GraphPad Prism 6 para Windows. Todas as amostras serão realizadas em triplicata. Os resultados serão expressos pela média  $\pm$  erro padrão da media (EPM) ou mediana, de acordo com o parâmetro a ser avaliado. Deverão ser utilizados o teste ANOVA e o teste de Tukey. Serão consideradas diferenças significativas valores de  $p < 0,05$ .

- O local da pesquisa será o Laboratório Multiusuário e o Laboratório Cristalografia de Proteínas, CPR-Lab, do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba no Centro de Ciências Exatas e da Natureza, na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba

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

Os pesquisadores apresentaram todos os documentos solicitados por este comitê como:

- Projeto detalhado;
- Declaração de Instituição e Infraestrutura;
- Declaração dos pesquisadores;
- Folha de Rosto da plataforma Brasil;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Comprovante de cadastro do projeto junto a Gerência de Ensino e Pesquisa;

#### 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.

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

*[Handwritten signature]*  
 Diretora  
 Coordenadora  
 do Comitê de Ética em Pesquisa  
 UFPB  
 05



UFPB - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO LAURO  
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.848.744

**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 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.

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

Profa. Eliete Moreira Preite  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital Universitário UFPB

Página 04 de 05



UFPB - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO LAURO  
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.848.744

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_777962.pdf	18/11/2016 20:48:39		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTA_RESPOSTA_AO_CEP_HULW_PARECER.docx	18/11/2016 20:40:52	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.docx	18/11/2016 20:38:32	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	18/11/2016 20:38:18	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido.doc	18/11/2016 20:37:50	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	14/10/2016 16:14:30	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
Outros	Ficha_de_Cadastro_GEP.pdf	14/10/2016 05:45:28	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
Outros	Certidao_de_aprovacao_do_projeto_de_pesquisa.pdf	17/09/2016 20:19:32	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia.pdf	17/09/2016 20:18:47	Otacílio Benício da Paixão Júnior	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	17/09/2016 20:13:44	Otacílio Benício da Paixão Júnior	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

## APÉNDICE

## MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre **Estudos toxicológicos, bioquímicos e farmacológicos comparativos do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*** e está sendo desenvolvida por **Otacílio Benício da Paixão Júnior**, do Curso de Pós-graduação em **Biologia Molecular e Celular** da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação da Profª Dra Daniela Priscila Marchi Salvador.

Os objetivos do estudo são **avaliar os efeitos bioquímicos, tóxicos e farmacológicos do veneno bruto extraído das serpentes brasileiras da espécie *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, bem como correlacionar com os efeitos biológicos desencadeados por este veneno**. A finalidade deste trabalho é contribuir para uma **melhor compreensão dos possíveis mecanismos de ação destes compostos químicos**.

Solicitamos a sua colaboração para **doar 10mL de amostras de sangue venoso para a realização da atividade coagulante que será realizada com um pool de plasma humano citratado**, essa coleta de amostra de sanguínea será por sistema de coleta a vácuo na região na parte anterior do braço, próximo à dobra do cotovelo, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto. Informamos que essa pesquisa **poderá trazer eventual desconforto, como uma leve dor ao ser coletado o sangue, jejum de no mínimo 4 horas e não fazer uso de medicamentos nos últimos 10 dias anteriores à coleta**. Tais riscos serão minimizados mediante o manuseio e coleta correta seguindo todas as normas de biossegurança, afim de minimizar/excluir a possibilidade de contaminação das amostras após a coleta. Diante de qualquer desconforto ou que sejam detectadas alterações que necessitem de assistência imediata ou tardia eu, **Otacílio Benício da Paixão Júnior**, o encaminharei para a **Unidade de Pronto Atendimento (UPA) mais próxima, em João Pessoa/PB**.

Esclarecemos que sua participação **(ou a participação do menor ou outro participante pelo qual ele é responsável)** no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição (se for o caso). Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

---

Assinatura do pesquisador responsável

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.

João Pessoa , \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Impressão dactiloscópica

---

Assinatura do participante ou responsável legal

Contato com o Pesquisador Responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o pesquisador Otacílio Benício da Paixão Júnior Telefone: 083 99621-6781 ou para o Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley -Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900. E-mail: [comitedeetica@hulw.ufpb.br](mailto:comitedeetica@hulw.ufpb.br) Campus I – Fone: 32167964