



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



**SARAH DE SOUSA FERREIRA**

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS E TOXINOLÓGICOS COMPARATIVOS ENTRE AS  
PEÇONHAS DE MACHOS E FÊMEAS DE *Bothrops matogrossensis***

**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



**SARAH DE SOUSA FERREIRA**

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS E TOXINOLÓGICOS COMPARATIVOS ENTRE AS  
PEÇONHAS DE MACHOS E FÊMEAS DE *Bothrops matogrossensis***

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

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

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hilzeth Luna Freire Pêssoa

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



**SARAH DE SOUSA FERREIRA**

Dissertação de Mestrado avaliada em 19/04/2017

**BANCA EXAMINADORA**

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

Prof. Dr. Hilzeth Luna Freire Pêssoa  
Universidade Federal da Paraíba, UFPB  
Co-orientadora

Prof. Dr. Livio Carvalho de Figueirêdo  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFRS  
Examinador Externo

Prof. Dr. Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha  
Universidade Federal da Paraíba, UFPB  
Examinador Interno

*À Deus e à minha família, com todo amor que houver nessa vida.*

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos”*

*Marie Curie*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pelo dom da vida e por ser minha força inexaurível. Aos meus pais Antonia e Francimar, e minhas irmãs, Debora e Thamyris, pelo incentivo, apoio e carinho durante toda a jornada.

À minha orientadora a professora Daniela Priscila Marchi Salvador pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Agradeço também a professora Hilzeth Luna Freire Pêsoa pela experiência compartilhada.

A todos do Laboratório de Cristalografia de Proteínas (CPr-Lab) por terem me proporcionado crescimento profissional e pessoal.

À Diana Pontes pela amizade e apoio, proporcionando leveza ao trabalho.

A Pedro Everson pelas experiências compartilhadas, amizade e carinho.

A Renato Augusto pelo companheirismo e apoio.

À Professora MSc. Paula Helena Santa Rita e ao Breno Emanuel Farias Frihling da Universidade Católica Dom Bosco-UCDB em Campo Grande, por disponibilizar 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.

A todos os amigos, especialmente aos que fiz na Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPB, que direta e indiretamente ajudaram a tornar esse sonho possível.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

**Muito obrigada!**

## RESUMO

A serpente *Bothrops mattogrossensis* foi originalmente descrita em 1925 por Amaral, apesar disso, estudos com essa espécie ainda são escassos. O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar os efeitos bioquímicos e tóxicos de *pools* de peçonhas brutas extraídas de machos (PB\_BmatM) e fêmeas (PB\_BmatF) de *Bothrops mattogrossensis*. O perfil proteico de cada peçonha foi caracterizado e os efeitos hemolítico, oxidante e coagulante foram avaliados e comparados entre machos e fêmeas. Os perfis cromatográficos e os padrões de bandas proteicas mostraram semelhanças entre os *pools*. Verificou-se que, eritrócitos dos tipos A e B apresentam maior percentual de hemólise na presença de ambas as peçonhas e foram mais susceptíveis à hemólise na presença de ácidos graxos e cloreto de cálcio, sugerindo uma possível ação das fosfolipases A<sub>2</sub>. Durante a realização da atividade hemolítica observou-se hemaglutinação visível nas maiores quantidades de PB\_BmatF e PB\_BmatM avaliadas. Quando comparado ao controle, a redução nos percentuais de hemoglobinas oxidadas à metahemoglobina na presença de 1000µg das peçonhas foram de 30% (BmatM) e 35% (BmatF), enquanto que em 100µg de BmatM foi de 22,5%. A PB\_BmatM apresentou menor tempo de coagulação e ambas as peçonhas apresentaram atividade dose dependente. Portanto, a descrição e a avaliação comparativa dos efeitos bioquímicos e toxicológicos desencadeados pelas peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. mattogrossensis* forneceram informações adicionais sobre a toxicidade, *in vitro*, dessas peçonhas. Ainda, esses resultados poderão abrir novas indagações e buscas sobre sua atuação frente aos diferentes tipos sanguíneos do sistema ABO.

**Palavras-chave:** Efeito hemolítico; Estresse oxidativo; Coagulação; Hemaglutinação; Perfil Proteico.

## ABSTRACT

*Bothrops matogrossensis* snake was originally described in 1925 by Amaral, however, studies with this species are still scarce. The objective of this study was to evaluate and compare the biochemical and toxic effects of crude venom *pools* extracted from *Bothrops matogrossensis* males (PB\_BmatM) and females (PB\_BmatF). The protein profile of each venom was characterized and the hemolytic, oxidant and coagulant effects were evaluated and compared between males and females. Chromatographic profiles and protein band patterns showed similarities between *pools*. Erythrocytes of types A and B present a higher percentage of hemolysis in the presence of both venoms and were more susceptible to hemolysis in the presence of fatty acids and calcium chloride, suggesting a possible action of phospholipases A<sub>2</sub>. During the hemolytic activity, visible hemagglutination was observed in the highest amounts of PB\_BmatF and PB\_BmatM evaluated. When compared to the control, the reduction in percentages of hemoglobins oxidized to methaemoglobin in the presence of 1000µg of the venoms were 30% (BmatM) and 35% (BmatF), whereas in 100µg BmatM it was 22.5%. PB\_BmatM presented lower plasma coagulation time and both venoms presented dose-dependent activity inversely proportional to coagulation time. Therefore, the description and the comparative evaluation of the biochemical and toxinological effects triggered by the crude venoms of males and females of *B. matogrossensis* provided additional information on the toxicity, *in vitro*, of these venoms. Still, these results open new questions and demand on the performance of the venom in front of the different blood types of the ABO system.

**Keywords:** Hemolytic effect; Oxidative stress; Coagulation; Hemagglutination; Protein analysis

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- PB\_BmatF- Peçonha bruta de fêmeas de *Bothrops mattogrossensis*  
PB\_BmatM- Peçonha bruta de machos de *Bothrops mattogrossensis*  
PB - Peçonha bruta  
%- Porcentagem  
µg- Micrograma  
AG- Ácido graxo  
CaCl<sub>2</sub>- Cloreto de cálcio  
AG/CaCl<sub>2</sub>- Ácido graxo e cloreto de cálcio  
rpm- Rotações por minuto  
µl- Microlitros  
NaCl- Cloreto de Sódio  
mM- Milimolar  
nm- Nanômetro  
TFA- Ácido trifluoracético  
ACN- Acetilnitrila  
SE- Suspensão de eritrócitos  
M- Molar  
frF- Fração da peçonha de *Bothrops mattogrossensis* fêmea  
frM-Fração da peçonha *Bothrops mattogrossensis* macho

## LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	Características dos gêneros de serpentes peçonhentas no Brasil.....	15
<b>2</b>	Estrutura tridimensional de fosfolipases A <sub>2</sub> .....	19
<b>3</b>	Mecanismo de catálise química da L-aminoácido oxidase.....	20
<b>4</b>	<i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	23
<b>5</b>	Localização geográfica e padrão de manchas apresentadas pela <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	24
<b>6</b>	Cromatograma da peçonha de fêmeas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	33
<b>7</b>	Cromatograma da peçonha de machos de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	34
<b>8</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas da peçonha de fêmeas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	36
<b>9</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas da peçonha de machos de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	36
<b>10</b>	Avaliação do percentual de hemólise no sistema ABO do <i>pool</i> da peçonha de fêmeas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	40
<b>11</b>	Avaliação do percentual de hemólise no sistema ABO do <i>pool</i> da peçonha de machos de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	41
<b>12</b>	Estrutura tridimensional da fosfolipase A <sub>2</sub> na presença de ácido graxo e cálcio.	43
<b>13</b>	Análise das variações sexuais da peçonha bruta de <i>Bothrops mattogrossensis</i> na atividade hemolítica.....	46
<b>14</b>	Aglutinação eritrocitária na presença da peçonha de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	49
<b>15</b>	Atividade coagulante das peçonhas brutas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	53
<b>16</b>	Aspecto físico dos coágulos formados na presença dos <i>pools</i> de <i>B. mattogrossensis</i> , do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).....	54

**LISTA DE TABELAS**

<b>1</b>	Acidentes ofídicos: alterações clínicas e soroterapia.....	16
<b>2</b>	Alguns componentes da peçonha de serpentes da família Viparidae e sua atividade biológica.....	18
<b>3</b>	Frações cromatográficas dos <i>pools</i> das peçonhas de machos e fêmeas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> , percentual de tampão B e o tempo em minutos.....	35
<b>4</b>	Atividade oxidante na presença das peçonhas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> machos e fêmeas sobre a hemoglobina.....	51
<b>5</b>	Atividade antioxidante na presença das peçonhas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> machos e fêmeas sobre a hemoglobina.....	51

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1	Serpentes peçonhenta.....	14
1.2.	Aspectos epidemiológicos e gerais sobre os acidentes ofídicos.....	15
1.3.	Constituintes da peçonha botrópica.....	17
1.4	Atividades biológicas, tóxicas e farmacológicas da peçonha botrópica.....	21
1.5	<i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1	Objetivo geral.....	26
2.2	Objetivo específico.....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1	Peçonhas brutas de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	27
3.2	Eritrócitos humanos .....	27
3.3	Plasma humano citratado.....	27
3.4	Aspectos éticos.....	28
3.5	Caracterização da peçonha de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	28
3.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	29
3.7	Avaliação do potencial hemolítico.....	29
3.8.	Avaliação do estresse oxidativo.....	30
3.9.	Avaliação da atividade antioxidante.....	31
3.10.	Avaliação da atividade coagulante.....	32
3.11	Análise estatística.....	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
4.1	Caracterização da peçonha de <i>Bothrops mattogrossensis</i> macho e fêmea e obtenção das frações proteicas.....	33
4.2	Avaliação do efeito hemolítico da peçonha de <i>Bothrops mattogrossensis</i> em eritrócitos humanos no sistema ABO.....	38
4.3	Análise das diferenças entre os sexos da espécie <i>Bothrops mattogrossensis</i> em relação ao percentual de hemólise dos eritrócitos nos grupos sanguíneos A e B .....	45
4.4	Análise da agregação eritrocitária observada durante a atividade hemolítica na peçonha de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	48
4.5	Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da peçonha de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	50

4.6 Avaliação do efeito coagulante causado pelas peçonhas de <i>Bothrops matogrossensis</i> .....	53
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Serpentes peçonhentas

As serpentes são pertencentes ao reino Animalia, filo Chordata, subfilo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, subordem Serpentes. Atualmente, o Brasil possui 403 espécies de serpentes descritas, das quais 64 são consideradas peçonhentas (UETZ et al., 2017) e distribuídas entre as famílias Viperidae e Elapidae. A família Viperidae tem por representantes os gêneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus* e a família Elapidae está representada por 33 espécies classificadas em um único gênero, *Micrurus* (BERNARDE, 2014; UETZ et al., 2017).

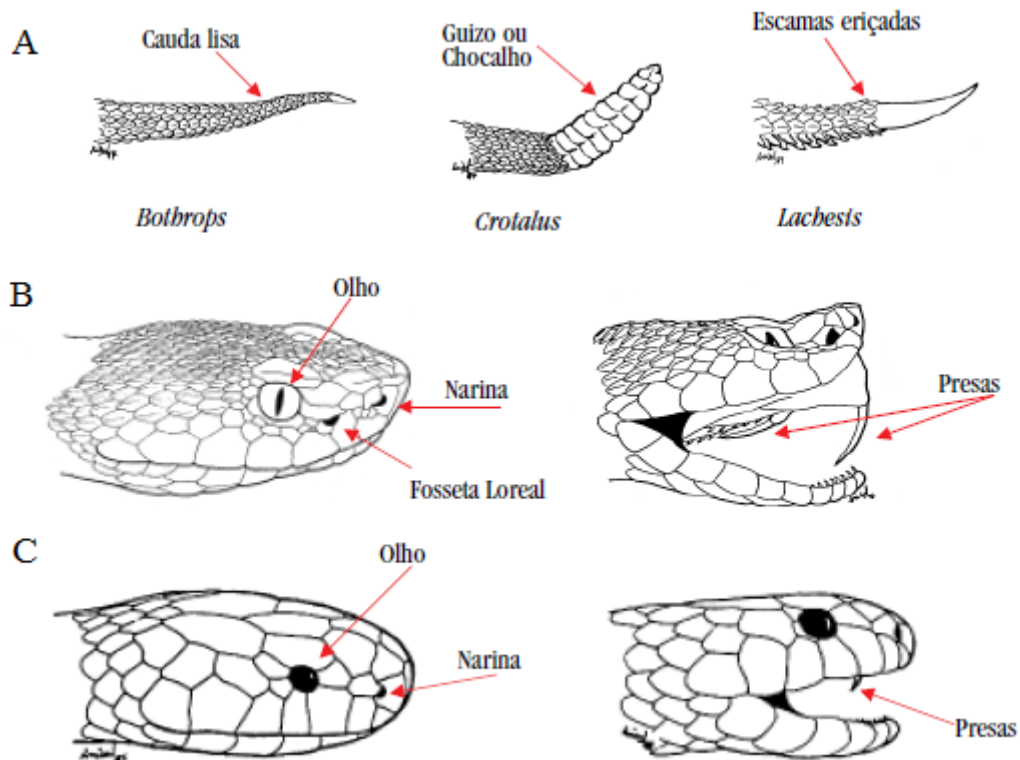
As serpentes são destituídas de apêndices locomotores e apresentam o corpo alongado coberto de escamas córneas. O órgão copulador, chamado de hemipênis, é bifurcado e apresenta espinhos. Quanto a reprodução as serpentes podem ser vivíparas (*Bothrops* e *Crotalus*) ou ovíparas (*Micrurus* e *Lachesis*) (CISCOTTO, 2005).

A observação das características morfológicas desses animais auxilia no reconhecimento de serpentes peçonhentas. Nos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* a presença da fosseta loreal (órgão sensorial situado entre o olho e a narina) e o tipo de cauda indicam que a serpente é peçonhenta (Figura 1A). Os dentes inoculadores desses gêneros, o mais sofisticado aparelho de inoculação da peçonha, são móveis e estão situados na porção anterior do maxilar (Figura 1B). As serpentes do gênero *Micrurus* (família Elapidae) não possuem fosseta loreal e apresentam dentes inoculadores fixos e pouco desenvolvidos na região anterior da boca (Figura 1C) (BRASIL, 2001; WÜSTER et al., 2008).

As glândulas de veneno podem ter evoluído de glândulas digestivas e a principal função ancestral da peçonha seria a digestão da presa (VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

Serpentes do gênero *Bothrops* têm hábitos noturnos ou crepusculares, podem apresentar comportamentos agressivos quando se sentem ameaçadas, habitam locais úmidos, principalmente periferias de grandes cidades e zonas rurais, onde ocorre a proliferação de roedores. As do gênero *Crotalus* não tem o hábito de atacar, são notadas pelo ruído característico do guizo ou chocalho e encontram-se em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas. Serpentes do gênero *Lachesis* habitam áreas florestais como Amazônia, Mata Atlântica e matas úmidas do Nordeste. Por fim, serpentes do gênero *Micrurus* são distribuídas em todo território nacional, apresentando anéis vermelhos, pretos e brancos em qualquer tipo de combinação (BRASIL, 2001).

**Figura 1:** Características dos gêneros de serpentes peçonhentas no Brasil.



**A:** Características morfológicas da cauda das espécies *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. **B:** Presença da fossa loreal nas serpentes peçonhentas da família *Viperidae*, mecanismo móvel e localização das presas. **C:** Ausência de fossa loreal no gênero *Micrurus*, dentição pouco desenvolvida e fixa. (Fonte: BRASIL, 2001).

## 1.2 Aspectos epidemiológicos e gerais sobre os acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos estão inclusos na lista de doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os indivíduos mais acometidos por esse tipo de acidente vivem em áreas rurais. Devido a frequência com que ocorrem e a morbimortalidade que ocasionam, os acidentes ofídicos são considerados um sério problema de saúde pública nos países tropicais (PINHO; PEREIRA, 2001 BRASIL, 2017).

No Brasil o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Sistema de Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde e o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) são responsáveis pelas notificações de acidentes com animais peçonhentos. Mesmo com diversos sistemas de notificação, os dados de ofidismos não correspondem a um número real

pois, além da subnotificação, a acessibilidade de indivíduos acometidos à serviços de saúde de alguns municípios brasileiros é deficiente (LEMOS et al., 2009).

Barone et al. (2011) estimam que, anualmente, ocorram de 3 a 5,4 milhões de acidentes ofídicos mundialmente resultando em, aproximadamente, 125 a 150 mil mortes. Contudo, existe uma disparidade global nos dados epidemiológicos para os acidentes com serpentes peçonhentas, o que pode ser reflexo da grande diversidade de condições ecológicas e econômicas em todo o mundo (CHIPPAUX, 1998).

O Brasil é o país da América do Sul com maior índice de envenenamento notificado com, aproximadamente, 29 mil casos anuais (BERNARDE, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por, aproximadamente, 90,5% dos acidentes ofídicos com 0,3% de letalidade. As do gênero *Crotalus* apresentam incidência de 7,7% e letalidade de 1,8%, enquanto que as do gênero *Lachesis* são responsáveis por 1,4% dos acidentes ofídicos e letalidade de 0,9%, já as do gênero *Micrurus* estão envolvidas em menos de 1% dos acidentes ofídicos, com letalidade de 0,36% (BERNARDE, 2014).

A gravidade do acidente depende da espécie envolvida, da quantidade de peçonha inoculado e do membro atingido (BERNARDE, 2014). De acordo com Bochner e Struchiner (2003) os membros inferiores são os mais atingidos por ofidismo e os homens são mais acometidos que as mulheres devido ao trabalho no campo.

As manifestações clínicas após o envenenamento determinam o quadro clínico em que o paciente se encontra, podendo indicar o tipo de acidente e orientar o médico para o tratamento adequado. O tratamento indicado para o ofidismo é a administração endovenosa do soro específico para cada tipo de serpente envolvida no acidente (Tabela 1).

**Tabela 1:** Acidentes ofídicos: alterações clínicas e soroterapia

<b>Tipo de acidente</b>	<b>Alterações clínicas</b>	<b>Soroterapia</b>
<b>Acidente botrópico</b>	Dor e inchaço no local da picada, hemorragia sistêmica, coagulopatia, hipotensão/choque e insuficiência renal aguda	Leve: 3 ampolas SAB <sup>1</sup> Moderado: 6 ampolas SAB <sup>1</sup> Grave: 12 ampolas SAB <sup>1</sup>
<b>Acidente crotálico</b>	Fácie miastênica, visão turva ou dupla, urina vermelha ou marrom, dores musculares generalizadas, convulsões, alterações respiratórias e circulatórias	Leve: 5 ampolas SAC <sup>2</sup> Moderado: 10 ampolas SAC <sup>2</sup> Grave: 20 ampolas SAC <sup>2</sup>
<b>Acidente laquético</b>	Bradycardia, dor abdominal, vômitos, diarreia e hipotensão	10 a 20 ampolas de SAL <sup>3</sup>
<b>Acidente elapídico</b>	Dor de intensidade variável, visão borrada ou turva, pálpebras caídas, parada dos músculos respiratórios	10 ampolas SAE <sup>4</sup>

<sup>1</sup>SAB: Soro antibotrópico. <sup>2</sup>SAC: Soro anticrotálico. <sup>3</sup>SAL: Soro antilaquético. <sup>4</sup>SAE: Soro antielapídico. (Adaptações de BRASIL, 2016; PINHO; PEREIRA, 2001).

Todo paciente submetido a tratamento soroterápico deve ser mantido em observação por no mínimo 24 horas (CHIPPAUX et al., 1991; PINHO; PEREIRA, 2001; BRASIL, 2016).

A variabilidade da peçonha ofídica pode ter impacto na efetividade do soro antiofídico, pois a composição pode ser alterada tanto intrafamiliar e intergênero, como inter e intraespécie. Variações na composição da peçonha entre indivíduos de uma mesma espécie podem estar associadas à sazonalidade, dieta, habitat, idade e sexo (CHIPPAUX et al., 1991; BRASIL, 2016).

### **1.3 Constituintes da peçonha botrópica**

Os constituintes da peçonha de serpentes estão relacionados com as ações desencadeadas pelo envenenamento. Diversos desses componentes já foram isolados e os seus mecanismos de ação descritos (JORGE, 2015).

Peçonhas ofídicas são ricas em proteínas enzimáticas e não-enzimáticas, peptídeos e componentes inorgânicos (HUTTON; WARREL, 1993; JORGE, 2015). Dentre os componentes inorgânicos encontrados na peçonha botrópica estão cálcio, zinco, magnésio, cobalto, cobre, ferro, sódio, manganês e fósforo. Esses componentes têm por função estabilizar proteínas e atuar no mecanismo de ação de algumas enzimas (BJARNASON; FOX, 1994; JORGE, 2015). As proteínas compõem aproximadamente 90% do peso seco da peçonha e são responsáveis pelos efeitos biológicos desencadeados pelo ofidismo (PAULA, 2010). As principais classes de proteínas encontradas nas peçonhas botrópicas são as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), L-aminoácido oxidases (LAAO), metaloproteases, serinoproteases e lectinas tipo C (Tabela 2).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>S, E.C. 3.1.1.4) são uma grande família de proteínas altamente estáveis devido à grande quantidade de pontes dissulfeto presentes em sua estrutura (VALETIN; LAMBEAU, 2000). Essas enzimas catalisam a hidrólise da ligação éster sn-2 dos fosfolipídios de biomembranas liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios (ALBERTS, 2010; MOURA et al., 2014). O ácido araquidônico liberado, um tipo de ácido graxo, atua na transdução de sinal através da biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas (ROMERO-VARGAS, 2010). A produção excessiva de leucotrienos e prostaglandinas é associada a processos fisiopatológicos como a asma, doenças cerebrais, cânceres, doenças cardiovasculares e inflamação (FUNK, 2001; ALVARENGA et al., 2011).

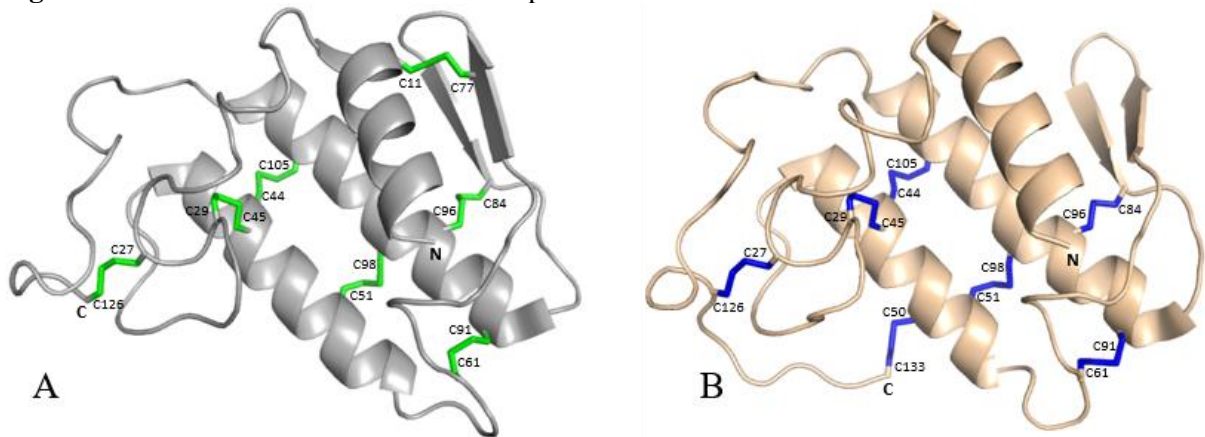
**Tabela 2:** Alguns componentes da peçonha de serpentes da família Viparidae e sua atividade biológica.

<b>Componente Massa molecular</b>	<b>Atividade biológica</b>
Fosfodiesterase 94-140 kDa	Depleção de di- e trinucleotídeos; hipotensão
5'- nucleotidase 53-82 kDa	Liberação de nucleosídeos
Hialuronidase 73 kDa	Diminuição da viscosidade intersticial – difusão dos componentes da peçonha
L-aminoácido oxidase (homodímero) 85-150 kDa	Indução da apoptose; danos celulares
Metaloproteinase (M12) reprotolisina P-I - 20-24 kDa P- II - 25-30 kDa P-III - 43-85 kDa	Hemorragia; mionecrose; digestão da presa
Serinoprotease - trombina- <i>like</i> 31- 36 kDa	Rápida depleção de fibrinogênio; alteração da hemostasia
Fosfolipase A <sub>2</sub> (grupo IIA) (PLA <sub>2</sub> ) - 13-15 kDa	Miotoxicidade; mionecrose; danos à membrana lipídica
Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRiSPs) - 21-29 kDa	Induz hipotermia
Fator de crescimento neural 14-32,5 kDa	Apoptose – incerto
PLA <sub>2</sub> - (Duas subunidades, ácida e básica) 24 kDa	Potente neurotoxicidade (neurotoxina pré-sináptica); digestão da presa
Lectina tipo C 27-29 kDa	Anticoagulante; modulador plaquetário
Desintegrinas 5,2-15 kDa	Inibição plaquetária; promove hemorragia
Peptídeos potenciadores de bradicinina 1-1,5 kDa	Dor, hipotensão; imobilização da presa
Inibidores de tripeptídeos 0,43-0,45 kDa	Estabilização dos componentes das peçonhas
Purinas e pirimidinas AMP= 0.347, hipoxantina, inosina	Hipotensão, paralisia, apoptose, necrose (?); imobilização da presa
Citrato 0.192 kDa	Estabilização da peçonha

A composição da peçonha é variável, de acordo com a espécie pode não conter todos os componentes. (?) Indica uma função ou atividade hipotética (Adaptado de MACKESSY, 2010).

As PLA<sub>2</sub>s são classificadas de acordo com sua origem, estrutura primária e quantidade e localização das pontes de dissulfeto (ROMERO-VARGAS, 2010). As PLA<sub>2</sub>s encontradas em peçonhas de serpentes são divididas em duas classes: classe I - famílias Elapidae e Hydrophidae (Figura 2A) e classe II - famílias Crotalidae e Viperidae (Figura 2B) (RENETSEDER et al., 1985; SIX; DENNIS, 2000).

**Figura 2:** Estrutura tridimensional de fosfolipases A<sub>2</sub>

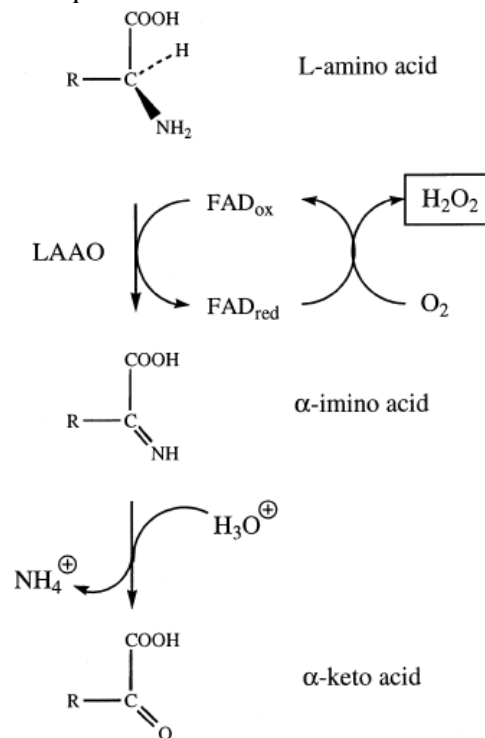


**A:** PLA<sub>2</sub> do grupo IA (PDBID #1TC8). Em verde estão destacadas as sete pontes dissulfeto. **B:** PLA<sub>2</sub> do grupo IIA (PDBID #1TP2). As sete pontes dissulfeto estão desenhadas em azul. Notar que no grupo IA a ponte dissulfeto de C-terminal do grupo IIA (C50-C133), é substituída pela ponte dissulfeto C11-C77 (a numeração é realizada de acordo com RENETSEDER et al., 1985). Imagem desenhada usando o programa computacional PyMol v. 1.8.4.0 (DELANO, 2002).

As L- aminoácido oxidases (LAAOs) (EC 1.4.3.2) são flavoenzimas pertencentes à classe das oxirredutases. São proteínas normalmente homodiméricas e que possuem massa molecular entre 110-150 kDa. Estas enzimas catalisam a desaminação de L-aminoácido por oxidação estereoespecífica. No mecanismo de catálise química das LAAO, os grupos amins dos aminoácidos são oxidados a iminoácidos. Concomitantemente à oxidação, ocorre a redução do cofator enzimático que pode ser o FAD (Flavina-adenina dinucleotídeo) ou FMN (Flavina mononucleotídeo). Em seguida, o iminoácido é submetido a hidrólise não enzimática produzindo cetoácido e amônia. A reoxidação do FADH<sub>2</sub> na presença de oxigênio molecular gera peróxido de hidrogênio e o ciclo catalítico é finalizado (Figura 3) (IZIDORO et al, 2014). Estudos cinéticos sugerem que as LAAOs apresentam especificidade para L-aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos (IZIDORO et al., 2006; SAMEL et al., 2006; TÔNISMAGI et al., 2006; WEI et al., 2007; SAMEL et al., 2008; STABELI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; ZHONG et al., 2009; MORE et al., 2010; KASAI et al., 2010; BREGGE-SILVA et al., 2012; CHEN et al., 2012; VARGAS et al., 2013; IZIDORO et al, 2014).

As LAAOs induzem a agregação plaquetária e apresentam atividades antitumoral, antibacteriana e leishmanicida. Estudos funcionais e estruturais têm demonstrado que essas enzimas apresentam elevado potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (RODRIGUES et al, 2009).

**Figura 3:** Mecanismo de catálise química da L-aminoácido oxidase.



(Fonte: MACHEROUX et al., 2001; IZIDORO et al. 2014).

As proteases podem afetar diversas funções biológicas, tais como: agregação plaquetária, coagulação sanguínea, fibrinólise, sistema complemento, pressão arterial e sistema nervoso (KINI, 2006). As metaloproteinases e serinoproteinases são hidrolases de moléculas biológicas presentes nas peçonhas de serpentes e apresentam relevante importância tanto clínica como terapêutica.

As metaloproteinases, enzimas dependentes de zinco, são responsáveis pela hemorragia local, degradando componentes da membrana vascular, seguido pela total desintegração da estrutura vascular (BARAMOVA et al., 1989; MARUYAMA et al., 1992; KAWANO et al., 2002). Essas proteínas podem ser classificadas de acordo com seus domínios estruturais em três grupos P-I; P-II e P-III (HITE et al., 1994; BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). A lesão vascular, decorrida da ação das metaloproteinases hemorrágicas induz agregação plaquetária e subsequentemente ativa a cascata de coagulação, agravando a coagulação intravascular (BJARNASON; FOX, 1994; KAWANO et al., 2002).

As alterações sistêmicas, provocadas pelas metaloproteinases, induzem hemorragia, mionecrose, danos na pele e inflamação, ativando as metaloproteinases endógenas (MMPs) e liberando uma série de mediadores inflamatórios. Em adição, essas enzimas prejudicam a regeneração do músculo esquelético e degradam componentes da matriz extracelular (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Serinoproteases que compõem as peçonhas de serpentes são glicoproteínas monoméricas e apresentam uma região catalítica, altamente conservada, formada pelos resíduos de aminoácidos Ser195, His57 e Asp102. A ação catalítica dessas enzimas ocorre sobre uma diversidade de substratos tais como: fibrinogênio, cininogênio e plasminogênio (SERRANO; MAROU, 2005; OLIVEIRA, 2016).

As serinoproteases, em geral, afetam a cascata de coagulação através da ativação específica dos componentes sanguíneos ocasionando alteração da hemostasia (SERRANO; MAROUN, 2005). Serrano e Maroun (2005) descreveram que algumas dessas enzimas apresentam mais de uma atividade, enquanto que, outras, possuem uma atividade única, como a ativação do fator V da cascata de coagulação, a proteína C ou o plasminogênio ou, ainda, as plaquetas. Estas enzimas, além de contribuírem para a toxicidade da peçonha, podem ser utilizadas tanto para o diagnóstico como para o tratamento clínico de algumas patologias da homeostasia secundária (KINI, 2006).

As lectinas tipo C (CLRs), assim como as PLA<sub>2</sub>s, são proteínas dependentes de Ca<sup>2+</sup>. As CLRs atuam nos receptores de membrana induzindo a aglutinação eritrocitária. Estes peptídeos afetam a hemostasia por ligarem-se às plaquetas e aos receptores de colágeno induzindo efeito anticoagulante (GARTNER; OGILVIE, 1984; OGAWA et al., 2005; MACKESSY, 2010; JORGE, 2015).

#### **1.4 Atividades biológicas, tóxicas e farmacológicas da peçonha botrópica**

Atualmente, o gênero *Bothrops* abrange 59 espécies; dessas, 27 podem ser encontradas no Brasil (UETZ et al., 2017). Do ponto de vista clínico, essas serpentes são importantes devido à significância e incidência de acidentes (JORGE, 2015).

A peçonha de serpentes é rica em princípios ativos. Recentemente, muitos estudos com toxinas desses animais estão sendo conduzidos para elucidar e compreender os mecanismos fisiológicos decorrente do ofidísmo (MENEZES, 2013). No entanto, a elucidação dos mecanismos moleculares da interação entre as proteínas presentes na peçonha de serpentes e moléculas inibidoras de seus efeitos tóxicos e farmacológicos é, ainda, pouco explorada.

As manifestações clínicas da ação de cada peçonha dependem da toxicidade intrínseca e da quantidade da amostra injetada. Os efeitos desencadeados pelo ofidísmo podem estimular ou inibir componentes do mecanismo hemostático. Os sinais e sintomas decorrentes do envenenamento, mais importantes, no aspecto clínico, são: coagulopatia; hemorragia; danos renais; cardiotoxicidade e lesão tecidual no local da picada. Portanto, de acordo com os

sintomas, o envenenamento pode afetar vários sistemas como o cardiovascular, muscular e sistema nervoso central (HUTTON; WARREL, 1993; KOH et al., 2006).

A maioria das peçonhas ofídicas exercem o seu efeito no final da cascata de coagulação por ativação do fator de coagulação X. O fator Xa age sobre a protrombina ou converte diretamente o fibrinogênio em fibrina (HUTTON; WARREL, 1993; CASTRO, 2006).

Inicialmente, a peçonha botrópica pode causar ação proteolítica intensa no local da picada. Subsequente, o desencadeamento de um processo inflamatório generalizado pode ocasionar edema e até necrose tecidual (CASTRO, 2006). Indivíduos acometidos por acidente botrópico apresentam sintomas locais (dor, edema, dano tecidual, mionecrose e equimose) e sintomas sistêmicos (hemorragia, nefrotoxicidade, coagulopatia, hipotensão arterial) (ASSAFIM et al., 2011).

Uma característica do envenenamento botrópico é a mionecrose, inclusive tem ação sobre células do músculo esquelético, artérias intramusculares, microvasos e nervos. A administração rápida do soro antiofídico é, na maioria dos casos, efetiva para a neutralização dos efeitos sistêmicos, contudo, a neutralização dos efeitos locais não acontece de forma tão efetiva. Em muitos casos, a ausência da inibição do efeito da peçonha botrópica no local da picada deixa sequelas permanentes devido a necrose tecidual (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989).

Uma das complicações do acidente botrópico, relacionada ao elevado número de óbitos, é a insuficiência renal aguda (IRA). A IRA é causada por necrose tubular aguda (NTA) devido a um comprometimento circulatório intenso (CASTRO, 2006). Barone et al. (2011) descreveram que o ofidísmo causado por *B. jararaca* provocou estresse oxidativo, *in vivo*, tanto em nível tecidual renal como em medular.

Peçonhas de serpentes podem ser utilizados na terapia de doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos e contra o câncer (PAL et al., 2002). Ainda, proteínas isoladas e seus derivados podem ser utilizados no tratamento de distúrbios hemostáticos, como a coagulação, alterando a função fibrinogenolítica ou plaquetária (SAJEVIC et al., 2011).

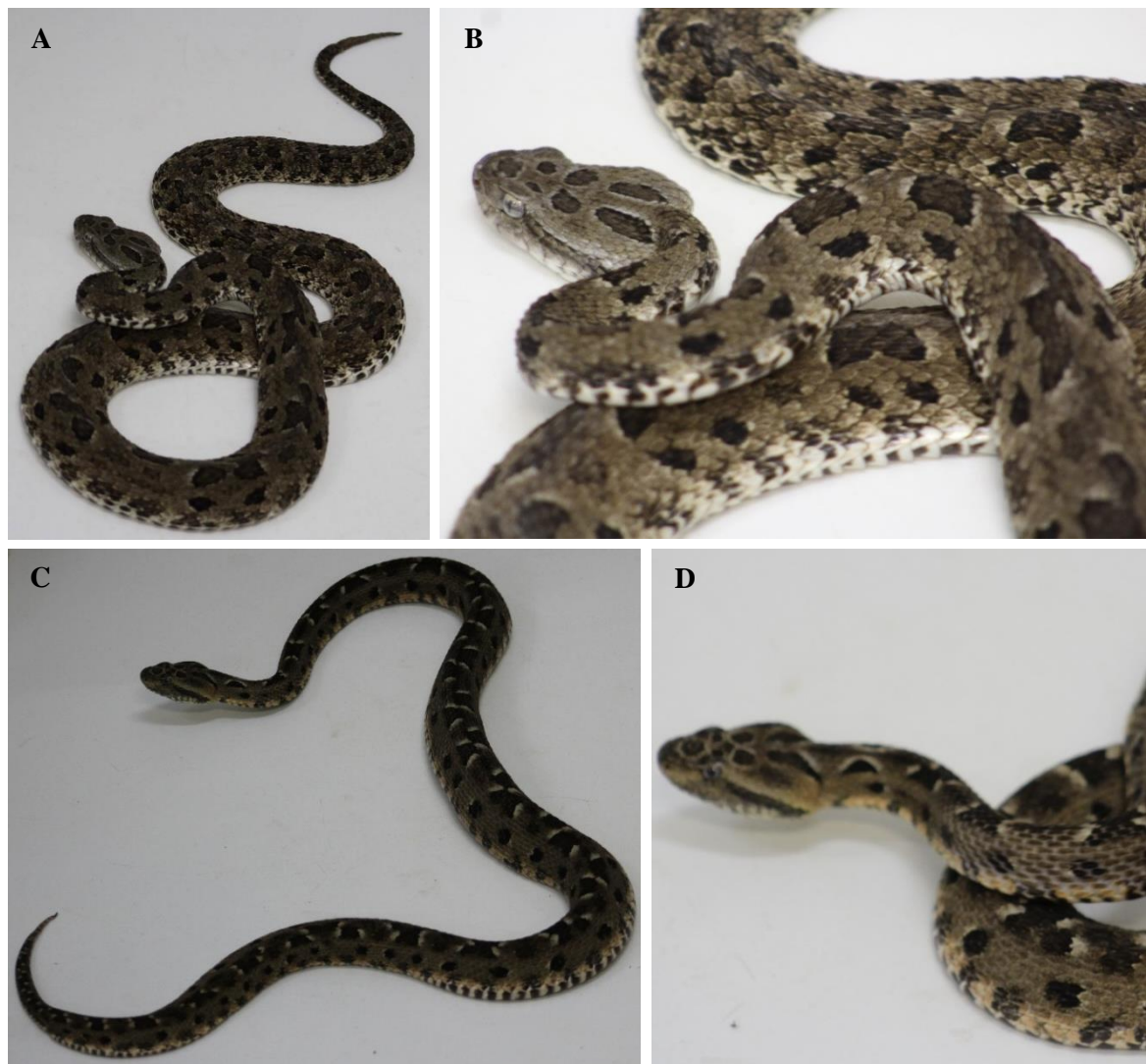
Diversos componentes das peçonhas ofídicas já foram utilizados no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças tromboembólicas. A Defibrase® é um fármaco que tem como princípio ativo a batroxobina, uma serinoprotease isolada da peçonha de *B. moojeni*. Esse medicamento converte fibrinogênio em fibrina e é utilizado em casos de acidente cerebral agudo, angina pectoris inespecífica e surdez súbita. A Hemocoagulase®, medicamento utilizado na prevenção e tratamento de hemorragias, possui atividade de tromboplastina e trombina, sendo seus componentes enzimáticos isolados da

peçonha de *B. atrox* (SAJEVIC et al., 2011). O captopril®, um dos fármacos mais vendidos do mundo, é derivado de um oligopolipeptídeo isolado de *B. jararaca*. Esse medicamento é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), sendo utilizado no tratamento de hipertensão arterial (HAYASHI; CAMARGO, 2005; KOH, 2006).

### 1.5 *Bothrops matogrossensis*

A serpente *Bothrops matogrossensis*, popularmente conhecida como boca-de-sapo, é pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae (Figura 4) (BERNARDE, 2014).

**Figura 4:** *Bothrops matogrossensis*.



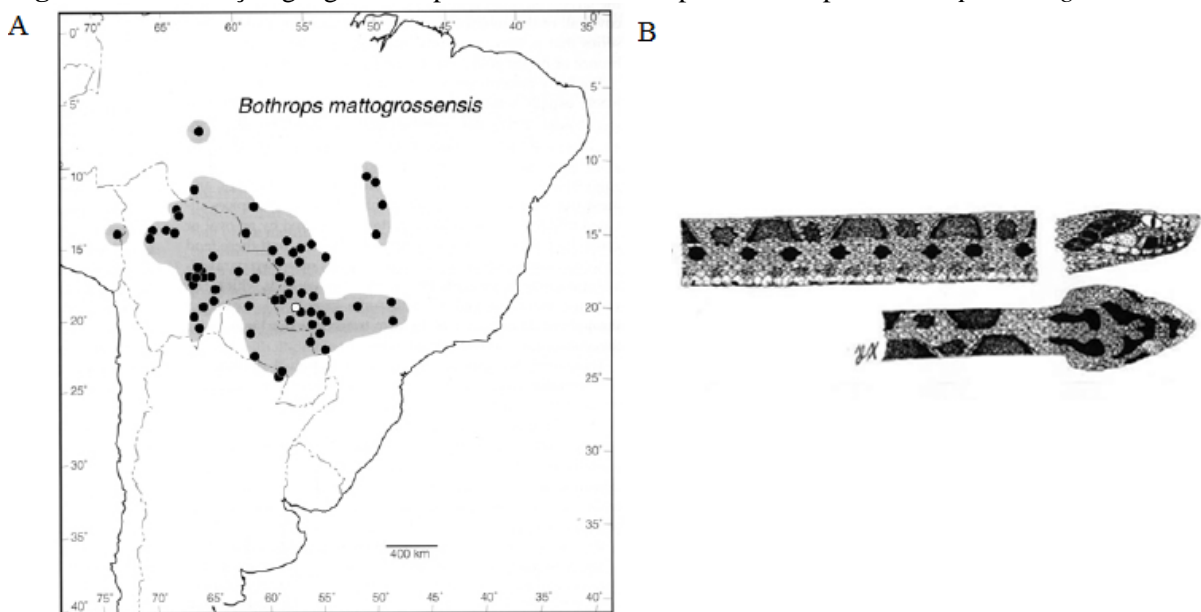
**A:** Espécime de *Bothrops matogrossensis* fêmea **B:** *Bothrops matogrossensis* fêmea, visão da cabeça e lateral do corpo. **C:** Espécime de *Bothrops matogrossensis* macho. **D:** Visão lateral e da cabeça de *Bothrops matogrossensis* macho. Exemplares do serpentário da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. (Fonte: fotos gentilmente cedidas por Breno Emanuel Farias Frihling, 2017).

A serpente *B. matogrossensis* foi descrita originalmente por Amaral em 1925 e sua distribuição geográfica abrange o sul do Peru, Bolívia, Paraguai, norte da Argentina, sudeste e centro-oeste do Brasil (Figura 5A). Habitam regiões de Savana (Cerrado), Pantanal, Chaco e pastagens de palmas alagadas (FENWICK, 2009).

*B. matogrossensis* alimenta-se tanto de presas ectodérmicas quanto endodérmicas (pequenos mamíferos, anuros, lagartos, cobras e centopeias). Os anuros são os principais alimentos dessa espécie, refletindo seu habitat alagado (MONTEIRO et al. 2006).

Essa espécie apresenta dimorfismo sexual; as fêmeas possuem a cabeça e corpo maiores, enquanto os machos têm caudas longas (MONTEIRO et al. 2006). Apresentam características morfológicas de manchas intercalares entre as manchas dorsais, sendo que, essas manchas apresentam as bordas bem marcadas (MACHADO, 2010) (Figura 5B).

**Figura 5:** Localização geográfica e padrão de manchas apresentadas pela *Bothrops matogrossensis*.



**A:** Distribuição geográfica da espécie *B. matogrossensis* (MACHADO, 2010). **B:** Imagem da secção central, lateral e dorsal da cabeça da serpente (Fonte: SILVA; RODRIGUES, 2008).

Embora a serpente *B. matogrossensis* tenha sido descrita em 1925, a composição da peçonha e os efeitos tóxicos e farmacológicos desencadeados pelo empoçamento são ainda pouco conhecidos. O envenenamento por essa espécie apresenta os seguintes efeitos locais: dor, edema e equimose (QUEIROZ et al., 1984; MARUNAK et al., 1994; MOURA, 2014).

Oliveira e colaboradores (2002) avaliaram, *in vitro*, a citotoxicidade em cultura celular (*Vero cell*) na presença da peçonha de *B. matogrossensis* e observaram que 4,74 µg/mL dessa peçonha foi capaz de inviabilizar 50% das células.

Em 2012, Okubo e colaboradores, purificaram e caracterizaram uma L-aminácido oxidase de *B. matogrossensis* (BmLAO). BmLAO apresentou atividade microbicida contra bactérias gram-positivas e negativas. Entretanto, não foi observada atividade citotóxica dessa proteína contra macrófagos e eritrócitos. Complementarmente, Okubo et al. (2012), sintetizaram a BmLAO em fragmentos peptídicos e constataram que esses apresentavam atividade antimicrobiana aumentada, sugerindo utilizá-los no *design* de novos antibióticos.

Estudos previamente realizados por Moura et al. (2014) permitiram o isolamento e caracterização bioquímica de três PLA<sub>2</sub>s miotóxica presentes na peçonha de *B. matogrossensis* e, ainda, analisaram o efeito citotóxico dessas PLA<sub>2</sub>s sobre células promastigotas de *Leishmania amazonensis* e linhagens de células cancerígenas (leucemia e adenocarcinoma de mama).

A variabilidade proteica das peçonhas de serpentes as tornam produtos importantes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A elucidação dos componentes proteicos, a descrição dos efeitos biológicos e farmacológicos e os mecanismos de ação atrelados às atividades tóxicas desencadeadas pelo ofidismo ainda são pouco explorados. Portanto, estudar esses componentes e compreender os mecanismos tóxicos do emponhamento pode auxiliar no desenvolvimento de metodologias específicas para a geração de novos produtos biotecnológicos e proposição de soros antiofídicos mais específicos, constituindo uma abordagem atual na área toxinológica.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar e comparar os efeitos bioquímicos e tóxicos das peçonhas brutas extraídas de machos (PB\_BmatM) e fêmeas (PB\_BmatF) da serpente *Bothrops matto grossensis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Descrever a composição molecular da PB\_BmatM e PB\_BmatF e correlacionar seus constituintes com os efeitos biológicos desencadeados pelo ofidismo;
- Avaliar e comparar a atividade citotóxica das PB\_BmatM e PB\_BmatF através da atividade hemolítica direta e indireta sobre eritrócitos humanos;
- Aferir e comparar o estresse oxidativo desencadeado pelas PB\_BmatM e PB\_BmatF sobre a hemoglobina humana;
- Investigar e comparar a atividade antioxidante das PB\_BmatM e PB\_BmatF sobre a hemoglobina humana;
- Caracterizar a atividade coagulante de cada peçonha de *B. matto grossensis* (PB\_BmatM e PB\_BmatF) sobre o plasma humano citratado.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Peçonhas brutas de *Bothrops mattogrossensis*

Dois *pools* (macho e fêmea) da peçonha bruta (PB) liofilizados de *Bothrops mattogrossensis* foram cedidos pela Professora MSc. Paula Helena Santa Rita coordenadora do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco-UCDB, Campo Grande, MS, Brasil, conforme “Termos de Procedência de Venenos Ofídicos” (ANEXO 1) e “Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB” (ANEXO 2). As amostras das peçonhas, tanto liofilizadas quanto solubilizadas, foram mantidas sob refrigeração, a -4°C e, durante a realização dos experimentos, as amostras foram mantidas em banho de gelo para evitar a desnaturação de seus conteúdos proteicos.

#### 3.2 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos foram cedidos para a pesquisa pela Agência Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley, UFPB, João Pessoa, PB. Foram utilizadas bolsas contendo concentrados de hemácias dos tipos sanguíneos A, B, AB e O, todos apresentando fator Rh positivo. O armazenamento e a utilização de todo o material biológico utilizado foram realizados de acordo com a resolução CNS N° 441, de 12 de maio de 2011.

#### 3.3 Plasma humano citratado

O sangue venoso de voluntários adultos e sadios foi coletado em tubos de ensaio à vácuo contendo 3,2% (0,109M) de citrato de sódio (1:9). Os doadores permaneceram em jejum por, no mínimo, quatro horas e não fizeram uso de medicação nos dez dias anteriores à coleta. As amostras de sangue total foram centrifugadas a 3.000rpm por 15 minutos e o plasma foi separado em tubos do tipo falcon para realização imediata dos experimentos de coagulação.

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 (lote #6003) e APTT HEMOSTASIS Ref. 502, comercializados pela Labtest Diagnóstica S.A.

### 3.4 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais e a coleta do material biológico foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley CEP/HULW sob o número CAAE 60002616.7.0000.5183 (ANEXO 3), de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional nº 001/2013 - Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e pela Resolução 466/12 - A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

### 3.5 Caracterização da peçonha de *Bothrops mattogrossensis*

O fracionamento dos componentes proteicos dos *pools* da peçonha extraída de machos (PB\_BmatM) e fêmeas (PB\_BmatF) de *B. mattogrossensis* foi realizado por Cromatografia Líquida de Fase Reversa de acordo com a metodologia descrita previamente por Calvete et al (2007) e Rodrigues et al (2012). Foram utilizados o cromatógrafo UFLC (Ultra Flow Liquid Chromatography) LC-6AD da Shimadzu Corporation e a coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (M)) com comprimento de 25cm x 4,6mm, diâmetro do poro de 100Å e diâmetro da película de 5µm.

Para obter as frações proteicas foram utilizados 2,56mg de PB\_BmatM e 2,76mg de PB\_BmatF. Ambos os *pools* de peçonhas foram solubilizados em 500µL de 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) e 5% de 0,05% de acetonitrila (ACN) e posteriormente centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos em temperatura constante de 4°C. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com o Tampão A (0,1% de TFA em água deionizada) e a eluição foi realizada com o gradiente de 0 a 100% do Tampão B (66,5% ACN em 0,1% de TFA). O gradiente linear utilizado para a eluição das frações foi de 0% de Tampão B durante 5 minutos, seguido por 0-20% de Tampão B por 10 minutos, 20-75% de Tampão B por 80 minutos e 75-100% de Tampão B por 5 minutos. O fluxo de eluição utilizado foi de 1,0 mL/min.

A concentração proteica teórica foi aferida por espectrofotometria utilizando-se o NanoDrop 2000c (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) com absorvância (Abs) de 280 nm (1 ABS= 1,0mg/mL).

### 3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A massa molecular dos componentes proteicos de cada fração tanto da PB\_BmatM como da PB\_BmatF isolada por cromatografia líquida de fase reversa foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970) adaptada para placas.

Concentrações de 4% e 13% de solução de monômeros de acrilamida e de bis-acrilamida foram utilizadas no gel de empilhamento e separação, respectivamente.

Alíquotas das frações (10 $\mu$ L) foram adicionadas a 5 $\mu$ L de tampão da amostra desnaturante, aquecidas a 100°C por 5 minutos, centrifugadas e aplicadas no gel. O conteúdo proteico de cada fração foi separado sob corrente constante de 25mA em temperatura ambiente utilizando o tampão de corrida Tris-Glicina. O padrão de massa molecular utilizado foi o PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) contendo 10 padrões de massa molecular (180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 e 10kDa).

O corante utilizado para revelar as proteínas do gel de eletroforese foi o Azul de Coomassie Brilhante G-250. Os géis permaneceram sob agitação por 120 minutos a 40°C e foram descorados em solução de água deionizada, ácido acético e etanol (6:1:3).

As SDS-PAGEs e as análises do padrão de massa molecular do perfil cromatográfico da PB\_BmatM e da PB\_BmatF foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural do Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP em colaboração com o Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador.

### 3.7 Avaliação do potencial hemolítico

A avaliação do potencial hemolítico, *in vitro*, da PB\_BmatF e PB\_BmatM sobre eritrócitos humanos foi realizada conforme algumas adaptações da metodologia descrita por Hubert et al (1997) e Rangel et al (1997).

Para a realização da atividade hemolítica direta e indireta foram utilizadas as quantidades de 1000, 100, 10, 1 e 0,1 $\mu$ g dos *pools* de PB\_BmatM e PB\_BmatF, solubilizados em Tampão Fosfato Salino (PBS – 10x, pH 7,4).

Eritrócitos obtidos do concentrado de hemácias das bolsas de sangue foram lavados três vezes (3.000rpm por cinco minutos a 25°C) com 0,9% (150mM) de cloreto de sódio (NaCl).

Em seguida, foi preparada uma suspensão de 5% de eritrócitos em 0,9% de NaCl. Para a realização de cada experimento de atividade hemolítica direta sobre os eritrócitos, em cada microtubo, foram adicionados 2000µL da suspensão de eritrócitos (SE) acrescido de 100µl das diferentes diluições das peçonhas brutas. As amostras em experimentação foram incubadas a 37°C sob agitação constante (100rpm), durante 60 minutos. Decorrido essa etapa inicial, as amostras foram centrifugadas (3.000rpm/5min/25°C) e o grau de hemólise foi quantificado por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 540nm. Os resultados foram expressos em percentual hemolítico, utilizando os valores de absorbância (Abs) obtidos, de acordo com a equação #1 (HUBERT et al., 1997):

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

O controle positivo (correspondente a 100% de hemólise) foi preparado com 2000µL da SE a 5% acrescido de 20µL de Triton X-100 e para obtenção do controle negativo substituiu-se o Triton X-100 por 100µL de PBS.

Ácido graxo e cálcio são cofatores relevantes para desencadear a atividade catalítica de fosfolipases A<sub>2s</sub>, enzimas responsáveis pela hidrólise dos fosfolipídios de membrana (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000). Dessa forma, para a avaliação da atividade hemolítica indireta, fez-se necessária a adição de 20µL de um complexo de ácidos graxos (ácido eicosapentanoico, EPA e ácido docosahexaenoico, DHA) na concentração de 100% e 0,5µL de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), separadamente e concomitantemente, acrescidos em 2000µL de SE a 5% e 100µL de cada concentração das peçonhas. A leitura e o cálculo do percentual de hemólise foram realizados conforme descritos anteriormente.

Todos os experimentos realizados para avaliar a atividade hemolítica (direta ou indireta) sobre eritrócitos humanos foram feitos em triplicata (n=3).

### **3.8 Avaliação do estresse oxidativo**

A avaliação quantitativa, *in vitro*, da formação de metahemoglobina após exposição da hemoglobina frente as PB\_BmatF e PB\_BmatM foi realizada (com adaptações) conforme a metodologia descrita por NAOUM et al (2004).

Assim, eritrócitos humanos foram lavados três vezes com cloreto de sódio a 0,9% (150mM) e utilizados na preparação de uma suspensão a 30% em PBS – 10x, pH 7,4 acrescidos

de 600µL de glicose a 10% (para prevenir a formação espontânea de metahemoglobina) e 400µL de triton X-100 (para promover a lise celular).

Para avaliar o estresse oxidativo sobre a hemoglobina na presença das amostras (PB\_BmatF e PB\_BmatM) em cinco diferentes quantidades 1000, 100, 10, 1 e 0,1µg foi colocado, em cada microtubo (Tubo\_1) 1000µL de SE a 30% e 100µL da amostra a ser avaliada. Em seguida, os experimentos foram incubados a 37°C sob agitação constante de 100rpm durante 60 minutos. De cada Tubo\_1 foram retirados 25µL e ressuspensos em 750µL de tampão fosfato (PB) (Tubo\_2). A leitura espectrofotométrica do Tubo\_2 foi realizada a 630nm. Posteriormente, retirou-se 75µL doTubo\_2, ressuspendeu em 750µL de PB e a leitura foi realizada por espectrofotometria a 540nm. Os resultados foram calculados com o emprego da equação #2 e expressos em percentual de hemoglobina oxidada a metahemoglobina (mHb) (NAOUM et al., 2004).

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

Os valores entre 1,9% - 3,8% de mHb foram considerados normais. Todos os ensaios de avaliação do estresse oxidativo foram realizados em triplicatas (n=3).

### 3.9 Avaliação da atividade antioxidante

A quantificação, *in vitro*, de metahemoglobina formada após exposição da hemoglobina frente às peçonhas brutas (PB\_BmatF e PB\_BmatM) e posterior adição de fenilhidrazina (PH), um agente oxidante foi obtida com o emprego da metodologia (com adaptações) proposta por NAOUM et al (2004).

Para avaliar o potencial antioxidante das PBs utilizaram-se amostras solubilizadas em cinco diferentes quantidades 1000, 100, 10, 1 e 0,1µg. Inicialmente, foi acrescentado a microtubos 1000µL de SE a 30% e 100µL de PB e em seguida incubados por 60 minutos a 37°C sob agitação constante de 100 rpm. Após essa etapa, foi adicionado 50µL de fenilhidrazina a 1M em cada microtubo (Tubo\_1) e os mesmos foram encaminhadas para incubação por 20 minutos, a 37°C e 100 rpm. Decorrido os períodos de incubação, os microtubos foram centrifugados por cinco minutos a 3000 rpm e 25°C; uma alíquota de 25µL de cada Tubo\_1 foi ressuspensa em 750µL de PB (Tubos\_2) e quantificada por espectrometria a 630nm. Em seguida, 75µL de cada Tubo\_2 foi ressuspensa em 750µL de PB

(Tubo\_3) e quantificado em espectrofotômetro a 540nm. A Equação #2 foi empregada para expressar o percentual de formação de metahemoglobina (mHb). Todos os ensaios da atividade antioxidante foram realizados em triplicatas (n=3).

### 3.10 Avaliação da atividade coagulante

A avaliação do tempo de coagulação, *in vitro*, das PB\_BmatF e PB\_BmatM sobre o plasma humano citratado foi realizada com adaptações da metodologia previamente descrita por Alvarado e Gutiérrez (1988).

Para a análise da atividade coagulante foram utilizadas quatro diferentes quantidades (1,25; 2,5; 5 e 10 $\mu$ g) de cada *pool* da peçonha bruta. 100 $\mu$ L do *pool* de plasma humano citratado foram colocados em tubos de ensaio e mantidos em banho-maria à 37°C. Após aclimatar o plasma, em cada tubo de ensaio foi colocado uma das quantidades de peçonhas a serem analisadas. Posteriormente, a formação do coágulo foi observada e o tempo de formação do coágulo foi anotado.

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

### 3.11 Análise estatística

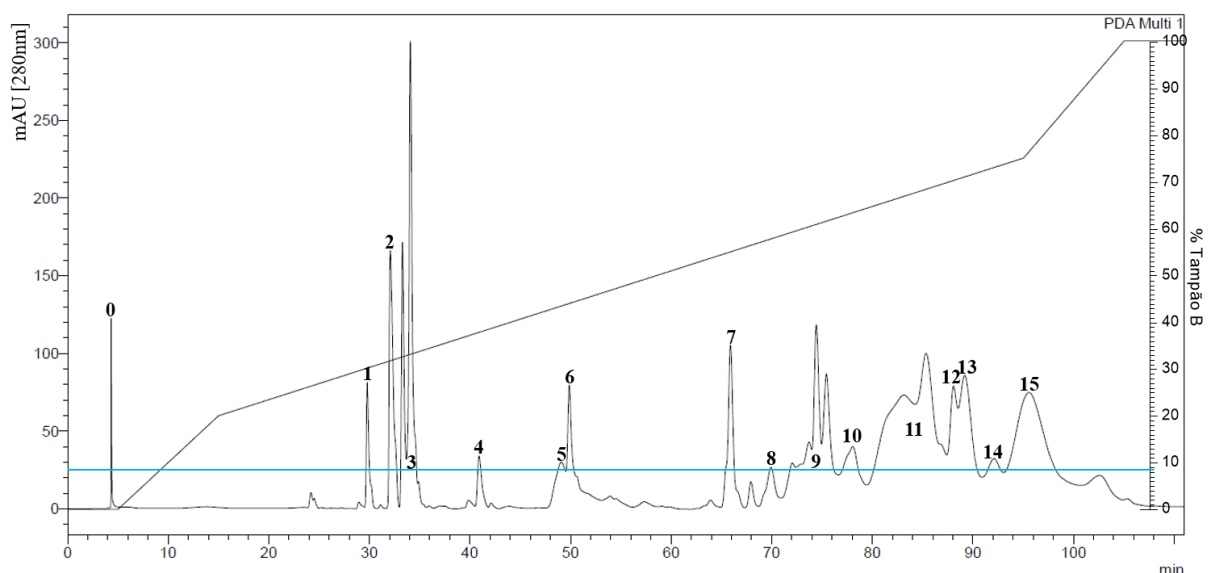
Todos os resultados foram expressos como média e seu correspondente erro padrão (E.P.M.). A análise estatística utilizada foi One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett. Foram consideradas diferenças significativas valores com *p* menor 0,05 (ns: não significante. *p*<0,05; \*: *p*<0,01; \*\*: *p*<0,001; \*\*\*: *p*<0,0001 e \*\*\*\*: *p*<<0,0001). Os dados foram analisados com o emprego do 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 das peçonhas de *Bothrops matogrossensis* macho e fêmea e obtenção das frações proteicas

Para estabelecer o perfil cromatográfico do *pool* da peçonha de fêmeas de *Bothrops matogrossensis* (PB\_BmatF), 2,76mg da peçonha foram separados em 16 frações (denominadas: fr0F - fr15F) e coletadas automaticamente acima de 25mAU. Por espectrofotometria a 280nm, não foram detectadas a presença de proteínas nas frações fr0F, fr4F, fr5F, fr8F e fr9F (Figura 6).

**Figura 6:** Cromatograma da peçonha de fêmeas de *Bothrops matogrossensis*



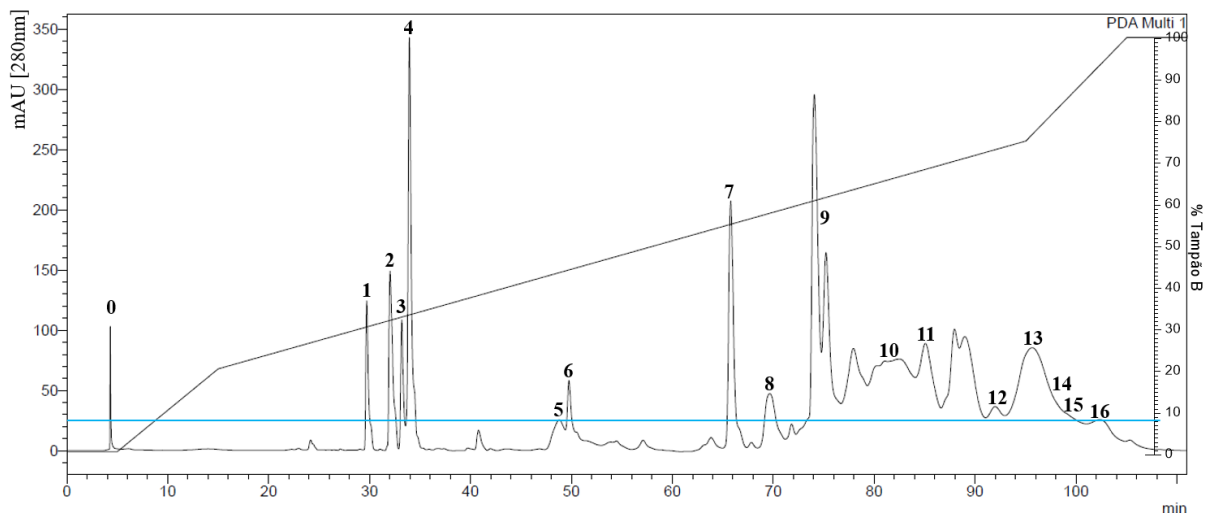
Frações obtidas de 2,76mg do *pool* da peçonha de fêmeas separadas por Cromatografia Líquida de Fase Reversa. As frações foram coletadas automaticamente acima de 25mAU (linha azul) sob temperatura de 4°C.

A fr7F foi separada com 56% de tampão B, após 66 minutos. A coleta de fr9F foi iniciada aos 72 minutos (60% de tampão B) e finalizada aos 76 minutos (62% de tampão B), contendo, no mínimo, quatro picos visíveis. A fr10F foi obtida aos 78 minutos com 64% de tampão B. As fr11F, fr12F e fr13F foram coletadas com 65 a 72% de tampão B, em um intervalo de tempo de 80 a 90 minutos, com vários picos superpostos. A fr15F apresenta, visivelmente, um único pico e foi obtida com 76% de tampão B aos 96 minutos (Tabela 3).

O fracionamento de 2,56mg do *pool* da peçonha de machos de *B. matogrossensis* gerou 17 frações (fr0M a fr16M) coletadas automaticamente acima de 25mAU. Todas as

frações foram quantificadas por espectrofotometria a 280 nm e não foram observadas proteínas na composição das fr0M e fr15M (Figura 7). A fr7M foi eluída aos 66 minutos, com 55% de tampão B. A coleta das frações fr9M a fr11M iniciou aos 78 minutos (61% de tampão B) e finalizou aos 91 minutos (72% de tampão B). As fr12M, fr13M, fr14M e fr15M foram separadas entre 74 a 88% de tampão B, com intervalo de 91 a 100 minutos. A fr16M foi coletada com 95% de tampão B aos 102 minutos (Tabela 3).

**Figura 7:** Cromatograma da peçonha de machos de *Bothrops matogrossensis*



Frações do *pool* da peçonha de machos foram obtidas por Cromatografia Líquida de Fase Reversa, utilizando uma coluna C-18. As frações foram coletadas acima de 25mAU (linha azul) sob temperatura constante de 4°C.

Os perfis cromatográficos dos *pools* das peçonhas brutas de *B. matogrossensis* machos e fêmeas apresentaram resultados semelhantes. As frações cromatográficas correspondentes aos mesmos picos observados em ambos os cromatogramas, bem como o percentual de tampão B e o tempo de eluição estão listadas na tabela 3.

Todas as frações coletadas foram aplicadas em eletroforese de gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 13%, em condições reduzidas (na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol), para analisar a massa molecular das proteínas contidas em cada fração.

A análise da SDS-PAGE da PB\_BmatF, corada com Azul de Coomassie Brilhante g-250, possibilitou inferir que a massa molecular da proteína observada na fr6F é equivalente a ~150kDa. A fr7F apresentou uma única banda com proteína (s) de ~13kDa. A fr9F é composta por duas bandas com massas moleculares de aproximadamente 20 e 13kDa. Já a fr10F apresentou duas bandas correspondentes a proteínas com massa molecular de ~30 e 37 kDa. Observou-se nas fr11F, fr12F, fr13F e fr14F bandas correspondentes a proteínas de ~60kDa.

Ademais, a fr12F apresentou uma proteína de ~20kDa e nas fr13F e fr14F evidenciou-se proteína (s) de aproximadamente 22kDa. A fr15F apresentou uma banda proteica de ~58kDa (Figura 8).

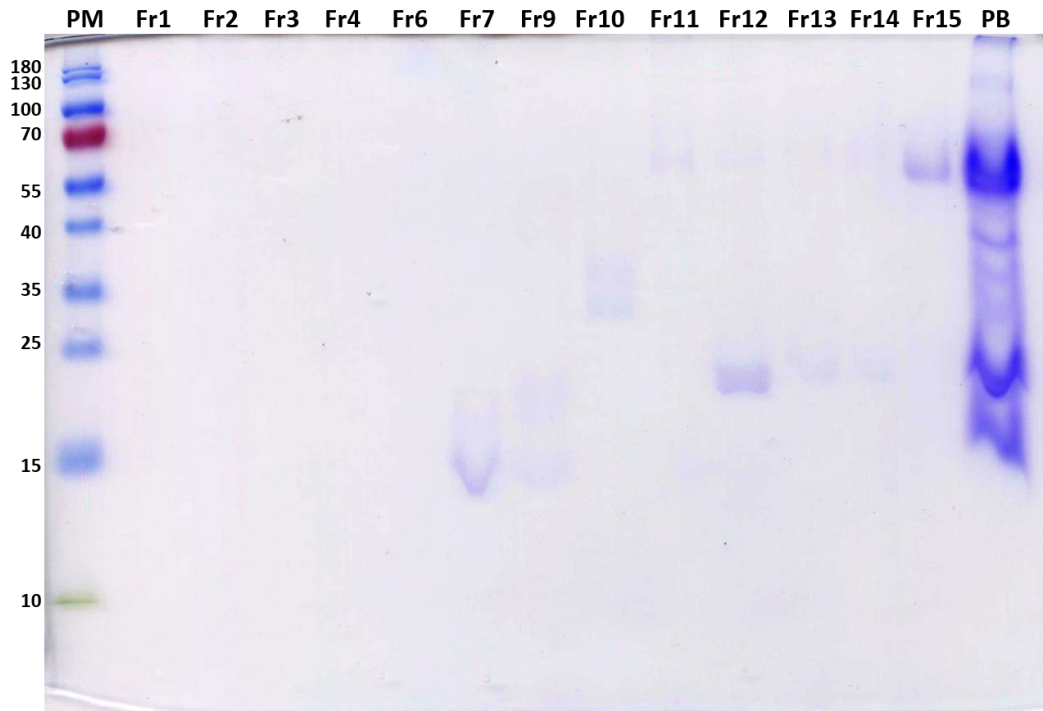
**Tabela 3:** Frações cromatográficas dos *pools* da peçonha de machos e fêmeas de *Bothrops mattogrossensis*, percentual de tampão B e o tempo em minutos.

PB_BmatM	PB_BmatF	% Tampão B	Tempo (minutos)
fr0M	fr0M	0	5
fr1M	fr1F	±30	30
fr2M	fr2F	32	32
fr3M e fr4M	fr3F	±34	34
fr5M	fr5F	44	49
fr6M	fr6F	45	50
fr7M	fr7F	±55	66
fr8M	fr8F	58	70
fr9M	fr9F e fr10F	±61	72-78
fr10M e fr11M	fr11F	65-72	80-91
fr11M	fr12F e fr13F	±71	85-89
fr12M	fr14F	73	92
fr13M	fr15F	±77	95

As frações obtidas a partir da cromatografia líquida de fase reversa dos *pools* das peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. mattogrossensis*. O percentual de tampão B, responsável pela eluição das frações, e o tempo em minutos são semelhantes em ambos os *pools*.

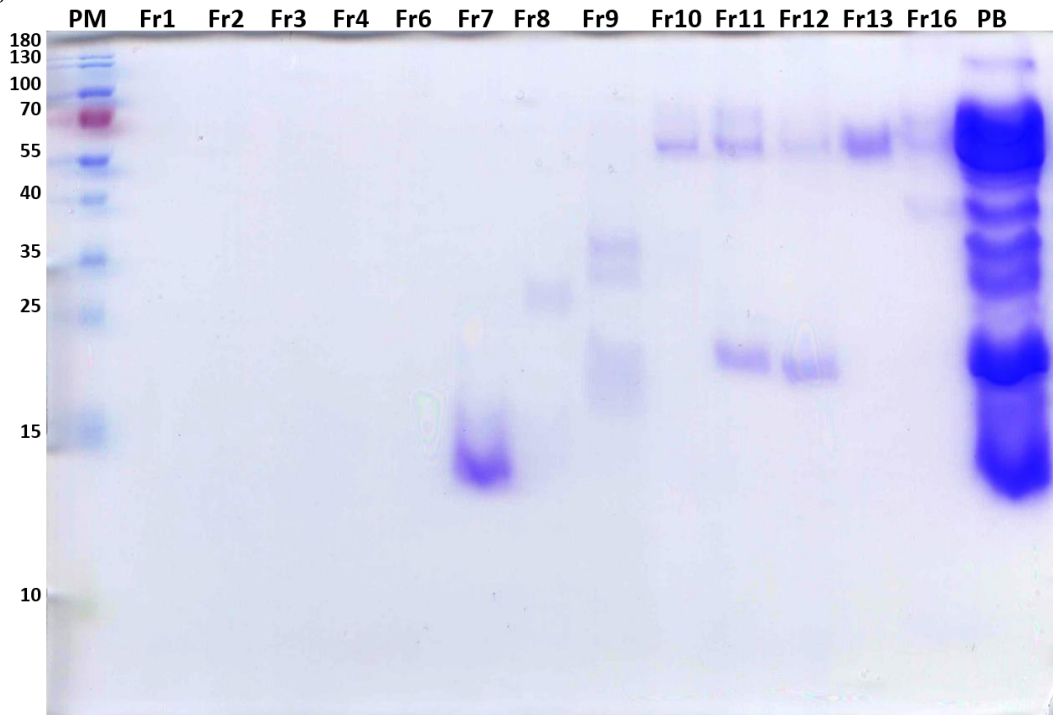
A análise da SDS-PAGE, corada com Azul de Coomassie Brilhante g-250, de PB\_BmatM apresentou bandas fortemente marcadas quando comparadas a peçonha de PB\_BmatF. A fr7M apresentou uma banda fortemente marcada de ~13kDa. Pôde-se inferir que a fr8M possui uma proteína de massa molecular de aproximadamente 25kDa. A fr9M mostrou três bandas referentes a proteínas de massa molecular de ~35, 20 e 16kDa. As fr10M, fr11M e fr12M apresentaram bandas semelhantes que possuem proteína(s) de ~60kDa. Pôde-se verificar também que a fr11M apresentou banda proteica de ~20kDa e as fr12M continha outra de ~18kDa. Os picos referentes às fr13M - fr16M, quando analisados através da SDS-PAGE, indicaram a presença de bandas proteicas com massa molecular estimada em 58kDa. A fr16M, ainda, apresentou uma banda proteica de ~40kDa (Figura 9).

**Figura 8:** Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas da peçonha de fêmeas de *Bothrops mattogrossensis*.



Perfil eletroforético das frações coletadas da cromatografia em fase reversa da peçonha bruta de fêmeas de *B. mattogrossensis*. PM: padrão de massa molecular- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™); fr1F- fr15F: frações proteicas; PB: peçonha bruta.

**Figura 9:** Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidas da peçonha de machos de *Bothrops mattogrossensis*.



Perfil eletroforético das frações obtidas por cromatografia em fase reversa da peçonha bruta de machos de *B. mattogrossensis*. PM: padrão de massa molecular- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™); fr1M- fr16M: frações; PB: peçonha bruta.

Os padrões de bandas proteicas obtidos por SDS-PAGE apresentaram semelhanças entre os *pools* e frações cromatográficas de peçonhas de machos e fêmeas de *B. mattogrossensis*. Comparada as massas moleculares das bandas proteicas obtidas em cada fração com as bandas proteicas do padrão de massa molecular utilizado, pôde-se inferir que a banda proteica presente na fração 7, tanto de fêmeas como de machos, corresponde a ~13kDa. Fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2s</sub>) de peçonhas de serpentes são proteínas com baixa massa molecular, entre 10 a 16kDa (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). Em 2014, Moura e colaboradores purificaram três PLA<sub>2s</sub> da peçonha de *B. mattogrossensis*, com massa molecular de ~13 kDa; dessas, a BmatTXIII apresentou um ácido aspártico na posição 49 (Asp49), enquanto que as BmatTXI e BmatTXII foram classificadas como homólogas por conterem um resíduo de lisina na posição 49 (Lys49).

De acordo com Serrano (2013) e Jorge (2015) a peçonha dos viperídeos é abundante em proteases. Realizando uma análise comparativa entre a massa molecular das frações cromatográficas fr11F-fr14F e fr10M-fr16M com os dados descritos na literatura, foi possível inferir que correspondem a metaloproteinases, proteases dependentes de zinco, que apresentam ~60kDa (KAWANO et al., 2002; MACKESSY, 2010). Em 2015, Sartim et al. isolaram, da peçonha de *B. moojeni*, uma metaloproteinase denominada MooA e ao analisarem essa proteína por SDS-PAGE observaram uma única banda de ~89 kDa em condições não-reduzidas e três bandas de ~65, 17 e 14kDa, quando reduzida.

Oliveira et al. (2016) purificaram uma serinoprotease da peçonha de *B. moojeni* denominada de BmooSP. Através da análise por SDS-PAGE, esses autores concluíram que a proteína isolada possuía uma massa molecular de 36kDa em condições redutoras. Mackessy (2010) afirma que essas proteases possuem massa molecular entre 31-36kDa. Esses dados permitem sugerir que as fr10F e fr9M poderiam corresponder a essas enzimas. As serinoproteases atuam em fatores específicos da cascata de coagulação, contribuindo para a toxicidade da peçonha (SERRANO; MAROUN, 2005).

Complementarmente, análises de perfis dos *pools* de peçonhas de *B. mattogrossensis* com outras espécies do gênero *Bothrops*, permitem constatar semelhanças consideráveis nos cromatogramas. Rodrigues et al. (2012) e Jorge (2015) realizando análises proteômicas, com uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa, das peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops erythromelas*, respectivamente; obtiveram cromatogramas semelhantes aos observados nos *pools* de *B. mattogrossensis*. Assim, esses mesmos autores constataram que os picos referentes às PLA<sub>2s</sub>, encontram-se próximos ao centro dos cromatogramas, logo após estão os picos referentes às serinoproteases, já às

metaloproteinases estão localizadas no final dos cromatogramas. Embora visualmente os cromatogramas apresentem similaridades, faz-se necessário estudos proteômicos mais detalhados dos *pools* de *B. matogrossensis* para identificar, com maior precisão, as proteínas presentes nessas peçonhas.

Os diversos componentes tóxicos da peçonha de serpentes (PLA<sub>2</sub>s, LAAO, metaloproteinases e serinoproteases) são capazes de alterar o sistema hemostático humano através de diferentes mecanismos (SILVA et al. 2014). Para investigar algumas alterações hemostáticas causadas pela presença da peçonha bruta de *B. matogrossensis* (macho e fêmea) foram avaliados os efeitos biológicos contra eritrócitos, hemoglobina e plasma humano.

#### **4.2 Avaliação do efeito hemolítico da peçonha de *Bothrops matogrossensis* em eritrócitos humanos no sistema ABO**

Para avaliar o percentual de lise, *in vitro*, sobre eritrócitos humanos causado pela presença dos *pools* de peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. matogrossensis*, foram realizados experimentos de hemólise direta (suspensão de eritrócitos (SE) e peçonha bruta (PB)) e indireta (SE, PB, ácido graxo (AG) e cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>)).

A presença de hemoglobinas livres no sobrenadante foi avaliada através de espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®), com absorvância de 540nm. A quantidade de hemoglobina, liberada após a lise da membrana eritrocitária, no sobrenadante das amostras representou o grau de hemólise. Devido à alta imunogenicidade do sistema ABO (FREIRE et al., 2015), foram avaliados o efeito hemolítico ocasionado pela presença dos *pools* de peçonhas brutas de *B. matogrossensis* em todos os subgrupos sanguíneos desse sistema.

A análise dos resultados da atividade hemolítica na presença da PB\_BmatF revelou maior percentual hemolítico em eritrócitos do tipo sanguíneo A, especialmente na presença do complexo AG/CaCl<sub>2</sub> nas quantidades de PB: 0,1; 1; 10; 100µg; na quantidade de 1000µg ocorreu hemaglutinação (item 4.4). Ainda, nesse mesmo tipo sanguíneo e na presença da PB\_BmatF, o percentual de hemólise foi significativo na presença de AG em todas as quantidades. Foi verificado hemólise direta na quantidade de 0,1µg da PB\_BmatF, enquanto que, na presença de CaCl<sub>2</sub>, foi significativo nas seguintes quantidades: 1, 10 e 100µg (Figura 10A).

Eritrócitos do tipo sanguíneo B, na presença do *pool* de PB\_BmatF, apresentaram hemólise significativa nas quantidades de 1 a 1000µg na presença do AG; os percentuais

apontaram dose dependência (quanto maior a quantidade de peçonha maior o percentual de hemólise) e compreenderam de 4 a 20% de hemólise. Nesse mesmo tipo sanguíneo ocorreu hemólise significativa nas quantidades de 100 e 1000 $\mu$ g da PB\_BmatF na presença de AG/CaCl<sub>2</sub>. Não ocorreu hemólise direta, bem como hemólise indireta na presença de CaCl<sub>2</sub>, nesse subgrupo do sistema ABO na presença da PB\_BmatF (Figura 10B).

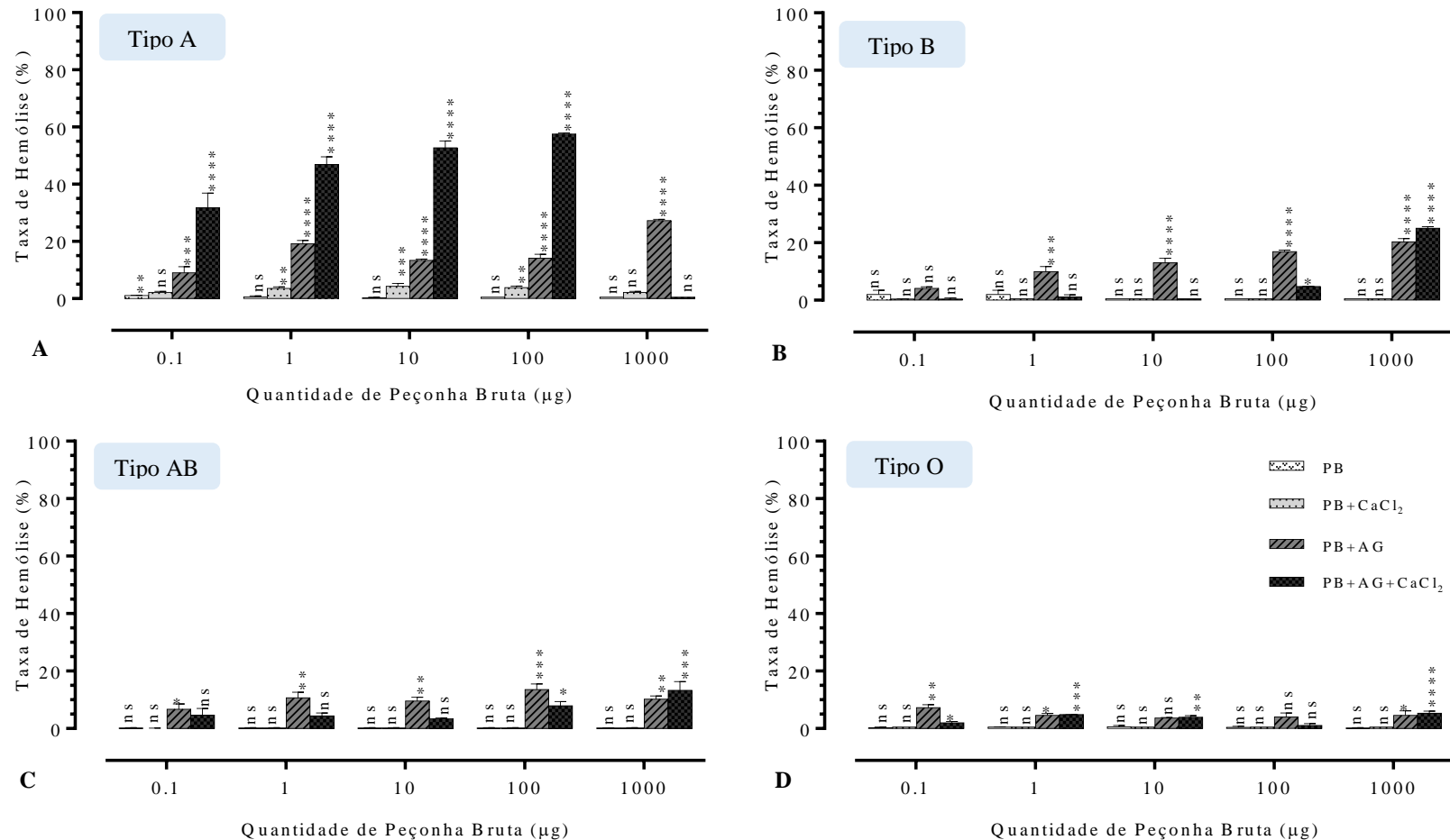
Ainda, na presença da PB\_BmatF, o percentual de hemólise nos eritrócitos dos tipos O e AB foi inferior aos demais tipos sanguíneos. Eritrócitos do tipo AB apresentaram maiores percentuais de hemólise na presença de AG (13% em 100 $\mu$ g da PB) e AG/CaCl<sub>2</sub> (13% em 1000 $\mu$ g da PB) (Figura 10C). O maior percentual de hemólise em eritrócitos do tipo O (7%), foi na quantidade de 0,1 $\mu$ g de PB\_BmatF na presença de AG (Figura 10D).

A análise dos resultados da atividade hemolítica na presença da PB\_BmatM, indicou que os percentuais de hemólise foram maiores nos tipos sanguíneos A e B, na presença de AG e AG/ CaCl<sub>2</sub>. A Figura 11 mostra os percentuais obtidos a partir do grau de hemólise em todos os tipos sanguíneos do sistema ABO. Eritrócitos do tipo sanguíneo A, apresentaram percentual hemolítico significativo apenas na presença de AG, em todas as quantidades de peçonhas analisadas (Figura 11A). Já, eritrócitos do tipo B apresentaram resultados significantes na presença de AG (em todas as quantidades de PB\_BmatM) e AG/CaCl<sub>2</sub> (0,1; 10; 100 e 1000 $\mu$ g de PB\_BmatM) (Figura 11B).

Semelhantemente ao *pool* de PB\_BmatF, o *pool* de PB\_BmatM apresentou menores percentuais de hemólise em eritrócitos dos tipos O e AB. No tipo AB foram verificados percentuais hemolíticos significantes em todas as quantidades de peçonhas brutas testadas na presença do AG. Contudo, esse mesmo tipo apresentou atividade hemolítica significativa na presença de AG/CaCl<sub>2</sub>, apenas nas quantidades 1, 100 e 1000 $\mu$ g (Figura 11C). O percentual hemolítico do *pool* de PB\_BmatM no tipo O apresentou significância na atividade hemolítica direta e na presença de AG apenas nas quantidades 1 e 10 $\mu$ g da PB, no entanto, na presença de AG/CaCl<sub>2</sub> foram verificadas diferenças significativas em todas as quantidades analisadas. Na presença apenas de CaCl<sub>2</sub>, nesse mesmo tipo sanguíneo, foi verificada lise eritrocitária significativa apenas na quantidade de 1 $\mu$ g da PB\_BmatM (Figura 11D).

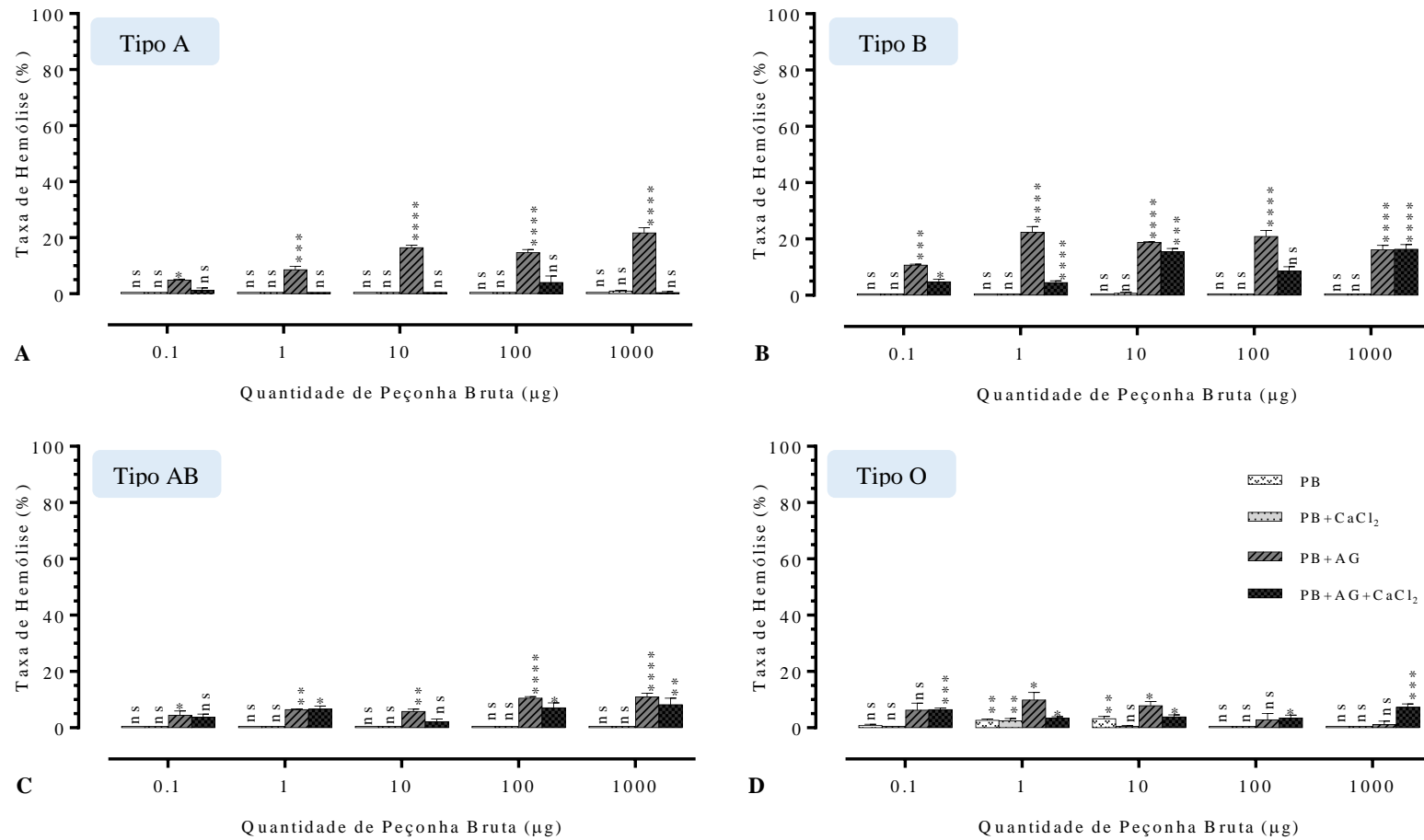
Maior percentual hemólise eritrocitária do tipo sanguíneo A, devido a presença do *pool* da PB\_BmatF, foi obtido na quantidade de 100 $\mu$ g e correspondeu a 57% de hemólise. Enquanto que, na presença do *pool* da PB\_BmatM, os maiores percentuais foram de 21% na quantidade 1000 $\mu$ g do tipo A e 22% na quantidade de 1 $\mu$ g para o tipo B (Figura 10 e 11).

**Figura 10:** Avaliação do percentual de hemólise no sistema ABO do *pool* da peçonha de fêmeas de *Bothrops matogrossensis*.



**A:** Tipo sanguíneo A. **B:** Tipo sanguíneo B. **C:** Tipo sanguíneo AB. **D:** Tipo sanguíneo O. Mensuração da taxa de hemólise sobre eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B, O e AB. A ação citotóxica da peçonha foi avaliada diretamente sobre os eritrócitos na presença e ausência de AG e CaCl<sub>2</sub>. Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). ns: não significativa.  $p < 0,05$ ; \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  (ANOVA e Dunnett).

**Figura 11:** Avaliação do percentual de hemólise no sistema ABO do *pool* da peçonha de machos de *Bothrops matogrossensis*.



**A:** Tipo sanguíneo A. **B:** Tipo sanguíneo B. **C:** Tipo sanguíneo AB. **D:** Tipo sanguíneo O. Análise da taxa de hemólise na presença da peçonha de machos de *B. matogrossensis* sobre eritrócitos dos quatro tipos sanguíneos do sistema ABO. A atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos foi avaliada na presença e ausência de AG e CaCl<sub>2</sub>. Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). ns: não significativa.  $p < 0,05$ ; \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  (ANOVA e Dunnett).

A análise dos resultados da atividade hemolítica permitiu verificar a elevação dos níveis de hemólise quando as PB\_BmatF e PB\_BmatM foram testadas na presença apenas de ácido graxo. Para a realização dos experimentos, foi utilizado um complexo de ácido graxo que possuía o ácido eicosapentanóico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA). O EPA e o DHA são ácidos graxos poli-insaturados que fazem parte do ômega 3 (PERINI et al., 2010). A denominação ômega está relacionada a posição da primeira dupla ligação que é numerada a partir do grupo metil no final da molécula (SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002). De acordo com Calder (2012), existem quatro mecanismos gerais pelos quais esses ácidos graxos afetam o comportamento celular e tecidual: alteração de metabólitos e/ou concentrações hormonais; fatores como oxidação de LDL e estresse oxidativo; efeitos diretos na célula através de receptores de superfície ou intracelulares ligados à ácidos graxos e alterações na composição dos fosfolípidos de membrana celular.

Terano e colaboradores (1983), verificaram a existência de uma correlação positiva entre a composição da membrana plasmática e a quantidade de EPA administrada. Os mesmos autores sugeriram que quanto mais EPA presente na constituição da membrana eritrocitária maior a fluidez, visto que, as propriedades físicas da membrana são determinadas pela composição de ácidos graxos dos seus fosfolipídios. O grau de insaturação é importante pois fornece um ambiente correto para que esta exerça suas funções (BELL et al., 1986). Entretanto, o elevado aumento na fluidez promovido pela incorporação de ácidos graxos, pode afetar as interações intercelulares, expressão de receptores, transporte de nutrientes e transdução de sinais (KELLEY, 2001).

A incorporação de EPA e DHA ocorre de modo dose-dependente e esses ácidos graxos frequentemente substituem os ácidos graxos ômega 6 (BLONK et al., 1990; HEALY et al., 2000; CALDER, 2012). Essas substituições ocorrem com facilidade, possivelmente devido a ação das proteínas de transferência de fosfolipídios (KATAN et al., 1997). Portanto, a elevação de EPA e DHA na membrana celular poderia estar afetando a permeabilidade aos componentes da peçonha ofídica e/ou aumentando a quantidade de substrato para a ação das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

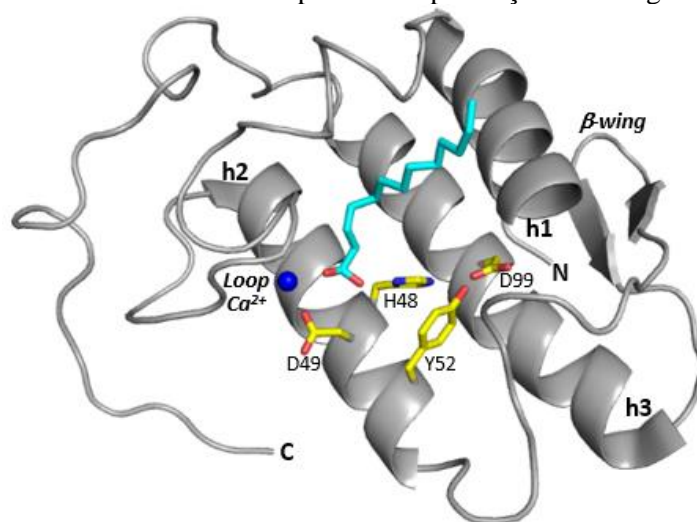
A atividade hemolítica indireta, na presença de ácido graxo (AG) e cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), foi realizada para verificar a ação catalítica das fosfolipases PLA<sub>2</sub>s dos *pools* das peçonhas brutas de *B. mattogrossensis*. A elevação da taxa de hemólise na presença de AG e do complexo AG/CaCl<sub>2</sub> pode ter ocorrido devido a ação das PLA<sub>2</sub>s presentes nas peçonhas de *B. mattogrossensis*. Em 2014, um estudo realizado por Moura e colaboradores evidenciaram a atividade fosfolipásica *in vitro* da peçonha de *B. mattogrossensis*. Ainda, esses mesmos autores

isolaram e caracterizaram três PLA<sub>2</sub>s da peçonha da serpente *B. matogrossensis* e constataram que essas proteínas tinham massa molecular em torno de ~13kDa, o que poderiam corresponder às frações 7, tanto da PB\_BmatF como da PB\_BmatM.

Uma grande quantidade de PLA<sub>2</sub>s da peçonha de serpentes (svPLA<sub>2</sub>s) desencadeiam uma diversidade de funções em células e tecidos. Em serpentes peçonhentas estas proteínas desempenham papel importante na toxicidade da peçonha. As svPLA<sub>2</sub>s são importantes no metabolismo basal dos fosfolipídios em diversas células e exercem uma grande variedade de comportamento frente as membranas biológicas. Em um processo dependente de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), essas enzimas catalisam a hidrólise da ligação éster na posição sn-2 dos fosfolipídios da membrana, o que pode levar a lise celular (DEMEL et al., 1975; DENNIS, 1994; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; ZAMBELLI et al., 2017).

Cofator essencial para a catálise das PLA<sub>2</sub>s, o íon Ca<sup>2+</sup> é coordenado pelo resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49). A associação desse resíduo com outros aminoácidos é responsável pela ação catalítica exercida por estas enzimas. PLA<sub>2</sub>s com lisina na posição 49 (Lys49) não apresentam atividade catalítica. A ação catalítica é inviabilizada pela cadeia lateral da Lys49, que ocupa a posição do íon Ca<sup>2+</sup> (SCOTT et al., 1990; LEE et al., 2001). O sítio catalítico é constituído pelos resíduos de histidina, ácido aspártico, tirosina e outro ácido aspártico nas posições 48, 49, 52 e 99, respectivamente (ARNI; WARD, 1996; DE AZEVEDO et al., 1999). Essas sequências de aminoácidos são altamente conservadas tanto nas Asp49-PLA<sub>2</sub>s como nas Lys49-PLA<sub>2</sub>s (Figura 12) (ARNI; WARD, 1996).

**Figura 12:** Estrutura tridimensional da fosfolipase A<sub>2</sub> na presença de ácido graxo e cálcio.



Representação da estrutura terciária da PLA<sub>2</sub> (Classe II). Em azul escuro está representado o íon cálcio localizado no *loop* de ligação ao Ca<sup>2+</sup>. Em azul claro está a cadeia de ácido graxo no sítio catalítico. Os resíduos polares do sítio catalítico estão representados em amarelo (Asp49, Asp99, His48 e Tyr52), situados no interior das α-hélices 1 e 2 (A numeração é realizada de acordo com RENETSEDER et al., 1985). Imagem obtida com o emprego do programa computacional PyMol v. 1.8.4.0 (DELANO, 2002)

Os resultados obtidos apresentaram percentual de hemólise pouco significativo quando a peçonha bruta de *B. matogrossensis* foi testado apenas na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes resultados corroboram com aqueles de outros estudos, que propuseram que as PLA<sub>2</sub>s Asp49 possuem baixa afinidade ao íon  $\text{Ca}^{2+}$  em meio aquoso, mantendo-se cataliticamente inativas (WACKLIN et al., 2007; TEIXEIRA, 2009). Algumas mudanças conformacionais ocorrem quando a enzima penetra na região hidrofóbica da bicamada lipídica. Essas alterações tornam o sítio catalítico mais acessível ao substrato e ao seu cofator, aumentando a ação enzimática. As propriedades físicas da membrana celular e a constituição lipídica podem ser, portanto, fatores importantes para a catálise enzimática (DE OLIVEIRA et al., 2007; WACKLIN et al., 2007; TEIXEIRA, 2009).

Outro importante aspecto observado nos resultados foram as diferenças encontradas nos percentuais de hemólise quanto aos tipos sanguíneos do sistema ABO. Os antígenos eritrocitários podem ser classificados de acordo com as funções biológicas, podendo possuir o papel de proteínas regulatórias, transporte, proteínas estruturais, receptores e moléculas de adesão. Os antígenos do sistema ABO não possuem funções biológicas bem elucidadas, porém são bastante imunogênicos (BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009). Contudo, a função destes determinantes de carboidrato, ainda é uma questão tentadora e elusiva a ser respondida (WATKINS, 2001).

O gene ABO, localiza-se no cromossomo 9 e é responsável pela expressão das glicosiltransferases (BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009), enzimas capazes de adicionar carboidratos sobre uma estrutura presente na superfície eritrocitária. Os determinantes sorológicos do subgrupos do sistema ABO nas glicoproteínas ativas são resíduos de  $\alpha$ -N- acetil-D-galactosamina para o subgrupo A,  $\alpha$ -D-galactose para o subgrupo B e  $\alpha$ -L-fucose para o subgrupo H (WATKINS, 1966; HUNTER; MUNRO, 1969; BATISSOCO; NOVARETTI, 2003).

Pôde-se verificar que os tipos A e B apresentaram um maior percentual hemolítico na presença das peçonhas de *B. matogrossensis*, em contrapartida, o tipo sanguíneo O apresentou menor percentual de hemólise. Portanto, componente(s) presente(s) nas peçonhas de *B. matogrossensis* podem estar interagindo com os açúcares de membrana N-acetil-D-galactosamina e D-galactose e, conseqüentemente, aumentando a ação catalítica da(s) enzima(s) presentes nas peçonhas.

Os dados obtidos através dos nossos experimentos sugerem uma importância do subgrupo sanguíneo do sistema ABO na toxicidade dos componentes da serpente de *B. matogrossensis* sobre eritrócitos humanos, *in vitro*.

### 4.3 Análise das diferenças entre os sexos da espécie *Bothrops matogrossensis* em relação ao percentual de hemólise dos eritrócitos nos grupos sanguíneos A e B

Os mecanismos fisiopatológicos da peçonha bruta de serpentes podem sofrer variações de acordo com o sexo (WANDERLEY, 2014; JORGE, 2015). Para analisar a significância dos resultados entre machos e fêmeas, foi realizado o teste t não pareado para cada concentração de peçonha testada.

As análises dos percentuais de hemólise na presença dos *pools* de peçonhas de machos e fêmeas foram realizadas somente em eritrócitos dos tipos sanguíneos A e B, pois esses apresentaram maior percentual tanto na presença de ácido graxo como na de ácido graxo/cloreto de cálcio (Figura 13).

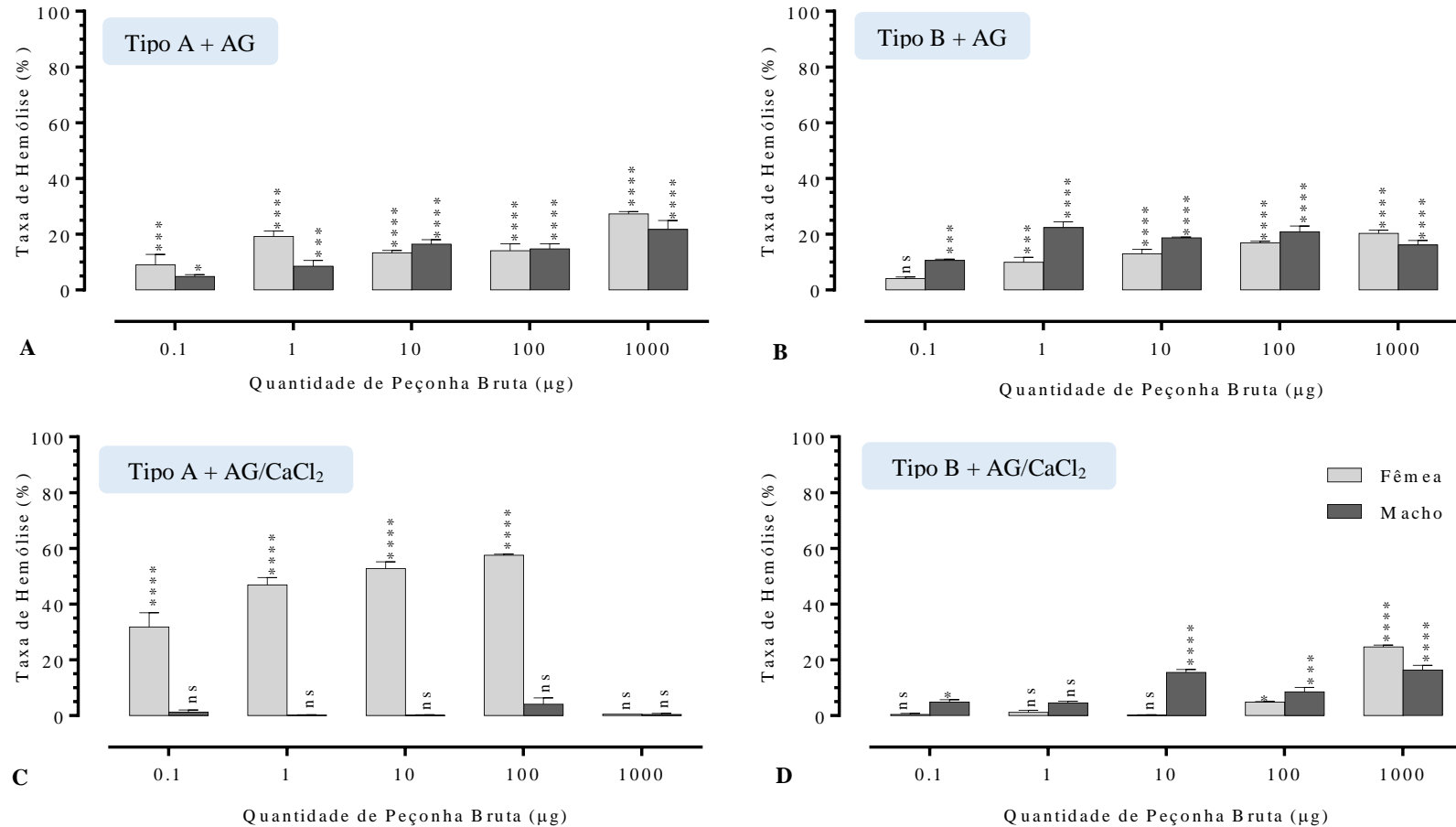
Os eritrócitos do tipo sanguíneo A, na presença de AG, apresentaram hemólise significativas entre machos e fêmeas nas quantidades 1, 10 e 1000 $\mu$ g. A PB\_BmatF exibiu maior potencial hemolítico em relação a PB\_BmatM (Figura 13A). Entretanto, na presença da PB\_BmatM frente a eritrócitos do tipo sanguíneo B foram mais hemolisados nas quantidades de 0,1; 1 e 10 $\mu$ g (Figura 13B).

O percentual de hemólise frente a eritrócitos do tipo A, incubados com AG/CaCl<sub>2</sub> na presença da PB\_BmatF, foi de 32 a 57%, apresentando dose dependência em relação à quantidade de peçonha analisada. Verificou-se, ainda, ausência de lise eritrocitária significativa na quantidade de 1000 $\mu$ g, possivelmente devido a hemaglutinação observada na amostra (Figura 13C). No entanto, eritrócitos do tipo B na presença da PB\_BmatM e AG/CaCl<sub>2</sub> apresentaram maior susceptibilidade à lise quando comparados a PB\_BmatF (Figura 13D).

Embora, Chippaux et al. (1991) e Menezes et al. (2006) tenham relatado que as variações intraespecíficas podem estar relacionadas a mudanças geográficas, idade, dieta, variações sexuais e sazonais, os *pools* de peçonhas PB\_BmatF e PB\_BmatM analisadas foram coletados de espécimes adultos mantidos em cativeiro (serpentário), sob as mesmas condições climáticas e alimentares.

As diferenças na composição e nas atividades biológicas observadas em peçonhas ofídicas extraídos de machos e fêmeas vêm sendo estudadas no decorrer dos anos. Contudo, o significado biológico das diferentes composições não está claro (MACKESSY, 2010).

**Figura 13:** Análise das variações sexuais da peçonha bruta de *Bothrops matogrossensis* na atividade hemolítica



**A:** PB na presença de AG no tipo sanguíneo A. **B:** PB na presença de AG no tipo sanguíneo B. **C:** PB na presença de AG e CaCl<sub>2</sub> no tipo sanguíneo A. **D:** PB na presença de AG e CaCl<sub>2</sub> no tipo sanguíneo B. Comparação entre a taxa de hemólise de PB\_BmatF e PB\_BmatM sobre eritrócitos dos tipos sanguíneos A e B na presença AG e AG com CaCl<sub>2</sub>. Controle positivo: 100% de hemólise. Controle negativo: 0% de hemólise. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). ns: não significativa.  $p < 0,05$ ; \*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  (ANOVA e Dunnett).

Indicações de variações sexuais nos componentes de peçonhas ofídicas surgiram após experimentos de Marsh e Glatston, em 1974. Esses autores notaram que a fêmea de *Bitis nasicornis* continha invariavelmente uma proteína extra. Enquanto, Mebs e Kornalik, em 1984 descobriram que apenas na peçonha de fêmeas de uma única ninhada, estava presente uma toxina básica, embora, essa diferença esteja relacionada a variabilidade individual (MARSH; GLATSTON, 1974; CHIPPAUX et al., 1991).

Furtado e colaboradores (2006), estudaram o dimorfismo sexual em *B. jararaca*, e verificaram que a fêmea apresentava maior tamanho a partir do 12º mês de idade. Esse estudo evidenciou que as fêmeas produziam cinco vezes mais peçonha que os machos e o mesmo era mais potente para atividade hemorrágica e hialuronidásica, além de apresentarem maior letalidade. No entanto, a peçonha dos machos seria mais potente para atividade coagulante, fosfolipásica e miotóxica.

Embora, as variações do efeito hemolítico causadas pela presença das peçonhas de *B. mattogrossensis* machos e fêmeas tenham sido pouco significativas na maioria dos tipos sanguíneos testados, foi observado um maior percentual hemolítico na PB\_BmatF em eritrócitos do tipo A, na presença de AG/CaCl<sub>2</sub>. Essa diferença pode estar relacionada a uma maior atividade fosfolipásica da PB\_BmatF em relação a PB\_BmatM, resultados estes que divergem daqueles obtidos por Furtado et al. (2006).

Pimenta e colaboradores (2007) avaliaram, por espectrometria de massa, peptídeos de 18 espécimes de uma única ninhada de *B. jararaca* no intuito de analisar diferenças entre machos e fêmeas. Todos os animais avaliados eram nascidos e criados no mesmo laboratório, sobre as mesmas condições de habitat e dieta. Curiosamente, nas peçonhas das fêmeas foram verificados quatro novos peptídeos e identificados, de acordo com o sequenciamento, como peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs). Ainda, para esses autores, as diversidades observadas nas peçonhas parecem ser geneticamente herdadas e impostas por questões evolutivas.

De-Oliveira e et al. (2016) realizando estudos com peçonhas extraídas de *B. jararaca* inferiram que a reorganização dinâmica do proteoma dessas peçonhas resulta provavelmente de uma marcante variabilidade intraespecífica. Adicionalmente, esses mesmos autores sugeriram que a modulação da expressão de toxinas pode, possivelmente, envolver regulação hormonal relacionadas ao sexo.

Embora, os supracitados estudos apresentem diferenças na composição e atividades biológicas das peçonhas de machos e fêmeas, informações sobre o porquê dessas variações pertencem escassas.

Os *pools* de peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. matogrossensis* apresentaram diferenças no percentual hemolítico direto e indireto. Portanto, análises proteômicas acuradas são necessárias para evidenciar as diferenças de efeitos biológicos causados pelo ofidísmo.

#### **4.4 Análise da agregação eritrocitária observada durante a atividade hemolítica na peçonha de *Bothrops matogrossensis***

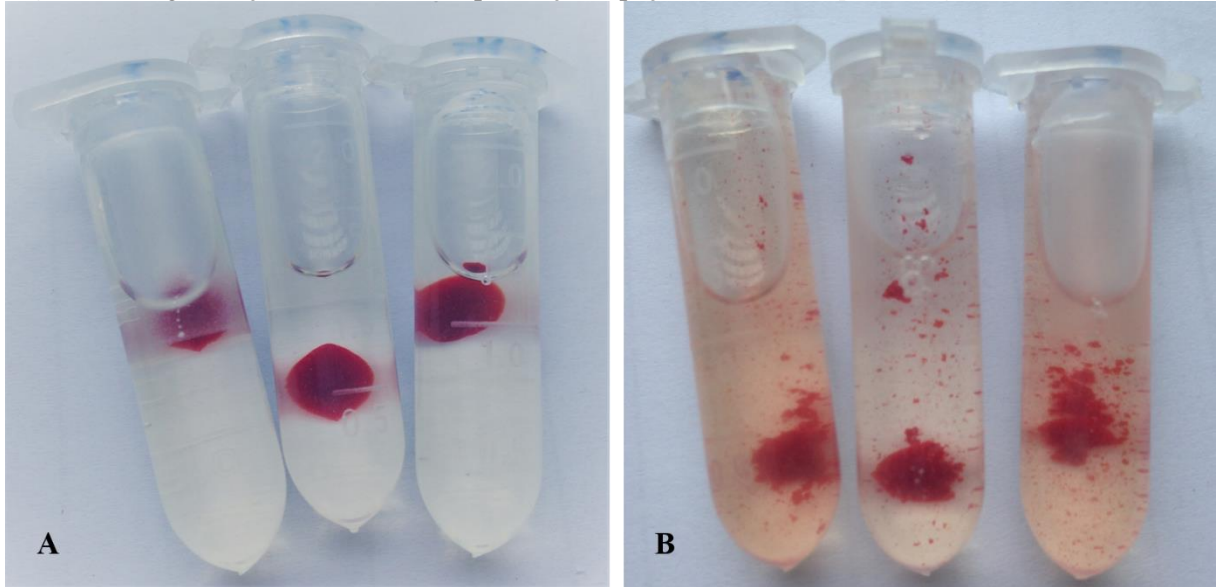
Durante a realização de experimentos de hemólise direta e indireta, pôde-se observar a formação de agregados eritrocitários na presença das maiores quantidades avaliadas de ambos os *pools* de peçonhas brutas de *B. matogrossensis*.

No decorrer da avaliação do efeito hemolítico direto sobre eritrócitos dos tipos A, B e AB, na presença de 1000 $\mu$ g de PB\_BmatF, evidenciou-se a formação de agregados eritrocitários. Ainda, eritrócitos do tipo A apresentaram hemaglutinação na presença de AG/CaCl<sub>2</sub> e 1000 $\mu$ g de PB\_BmatF. Complementarmente, eritrócitos do tipo AB apresentaram hemaglutinação na presença de CaCl<sub>2</sub> (100 e 1000 $\mu$ g do PB), AG (1000 $\mu$ g do PB) e AG/ CaCl<sub>2</sub> (1000 $\mu$ g do PB), no decurso da atividade hemolítica indireta. Em contrapartida, não foi observado hemaglutinação em eritrócitos do tipo B e O durante a realização da atividade hemolítica indireta, bem como na atividade hemolítica direta em eritrócitos do tipo O.

Ocorreu hemaglutinação em eritrócitos dos tipos A, B e AB nas maiores quantidades avaliadas da PB\_BmatM. Pôde-se verificar a formação de agregados em hemácias do tipo A durante a avaliação da atividade hemolítica direta (100 e 1000 $\mu$ g do PB) e indireta (CaCl<sub>2</sub> + 1000 $\mu$ g da PB e AG + 1000 $\mu$ g da PB). Eritrócitos do tipo B apresentaram hemaglutinação durante a atividade hemolítica direta, nas quantidades de 100 e 1000 $\mu$ g da PB. Durante a realização de todos os experimentos para avaliar o efeito hemolítico sobre eritrócitos do tipo AB observaram-se aglomerados eritrocitários na presença das quantidades de 100 e 1000 $\mu$ g da PB (Figura 14). Em hemácias do tipo O foi observada uma tênue agregação eritrocitária, durante a realização da atividade hemolítica direta, na presença de 1000 $\mu$ g de PB\_BmatM.

Embora, tenham observados percentuais hemolíticos elevados das peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. matogrossensis* frente aos eritrócitos dos tipos A e B, pôde-se verificar um menor percentual hemolítico frente a hemácias do tipo AB. Esse percentual abaixo do obtido pode estar relacionado à presença de hemaglutinação visível em hemácias desse tipo sanguíneo.

**Figura 14:** Aglutinação eritrocitária na presença da peçonha de *Bothrops matogrossensis*.



**A:** Eritrócitos do tipo AB na presença de 1000µg da PB\_BmatM. **B:** Eritrócitos do tipo AB na presença de 100µg da PB\_BmatM. Observou-se hemaglutinação mais forte na maior quantidade das peçonhas de machos e fêmeas de *B. matogrossensis* avaliadas, enquanto que, nas concentrações de 100µg observou-se hemaglutinação menos intensa (Fonte: Pesquisa direta, 2015-2016).

A hemaglutinação observada, especialmente em eritrócitos do tipo AB, pode indicar a presença da lectina tipo C (LTC) na peçonha de machos e fêmeas de *B. matogrossensis*. A LTC está presente nas peçonhas de serpentes da família Viparidae, Elapidae e Crotalidae (MACKESSY, 2010). Essa proteína possui domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) encontrado na região C-terminal da proteína (CASTANHEIRA et al., 2013), e podendo induzir aglutinação eritrocitária (GARTNER; OGILVIE, 1984).

De acordo com as características estruturais e atividades biológicas desencadeados por essa proteína, verificou-se que a LTC liga-se à carboidratos específicos (lactose e galactose) (MORITA et al., 2004; LU et al., 2005; JORGE, 2015). Eritrócitos do tipo A apresentam o carboidrato  $\alpha$ -N-acetil-D-galactosamina, enquanto os do tipo B possuem a  $\alpha$ -D-galactose; consequentemente, os do tipo AB apresentam ambos e do tipo O, nenhum desses. Considerando, tais carboidratos da membrana eritrocitária, pode-se inferir que a maior atividade hemaglutinante observada no AB refere-se à especificidade da LTC aos dois tipos de carboidratos.

As *Snaclecs* (Lectinas tipo C-símile/ LTC- símile), embora sejam proteínas conservadas estruturalmente, não reconhecem carboidratos pois, apresentarem domínio incompleto ou ausência de domínio (MORITA et al., 2004; LU et al., 2005; CLEMETSON et al., 2010; ARLINGHAUS; EBLE et al., 2012; JORGE, 2015).

Algumas lectinas causam agregação eritrocitária de modo dose dependente (OGAWA, 2005). Embora, tenha sido percebido que quanto maior a quantidade dos *pools* de peçonhas brutas testadas maior a presença de hemaglutinação visível, dessa forma, estudos adicionais são necessários para identificar as LTC e confirmar efeito de dose dependência na peçonha de *B. matogrossensis*.

Em 2012, Nolte e colaboradores sugeriram que as lectinas possam ser utilizadas em aplicações terapêuticas. Esses autores, verificaram que lectinas purificadas da peçonha de *B. jararacussu* apresentaram efeitos citotóxicos em células de carcinoma gástrico. Ainda, os mesmos autores descreveram que o efeito citotóxico observado ocorria devido a interação direta das lectinas com glicanos presentes na superfície celular, promovendo a desorganização dos filamentos de actina e provocando apoptose.

BIL (lectina ligante de galactosídeo), uma lectina isolada da espécie *B. leucurus*, induziu citotoxicidade em células cancerígenas do tipo melanoma após interagir com a membrana mitocondrial. Além disso, foi descrito que a referida interação ocorreu a partir da desregulação hemostática do cálcio e indução da abertura dos poros de transição de permeabilidade (MPT) (ARANDA-SOUZA et al., 2014).

BJcuL, outra lectina tipo C isolada da peçonha de *B. jararacussu* provocou ativação em macrófagos humanos, *in vitro*, após interagir com os glicoconjugados da membrana celular (DIAS-NETIPANYI et al., 2016). Ademais, Sartim et al. (2017), descreveram que essa proteína apresentou outras atividades biológicas, como a indução de apoptose e interrupção da estrutura de biofilme microbiano.

Diante do acima exposto, esses estudos indicaram que a lectina tipo C possui grande potencial farmacológico para o tratamento do câncer, gerando perspectivas para elucidá-las estruturalmente e, conseqüentemente, inferir sua função no envenenamento (CASTANHEIRA et al., 2013; PIRES et al., 2017).

#### **4.5 Avaliação do potencial oxidante e antioxidante da peçonha bruta de *Bothrops matogrossensis***

A toxicidade da peçonha ofídica está associada, também, ao estresse oxidativo desencadeado por seus componentes. O percentual de oxidação de hemoglobina à metahemoglobina (mHb) foi aferido, por espectrofotometria, na presença e na ausência de um agente oxidante, a fenilhidrazina. Os percentuais de metahemoglobina considerados normais compreenderam entre 1,9 a 3,8% (NAOUM et al., 2004).

Durante a realização de experimentos para avaliar a atividade oxidante, as hemoglobinas, na presença dos *pools* das peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. matto grossensis*, não foram oxidadas à metahemoglobina. No entanto, pôde-se observar que na quantidade de 1000µg de ambos as peçonhas e na quantidade de 100µg da PB\_BmatM, houve menor formação de metahemoglobina quando comparado ao controle negativo. Os controles negativos foram 4,0 e 3,5% para os *pools* de PB\_BmatM e PB\_BmatF, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4:** Atividade oxidante na presença das peçonhas brutas de *Bothrops matto grossensis* machos e fêmeas sobre a hemoglobina

	Taxa de oxidação (%mHb)				
	0,1µg	1µg	10µg	100µg	1000µg
<b>PB_BmatM</b>	3,7±0,087	3,9±0,220	3,7±0,046	3,1±0,118**	2,8±0,217***
<b>PB_BmatF</b>	3,2±0,235	3,1±0,038	3,4±0,118	3,2±0,159	2,6±0,094**

O controle negativo: 4% para PB\_BmatM e 3,5% para PB\_BmatF. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). \*\*: valor de p<0,001 e \*\*\*: valor de p<0,0001 (ANOVA e Dunnett).

Os *pools* das peçonhas brutas de *B. matto grossensis* não apresentaram potencial antioxidante sobre hemoglobina humana na presença do agente oxidante fenilhidrazina. O percentual de metahemoglobina para o controle positivo correspondeu a 52% para a PB\_BmatM e 53% para a PB\_BmatF (Tabela 5).

**Tabela 5:** Atividade antioxidante na presença da peçonha bruta de *Bothrops matto grossensis* machos e fêmeas sobre a hemoglobina

	Taxa de oxidação (%mHb)				
	0,1µg	1µg	10µg	100µg	1000µg
<b>PB_BmatM</b>	50,1±2,598	54,2±0,822	56,9±0,335	56,9±2,280	56,9±0,663
<b>PB_BmatF</b>	44,3±1,655	45,4±1,346	48,1±4,943	49,3±1,219	49,9±4,596

Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3). O controle positivo: 52% para PB\_BmatM e 53% para PB\_BmatF.

Izidoro (2014) descreveu que o mecanismo enzimático da LAAO produz, como um dos produtos de sua ação enzimática, o peróxido de hidrogênio e que esse apresenta efeito altamente tóxico sobre ácidos nucleicos, proteínas e membranas celulares. Essas espécies reativas de oxigênio (ROS) possuem ação direta em células provocando necrose ou apoptose. Embora, a presença de uma LAAO na peçonha de *B. matto grossensis* já tenha sido relatada por

Okubo et al. (2012), não foram observados, em nossos estudos, efeitos oxidantes sobre hemoglobina humana na presença dos *pools* das peçonhas brutas de *B. matogrossensis*.

Haffor e Al-Sadoon (2008) avaliaram, *in vivo*, a produção de espécies reativas de oxigênio após injeção intraperitoneal da peçonha bruta da serpente *Cerastes cerastes gasperetti*, e constataram que houve a redução na produção de radicais livres em relação ao grupo controle. Desse modo, esses autores sugeriram que a peçonha pode conter um fator que estaria ativando a defesa antioxidante biológica dos animais utilizados suprimindo, portanto, a produção de espécies reativas de oxigênio.

Em 2010, Ferreira avaliou, *in vivo*, o efeito neuroprotetor e/ou neurotóxico de peptídeos de baixa massa molecular de três peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. Como resultado, verificou que as frações peptídicas obtidas de *B. atrox* e *B. jararaca*, inibiram a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), apresentando potencial efeito neuroprotetor em cérebros de ratos. Contudo, esse autor descreveu que a fração peptídica proveniente de *B. pirajai* é capaz de induzir estresse oxidativo, sendo potencialmente neurotóxica.

Em outro estudo, dessa vez com o veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, Lopes et al. (2013) descreveram a ocorrência tanto de efeito antioxidante quanto de pró-oxidante, causados por esse veneno, em cérebros de ratos. Essa ambiguidade nesses resultados pode estar relacionada à via de administração do veneno bruto; pois experimentos realizados por administração via intraperitoneal reduziram os parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal, enquanto que aqueles realizados por via endovenosa causaram o efeito oposto. Portanto, segundo esses autores, a via de administração intraperitoneal poderia reter componentes de elevada massa molecular presentes no veneno de *Dinoponera quadriceps* desencadeando um efeito neuroprotetor.

Yamachita (2013) narrou que as atividades biológicas características da peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* apresentam ampla complexidade, uma vez que diferentes proteínas são capazes de induzir um único efeito, ativando-se sinergicamente; ou uma única proteína é capaz de desencadear mais de um efeito.

A diversidade de efeitos tóxicos produzidos por peçonhas ofídicas pode ser justificada pela coexistência tanto de proteínas pró-oxidantes quanto antioxidantes. Este estudo descreve, pela primeira vez, uma redução, estatisticamente significativa, na oxidação espontânea da hemoglobina na presença da peçonha bruta de *B. matogrossensis*. Contudo, o emprego de metodologias complementares poderá detalhar melhor os efeitos causados pelos radicais livres no empeçonhamento botrópico.

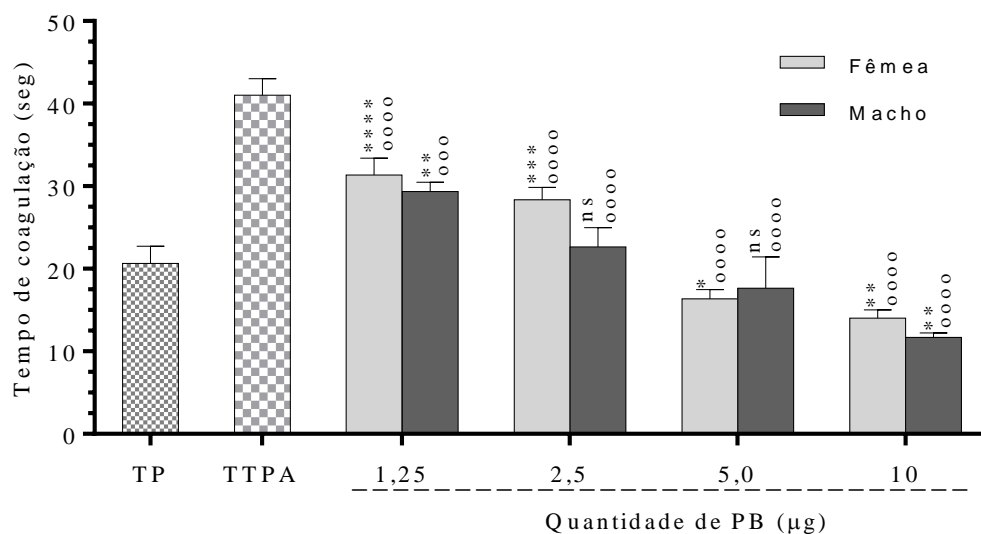
#### 4.6 Avaliação do efeito coagulante causado pelas peçonhas brutas de *Bothrops matogrossensis*

O efeito coagulante, *in vitro*, dos pools da peçonha de machos e fêmeas de *B. matogrossensis* sobre o plasma humano citratado foi avaliado através da observação do tempo de formação de coágulos. Como resultado geral, observou-se que ambas as peçonhas apresentaram rápida coagulação em plasma humano citratado.

Os pools das peçonhas brutas de *B. matogrossensis* apresentaram dose dependência em relação à quantidade testada e o tempo de coagulação observado. Na menor quantidade avaliada (1,25µg) da PB\_BmatM a formação de coágulo ocorreu após 29 segundos, enquanto que na maior quantidade (10µg) o tempo foi de 10 segundos. Na presença da PB\_BmatF, a formação do coágulo aconteceu após 31 segundos na quantidade de 1,25µg e 14 segundos com 10µg.

Os resultados obtidos foram comparados, estatisticamente, com dois controles: um de via intrínseca, o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e outro de via extrínseca, o tempo de protrombina (TP). Foram constatadas diferenças significativas na comparação do tempo de coagulação de todos os resultados obtidos com o TTPA, enquanto que, quando comparados ao TP, somente a PB\_BmatM nas quantidades de 1,0 e 2,0µg não apresentou diferenças significativas (Figura 15).

**Figura 15:** Atividade coagulante das peçonhas brutas de *Bothrops matogrossensis*.



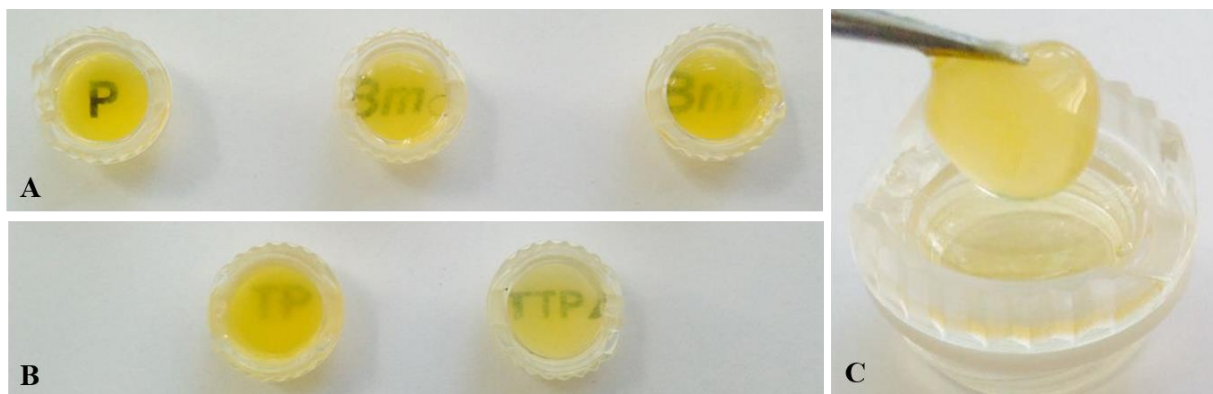
Avaliação do efeito coagulante da peçonha bruta de fêmeas e machos de *B. matogrossensis* sobre o plasma humano citratado. TP: Tempo de Protrombina; TTPA: Tempo de Tromboplastina Ativada; PB: peçonha bruta. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n=3) - ns: não significante. valor de  $p < 0,05$ ; \* ou o: valor de  $p < 0,01$ ; \*\* ou oo: valor de  $p < 0,001$ ; \*\*\* ou ooo: valor de  $p < 0,0001$  e \*\*\*\* ou oooo: valor de  $p < 0,0001$  (\*: PT e o: APTT).

Para a análise comparativa da atividade coagulante da PB\_BmatF e PB\_BmatM foi aplicado o teste t não-pareado. Os dados obtidos foram estatisticamente significativos nas quantidades de 2,5 ( $p < 0,05$ ) e 10 $\mu$ g ( $p < 0,05$ ), nas quais a PB\_BmatM apresentou maior potencial coagulante.

Durante a realização do experimento de coagulação, o aspecto visual dos coágulos formados pela adição de todas as quantidades testadas de PB\_BmatM e PB\_BmatF puderam ser descritos como coágulos de aparência turva, consistente e estável (Figuras 16A e C). Da mesma forma, o aspecto físico do coágulo controle formado com o emprego dos testes de coagulação PT HEMOSTASIS Ref. 501 e TTPA HEMOSTASIS Ref. 502 foi semelhante aos observados na PB\_BmatF e PB\_BmatM (Figura 16B).

A atividade coagulante exercida pela peçonha da serpente *B. matogrossensis* foi evidenciada, pelos resultados obtidos, como uma atividade dose dependente, corrobora com o estudo realizado por Moura et al. (2014). Nesse mesmo estudo, Moura et al. (2014) apontaram que a dose mínima de coagulação (DMC) (quantidade de peçonha capaz de coagular o plasma em 1 minuto), foi de 0,325 $\mu$ g, tal qual verificou-se nos dados estimados em nossos experimentos.

**Figura 16:** Aspecto físico dos coágulos formados na presença dos *pools* de *B. matogrossensis*, do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).



**A:** P: 300 $\mu$ L de plasma humano citratado; Bm $\text{\textcircled{M}}$  e Bm $\text{\textcircled{F}}$ : coágulos formados pela presença da PB\_BmatM e PB\_BmatF, respectivamente. **B:** Coágulos formados com a utilização do teste de coagulação PT HEMOSTASIS Ref. 501 (TP) e do teste de coagulação TTPA HEMOSTASIS Ref. 502 (TTPA). **C:** Aspecto físico do coágulo formado na presença da PB\_BmatM (Fonte: Pesquisa direta, 2016).

Na década de 50, os pesquisadores já tinham indícios de que enzimas presentes na peçonha de serpentes tinham a capacidade de acelerar a coagulação sanguínea (SERRANO; MAROUN, 2005). Desde então, estudos sobre a composição e atuação de cada componente das peçonhas ofídicas estão sendo realizados.

Rosing et al. (2001) afirmaram que, para quase todos os fatores da cascata de coagulação, há uma protease de peçonha ofídica que pode ativá-lo. Os aspectos físicos observados nos coágulos dos *pools* das peçonhas de *B. matogrossensis* podem estar relacionados à ativação de fatores de coagulação específicos.

A peçonha botrópica atua em três locais distintos da cascata de coagulação: diretamente sobre o fator X, sobre a protrombina (fator II) e sobre o fibrinogênio (fator I) (CASTRO, 2006). O fator X, quando ativado, inicia via comum formando o complexo protrombinase (formado pelos fatores Va e Xa, na presença do  $\text{Ca}^{2+}$ ), enquanto que, o fator II é ativado em trombina (fator IIa) pelo complexo protrombinase e o fibrinogênio é convertido em fibrina pela ação da trombina (na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Contudo, até o momento, não existem estudos que descrevam como a peçonha de *B. matogrossensis* atua na hemostasia secundária.

As serinoproteases estão diretamente envolvidas em eventos proteolíticos causando distúrbios na hemostasia observados durante o envenenamento (SERRANO; MAROUN, 2005). Isabel e colaboradores (2016) isolaram a rBpSP-II, proteína do tipo serinoprotease extraída do veneno de *B. pauloensis* e essa enzima apresentou atividade trombina-like. De acordo com Mackessy (2010), as serinoproteases apresentam massa molecular em torno de 31 a 36kDa. Esses dados sugerem que as fr10F e fr9M presentes nas peçonhas de *B. matogrossensis* podem corresponder à serinoproteases. Portanto, essas enzimas poderiam estar desencadeando o efeito potencialmente coagulante dessas peçonhas no plasma citratado humano.

Diaz et al. (1995) e Kerns et al. (1999) sugeriram que fosfolipases  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) de peçonhas de serpentes inibem a formação do complexo protrombinase por interação direta com o fator Xa o que, por consequência impede a coagulação. Durante a análise visual do coágulo formado pela presença das peçonhas de *B. matogrossensis* foi verificado que uma diminuta parcela do plasma não compunha o coágulo (Figura 16C). Adicionalmente, o plasma não coagulado apresentou-se menos viscoso em relação ao plasma utilizado, fato que pode ser explicado devido à ação das  $\text{PLA}_2$ .

Estudos com a peçonha de *Bothrops jararaca* apontaram que esse poderia ativar os fatores I, II, V, VII e X, enquanto que a peçonha de *B. atrox* atuaria nos fatores V, VIII e XIII da cascata de coagulação (HATI et al., 1999; CASTRO, 2006). O controle de coagulação realizado com o emprego do kit de coagulação PT Hemostasis continha tromboplastina (fator III) extraída do cérebro de coelho, a qual desencadeia o mecanismo de coagulação da via extrínseca formando, com o fator VII um complexo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Os resultados obtidos referentes à atividade coagulante da PB\_BmatM, de acordo com as análises estatísticas, apresentaram semelhanças no tempo de formação do coágulo quando comparado ao controle para via extrínseca. Esses resultados corroboram com os dados obtidos para peçonha de *B. jararaca* descritos por Hati et al., (1999) e Castro (2006). Adicionalmente, estudos filogenéticos feitos por Fenwick et al. (2009) agruparam *B. jararaca* e *B. matto grossensis* no mesmo clado ratificando a atuação da PB\_BmatM na via extrínseca.

Em relação às diferenças sexuais, o *pool* de peçonha bruta de machos de *B. matto grossensis* apresentou maior potencial coagulante em relação ao *pool* da peçonha das fêmeas. Estudo realizado por Furtado et al., em 2006, também verificou maior potencial de coagulação significativo ( $p < 0,001$ ), na peçonha de machos de *B. jararaca*. Contudo, no estudo realizado por Silva, em 2001, em *pools* de machos e fêmeas de *B. leucurus*, verificou-se que o *pool* de fêmeas apresentava veneno bruto com maior potencial coagulante que o *pool* dos machos. Logo, o grau de coagulopatia pode variar tanto em relação às diferenças sexuais de uma mesma espécie quanto devido às diferenças sexuais em espécies diferentes do gênero *Bothrops*.

BpirSP-39 e BmooSP são serinoproteases isoladas das peçonhas de *B. pirajai* e *B. moojeni*, respectivamente. Zaqueo e colaboradores (2014) descreveram que a BpirSP-39 apresentou massa molecular de 39kDa, atividade dose-dependente em relação ao tempo de coagulação e verificaram ainda que esta enzima ativa o fator XIII da cascata de coagulação, em contraste com a maioria das peçonhas ofídicas. Enquanto que, Oliveira et al. (2016) relataram que a BmooSP apresentou atividade coagulante *in vitro* e sugeriram a utilização dessa enzima para fins terapêuticos devido a redução dos níveis de fibrinogênio no plasma, e como possível substituição nas suturas tradicionais em pequenas cirurgias.

Clemetson e colaboradores (2007) disseram que as proteínas da peçonha de serpentes fornecem ferramentas úteis para explorar os mecanismos hemostáticos. Esses mesmos autores, afirmaram que essas enzimas foram utilizadas na identificação e isolamento de novos receptores plaquetários, bem como no fornecimento de agonistas específicos para descrever as vias de sinalização desses receptores. Assim, os efeitos biológicos desencadeados por componentes de peçonhas ofídicas podem ser utilizados tanto para diagnóstico quanto para terapêutica (CLEMETSON et al., 2007).

Embora os *pools* das peçonhas brutas de fêmeas e machos de *B. matto grossensis* tenham apresentado características semelhantes quanto à composição, foram verificadas diferenças quanto à toxicidade. Dessa maneira, os resultados obtidos poderão ser usados como premissas de análises, *in vivo*, dos efeitos tóxicos desencadeados pelo envenenamento por *B.*

*matogrossensis* e, quiçá, abrir novas indagações e buscas sobre sua atuação detalhada frente aos diferentes tipos sanguíneos do sistema ABO.

## 5 CONCLUSÃO

- Os *pools* das peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. matogrossensis* apresentaram perfis cromatográficos e eletroforéticos semelhantes.
- Os eritrócitos dos tipos sanguíneos A e B apresentaram maior percentual de hemólise na presença de ambas as peçonhas. O maior percentual hemolítico foi observado em eritrócitos do tipo A, na presença da PB\_BmatF.
- Constatou-se efeito hemaglutinante das peçonhas avaliadas sobre eritrócitos de todos os grupos sanguíneos do sistema ABO; exceto eritrócitos do tipo O na presença da PB\_BmatF.
- Os *pools* de peçonhas brutas de machos e fêmeas de *B. matogrossensis* não apresentaram perfil oxidante e antioxidante. Contudo, pôde-se constatar redução do percentual de metahemoglobina na presença das peçonhas.
- O tempo para a formação do coágulo plasmático foi indiretamente proporcional à quantidade das peçonhas brutas utilizados. Foi possível evidenciar que a PB\_BmatM apresentou maior potencial coagulante.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar estudos proteômicos mais detalhados para identificar com maior precisão as proteínas presentes nestas peçonhas.
- Realizar novas atividades biológicas para verificar às variações sexuais relacionadas à peçonha de *B. matogrossensis*.
- Aplicar novas metodologias para verificar os efeitos dessas peçonhas na produção de radicais livres.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; RAFF; ROBERTS; WALTER. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of *Bothrops asper* (Viperidae). **Revista de Biologia Tropical**, 36: 263-5, 1988.
- ALVARENGA, E. S.; SILVA, S. A.; BAROSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; PARREIRA, A. G.; RIBEIRO, R. I. M. A.; MARCUSSI, S.; FERREIRA, R. R.; GRANJEIRO, P. A.; SILVA, J. A.; SOARES, A. M.; MARANGONI, S.; DA SILVA, S. L.. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, 57:100-108, 2011.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of *Bothrops* toxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 82: 755-763, 2000.
- ANVISA -. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília, 2010.
- ARANDA-SOUZA, M. A.; ROSSATO, F. A.; COSTA, R. A. P.; FIGUEIRA, T. R.; CASTILHO, R. F.; GUARNIERE, M. C.; NUNES, E. S.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; VERCESI, A. E.. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**, 82: 97-103, 2014.
- ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A.. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, 60: 512-519, 2012.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A<sub>2</sub> - a structural review. **Toxicon**, 34: 827-841, 1996.
- ASSAFIM, M.; CORIOLANO, E. C.; BENEDITO, S. E.; FERNANDES, C. P.; LOBO, J. F. R.; SANCHEZ, E. F.; ROCHA, L. M.; FULY, A. L.. *Hypericum brasiliense* plant extract neutralizes some biological effects of *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venom Research**, 2: 11-16, 2011.
- BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARDSON, J. B.; FOX, J. W.. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 275: 63- 71, 1982.
- BARONE, J. M.; ALPONTI, R. F.; FREZZATTI, R.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F.. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice. **Toxicon**, 57: 148-156, 2011.
- BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z.. Aspectos moleculares do Sistema Sanguíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 25: 47-58, 2003.
- BELL, M. V.; HENDERSON, R. J.; SARGENT, R.. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 83: 711-719, 1986.
- BERNARDE, P. S. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil. São Paulo: **Anolisbooks**; 2014.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W.. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**. 62: 325-372, 1994.

BLONK, M. C.; BILO, H. J; POPP-SNIJDERS, C.; MULDER, C.; DONKER, A. J.. Dose response effects of fish oil supplementation in healthy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 52: 120-127, 1990.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J.. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Caderno de Saúde Pública**. 19: 7-16, 2003.

BONIFÁCIO, S. L.; NOVARETTI, M. C. Z.. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 31: 104-111, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Descrição do agravo**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/614-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/11-acidentes-por-animais-peconhentos/13928-descricao-animais-peconhentos>>. Acesso em 23/08/2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde: animais peçonhentos-serpentes**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/animais-peconhentos-serpentes>>. Acesso em 14/02/2017.

BREGGE-SILVA, C.; NONATO, M. C.; ALBUQUERQUE, S.; HO, P. L.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L.; VASCONCELOS DINIZ, M. R.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ARANTES, E. C.. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**. 60: 1263–1276, 2012.

CALDER, P. C.. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **Journal of Nutrition**. 142: 592-599, 2012.

CALVETE, J. J.. The disulfide bond pattern of catrocollastatin C, a disintegrin-like cysteine-rich protein isolated from *Crotalus atrox* venom. **Protein Science**. 9: 1365-1373, 2000.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L.. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**. 45: 1063-1074, 2005.

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**. 6: 326-336, 2007.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C. O.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, P. S.; GOULART, T. M.; RODRIGUES, R. S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; YONEYAMA, K. A. G.; RODRIGUES, V. M.. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**. 54: p.57-64, 2013.

CASTRO, I.. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O Mundo da Saúde**. 30: 644-653, 2006.

CHEN, H. S.; WANG, Y. M.; HUANG, W. T.; HUANG, K. F.; TSAI, I. H.. Cloning, characterization and mutagenesis of Russell's viper venom l-amino acid oxidase: insights into its catalytic mechanism. **Biochimie**. 94: 335–344, 2012.

CHIPPAUX, J. P.. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**. 5: 515-524, 1998.

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

CISCOTTO, Paula Henriques Cruz. **Purificação e caracterização biológica (estrutural, antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de componentes do veneno da serpente Bothrops jararaca**. 2005. 102 f. Dissertação.

CLEMETSON, K. J.. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**. 56: 1236-1246, 2010.

CLEMETSON, K. J.; LU, Q.; CLEMETSON, J. M.. Snake Venom Proteins Affecting Platelets and Their Applications to Anti-Thrombotic Research. **Current Pharmaceutical Design**. 13: 2887-2892, 2007.

DE AZEVEDO, J. R., W.F.; WARD, R. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ARNI, R. K. Structure of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (Jumping Viper). **Toxicon**. 37: 371-384, 1999.

DE- OLIVEIRA, C. A.; STUGINSKI, D. R.; KITANO, E. S.; ANDRADE-SILVA, D.; LIBERATO, T.; FUKUSHIMA, I.; SERRANO, S. M. T.; ZELANIS, A.. Dynamic rearrangement in snake venom gland proteome: insights into *Bothrops jararaca* intraspecific venom variation. **Journal of Proteome Research**. 15: 3752- 3762, 2016.

DE OLIVEIRA, T. C.; AMORIM, H. L. N.; GUIMARÃES, J. A.. Interfacial activation of snake venom phospholipases A<sub>2</sub> (svPLA<sub>2</sub>) probed by molecular dynamics simulations. **Theochem**. 818: 31-41, 2007.

DELANO, W.S. The PyMOL molecular graphics system. San Carlos: Delano Scientific, 2002. Disponível: <<http://www.pymol.org>>. Acesso: 15/02/2016.

DEMEL, R. A.; GEURTS VAN KESSEL, W. S. M.; ZWAAL, R. F. A.; ROELOFSEN, B.; VAN DEENEN, L. M.. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta**. 406: 97-107, 1975.

DENNIS, E. A.. Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A<sub>2</sub>. **The Journal of Biological Chemistry**. 269: 13057-13060, 1994.

DIAS-NETIPANYIA, M. F.; BOLDRINI-LEITEB, L. M.; TRINDADEC, E. S.; MORENO-AMARALA, A. N.; ELIFIO-ESPOSITOA, S.. Bjcül, a snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile *in vitro*. **Toxicology in Vitro**. 33: 118-124, 2016.

DIAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIERREZ, J. M.. Purification and characterization of Myotoxin IV, a phospholipase A<sub>2</sub> variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Natural Toxins**. 3: 26-31, 1995

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L.. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American

pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. 156: 617-640, 2009.

FERREIRA, D. A. S.. **Avaliação do efeito neuroprotetor/neurotóxico de peptídeos de baixo peso molecular provenientes de venenos das serpentes *Bothrops atrox*, *Bothrops pirajai* e *Bothrops jararaca* em mitocôndrias do cérebro de rato**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Toxicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FREIRE, M. R. L. C.; CUNHA, M. C.; ANDRADE, S. P.. Importância dos testes imunohematológicos em receptores de sangue e a ocorrência das reações transfusionais. **Eletronic Journal of Pharmacy**. 12: 56-59, 2015.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**. 293: 1871-1875, 2001.

FURTADO, M. F. D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae) **Toxicon**. 48: 401-410, 2006.

GARTNER, T. K.; OGILVIE, M. L.. Isolation and characterization of three Ca<sub>2</sub>-dependent  $\beta$ -galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochemical Journal**. 224: 301-307, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Memórias do Instituto Butantan**. 51: 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; Phospholipase A<sub>2</sub>, myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**. 33: 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**. 82: 841-850, 2000.

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

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; KUMAR BHATTACHARYYA, K.. Snake venom hemorrhagins. **Critical Reviews Toxicology**. 29: 1-19, 1999.

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**, 45:1163-70, 2005.

HEALY, D.A.; WALLACE, F.A.; MILES, E. A.; CALDER, P. C.; NEWSHOLME P.. The effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. **Lipids**. 35:763-768, 2000.

HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W.. CDNA Sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 308: 182-191, 1994.

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**. 1361: 29-41, 1997.

HUNTER, T.; MUNRO, A.. Enzymatic conversion of human O into A erythrocytes and of B into AB erythrocytes. **Nature**. 223: 1272-1273, 1969.

HUTTON, R. A.; WARRELL, D. A.. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Reviews**. 7: 176-189, 1993.

IZIDORO, L. F. M.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELLI, R. G.; SOARES, A. M.. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **Biomed Research International**. 2014: 1-19, 2014.

IZIDORO, L. F.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 14: 7034–7043, 2006.

JORGE, R. J. B.. **Venômica e antivenômica de *Bothrops erythromelas*: estudo da variação intraespecífica**. 2015. 131 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmacologia, Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015a.

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

KASAI, K.; ISHIKAWA, T.; KOMATA, T.; FUKUCHI, K.; CHIBA, M.; NOZAKA, H.; NAKAMURA, T.; SATO, T.; MIURA, T.. Novel l-amino acid oxidase with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from epidermal mucus of the flounder *Platichthys stellatus*. **The FEBS Journal**. 277: 453–465, 2010.

KATAN, M. B.; DELYPEREM J. P.; BIRGELEN, A. P. J. M. V.; PENDERS, M.; ZEGWAARD, M.. Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. **Journal of Lipid Research**. 38, 2012-2022, 1997

KAWANO, J.. ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M.. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; non-significance of hemorrhagic metalloproteinase. **Toxicon**. 40: 1553-1562, 2002

KELLEY, D. S.. Modulation of Human Immune and Inflammatory Responses by Dietary Fatty Acids. **Nutrition**. 17: 669-673, 2001.

KERNS, R.T.; KINI, R.M.; STEFANSSON, S.; EVANS, H.. Targeting of venom phospholipases: the strongly anticoagulant phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 36, 107-113, 1999.

KINI, R. M.. Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**. 34: 200-204, 2006.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K.. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Science**. 63: 3030-3041, 2006.

LABTEST DIAGNÓSTICA S. A.. **APTT Hemostasis: instruções de uso**. Rf 502. fev. 2007.

LABTEST DIAGNÓSTICA S. A.. **PT Hemostasis: instruções de uso**. Rf 501. nov. 2006.

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

LEE, W.H.; da SILVA-GIOTTO, M.T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.; GARRAT, R.C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> – a hypothesis: the crystal structure of Piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**. 40: 28-36, 2001.

LEMOES, J. C.; ALMEIDA, T. D.; FOOK, S. M. L.; PAIVA, A. A.; SIMÕES, M. O. S.. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 12: 50-59, 2009.

LOPES, K. S.; RIOS, E. R. V.; LIMA, C. N. C.; LINHARES, M. I.; TORRES, A. F. C.; HAVT, A.; QUINET, Y. P.; FONTELES, M. M. F.; MARTINS, A. M. C.. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. **Neurochemistry International**. 63: 141-145, 2013.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, J.. Snake venom and hemostasis. **Journal of Trombosis and Haemostasis**. 3: 1791-1799, 2005.

MACHADO, T.. **Filogenia molecular das espécies *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (Serpentes, Viparidae)**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFURST, M.; AU, L. C.; GHISLA, S.. L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **European Journal of Biochemistry**. 268: 1679-1686, 2001.

MACKESSY, Stephen P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. 2010. 21p.

MARSH, N.; GLATSTON, A.. Some observations on the venom of the rhinoceros horned viper, *Bitis nasicornis*, shaw. **Toxicon**. 12: 621-628, 1974.

MARUNAK, S. L.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; RUÍZ DE TORRENT, R. M.; TEIBLER, G. P.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ- NEGRETTE, M. Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz). **Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana**. 9:149-54, 1994

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H.. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes possible role in haemorrhage. **Toxicon**. 30: 1387-1397, 1992.

MEBS, D.; KORNALIC, F. Intraspecific variation in content of a basic toxin in eastern diamondback rattlesnake (*Crotales adamanteus*) venom. **Toxicon**. 22: 831-833, 1984.

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

MENEZES, R. R. P. P. B.. **Estudo da atividade enzimática e dos efeitos do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre macrófagos RAW 264.7 *in vitro***. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

- MONTEIRO, C.; MONTGOMERY, C. E.; SPINA, F.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M..Feeding, Reproduction, and Morphology of *Bothrops matogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. **Journal of Herpetology**. 40: 408-413, 2006.
- MORE, S. S.; KIRAN, K. M.; VEENA, S. M.; GADAG, J. R.. Purification of an l-amino acid oxidase from *Bungarus caeruleus* (Indian krait) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. 16: 60–75, 2010.
- MORITA, T.. C-type lectin-related proteins from snake venoms. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**. 4: 357-373, 2004.
- MOURA, A. A.; KAYANO, A. M.; OLIVEIRA, G. A.; SETÚBAL, S. S.; RIBEIRO, J. G.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; MOURA, L. A.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; SILVA, S. L.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A.. Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from *Bothrops matogrossensis* Snake Venom with Toxicity against *Leishmania* and Tumor Cells. **BioMed Research International**. 2014: 1-13, 2014.
- NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 26: 1-6, 2004.
- NOLTE, S.; DAMASIO, D. C.; BARÉA, A. C.; GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; ZISCHLER, L F. C. M.; STUELP-CAMPELO, P. M.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; REIS, C. A.; MORENO-AMARAL, A. N.. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**. 59: 81-85, 2012.
- OGAWA, T.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M.. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**. 45: 1-14, 2005.
- OKUBO, B.M.; SILVA, O.N.; MIGLIOLO, L.; GOMES, D.G.; PORTO, W. F.; BATISTA, C. L.; RAMOS, C. S.; HOLANDA, H. H. S.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.; MORENO, S. E.. Evaluation of an Antimicrobial L-Amino Acid Oxidase and Peptide Derivatives from *Bothropoides matogrossensis* Pitviper Venom. **PLoS ONE**. 7: e33639, 2012.
- OLIVEIRA, F.; SOUSA, B. B.; MAMED, C. C. N.; MORAIS, N. C. G.; QUEIROZ, M. R.; PEREIRA, D. F. C.; MATIAS, M. S.; BRANDEBURGO, M. I. H.. Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. 111: 130-138, 2016.
- OLIVEIRA, J. C. R.; MONTES DE OCA, H.; DUARTE, M. M.; DINIZ, C. R.; FONTES-DIAS, C. L.. Toxicity of South American snake venoms measured by na *in vitro* cell cuture assay. **Toxicon**. 40: 321-325, 2002.
- PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A.. Snake venom therapeutic agents: from toxic to drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**. 40: 1353-1358, 2002
- PAULA, R.C. M. F. **Perfil Epidemiológico dos casos de Acidentes Ofídicos atendidos no Hospital de Doenças Tropicais de Araguaína – TO (Triênio 2007- 2009)**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

- PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M. O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V.. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**. 23:1075-1086, 2010.
- PIMENTA, D. C.; PREZOTO, B. C.; KONNO, K.; MELO, R. L.; FURTADO, M. F.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T.. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. **Rapid communications in mass spectrometry**; 21: 1034–1042, 2007.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D.. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 47: 24-29, 2001.
- PIRES, W. L.; CASTRO, O. B.; KAYANO, A. M.; SETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; PALOSCHI, M. V. Effect of BjuL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in Vitro**. 8;41:30-41, 2017.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES- SIMONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J. Muscle necrosis regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**. 22: 337-340, 1984.
- RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C.. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**. 35: 305-309, 1997.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE S.; DIJKSTRAT B. W.; DRENTHE J.; SIGLER, P. B.. A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **The Journal of Biological Chemistry**. 260: 11627-11634, 1985.
- RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANCA, J.; SONSECA, J. J.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M.R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**. 91: 490–501, 2009.
- RODRIGUES, R.S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.P.; DE LA TORRE, P; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; RODRIGUES, V.M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**. 75: 2707–2720, 2012.
- ROMERO-VARGAS, F. F.; PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGOGI, S.. Biological and biochemical characterization of two new PLA<sub>2</sub> isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 151: 66-74, 2010.
- ROSING, J.; GOVERS-RIEMSLAG, J. W. P.; YUKELSON, L.; TANS, G.. Factor V Activation and Inactivation by Venom Proteases. **Haemostasis**. 31: 241-246, 2001.
- SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**. 57: 627-645, 2011.
- SAMEL, M.; TÕNISMÄGI, K.; RÖNNHOLM, G.; VIJA, H.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E.. L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. 149: 572–580, 2008.

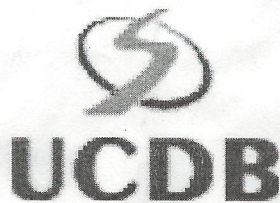
- SAMEL, M.; VIJA, H.; ONNHOLM, G. R.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E.. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting l-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1764: 707–714, 2006
- SARTIM, M. A.; COSTA, T. R.; LAURE, H. J.; ESPÍNDOLA, M. S.;FRANTZ, F. G.; SORGI, C. A.; CINTRA, A. C. O.; ARANTES, E. C.; FACCIOLI, L. H.; ROSA, J. C.; SAMPAIO, S. V.. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIId metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Archives of Toxicology**. 90: 1261- 1278, 2015.
- SARTIM, M. A.; PINHEIRO, M. P.; PÁDUA, R. A. P.; SAMPAIO, S. V.; NONATO, S. V. S.. Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**. 126: 59-69, 2017.
- SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SINGLER, P.B. Interfacial catalysis the mechanism of phospholipase A2. **Science**. 250:1541-1546, 1990.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C.. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. 45: 1115-1132, 2005.
- SERRANO, S. M. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**. 62: 16-26, 2013.
- SILVA, D.; LIBERATO, T.; FUKUSHIMA, I.; SERRANO, S. M. T.; ZELANIS, A.. Dynamic Rearrangement in Snake Venom Gland Proteome: Insights into *Bothrops jararaca* Intraspecific Venom Variation. **Journal of Proteome Research**. 15: 3752-3762, 2016.
- SILVA, R. M. L.. **Estudo farmacológico do veneno de *Bothrops leucurus* (Serpentes: Viperidae)**. 2001. 182 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Médicas, Unicamp, Campinas, 2001.
- SILVA, S. L.; ROWAN, E. G.; ALBERICIO, F.; STÁBELI, R. G.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.. Animal Toxins and Their Advantages in Biotechnology and Pharmacology. **Biomed Research International**. 2014: 1-2, 2014.
- SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T.. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**. 1: 45-90, 2008.
- SIX, D.; DENNIS, E.. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**. 1488: 1-19, 2000.
- STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M.. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 12: 2881–2886, 2004.
- SUÁREZ-MAHECHA, H.. Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca**. 1: 101-110, 2002.
- TERANO, T.; HIRAI, A.; HAMAZAKI, T.; KOBAYASHI, S.; FUJITA, T.; TAMURA, Y.; KUMAGAI, A.. Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. **Atherosclerosis**. 49: 321-331, 1983.

- TÕNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RÖNNHOLMB, G.; SIIGURA, J.; KALKKINENB, N.; SIIGURA, E.. L-Amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**. 48: 227-237, 2006.
- UETZ, P.; FREED, P.; JIRÍ HOŠEK (eds.). **The Reptile Database**. Disponível: <<http://www.reptile-database.org>>. Acesso: 19/02/2017.
- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G.. What can venom phospholipases A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>?. **Biochimie**. 82: 815-831, 2000.
- VARGAS, L. J.; QUINTANA, J. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; SANZ, L.; CALVETE, J.. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon**, 64: 1–11, 2013.
- WACKLIN, H. P.; TIBERG, F.; FRAGNETO, G.; THOMAS, R. K.. Distribution of reaction products in phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysis. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) – Biomembranes**. 1768: 1036-1049, 2007.
- WANDERLEY, C. W. S.. **Veneno da Serpente *Bothrops jararacussu* induz uma resposta inflamatória local dependente de protanóides e da migração de neutrófilos**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- WATKINS, W. M.. Blood-Group Substances. **Science**. 152: 172-181, 1966.
- WATKINS, W. M.. The ABO blood group system: historical background. **Transfusion Medicine**. 11: 243-265, 2001.
- WÜSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C. E.; WALKER, D. E.. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 49: 445-459, 2008
- YAMASHITA, K. M.. **Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- ZAMBELLI, V. O.; CHIOATO, L.; GUTIERREZ, V. P.; WARD, R. J.; CURY, Y.. Structural determinants of the hyperalgesic activity of myotoxic. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. 23:2-9, 2017
- ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; MOREIRA-DILL, L. S.; FERNANDES, C. F. C.; FULY, A. L.; MALTAROLLO, V. G.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, S. L.; ACOSTA, G.; CABALLOL, A. O.; OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; CALDERON, A. A.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G.. Isolation and Biochemical Characterization of a New Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops pirajai* Snake Venom. **Biomed Research International**. 2014: 2014.
- ZHONG, S. R.; JIN, Y.; WU, J. B.; JIA, Y. H.; XU, G. L.; WANG, G. C.; XIONG, Y. L.; LU, Q. M.. Purification and characterization of a new l-amino acid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon**. 54: 763–771, 2009.

## **ANEXOS**



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Valorizando talentos



Missão Salesiana de Mato Grosso  
Universidade Católica Dom Bosco  
Instituição Salesiana de Educação Superior  
Biotério MSMT – UCDB / BioToxX



Campo Grande-MS, 20 de Maio de 2014.

### TERMO DE PROCEDÊNCIA

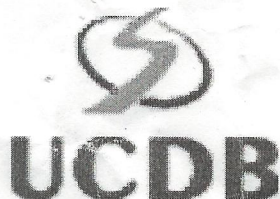
Seguem 03 frascos contendo 04 gramas cada um de veneno cristalizado de serpentes do gênero *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus* código/nº: B. m/s8-0021, oriundas do plantel do Biotério/UCDB com o número de registro 718.682, junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos 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



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Valorizando talentos



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



Campo Grande-MS, 07 de Março de 2014.

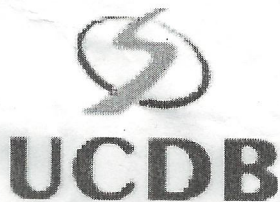
### TERMO DE PROCEDÊNCIA

Seguem 02 eppendorf, contendo 0,7145 gramas e 0,8171 gramas de veneno liofilizado de serpentes do gênero *Bothrops matogrossensis* 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



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Valorizando talentos



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



Campo Grande-MS, 09 de Dezembro de 2014.

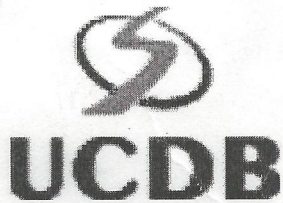
### TERMO DE PROCEDÊNCIA

Seguem 02 frascos contendo 1,65 gramas e 0,93 gramas cada um de veneno cristalizado de serpentes do gênero *Bothrops mattogrossensis* 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



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Valorizando talentos



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



Campo Grande-MS, 25 de Agosto de 2015.

### TERMO DE PROCEDÊNCIA

Seguem 02 frascos contendo 0,110 e 0,381 gramas de veneno cristalizado de serpentes do gênero *Bothrops matogrossensis* código/nº: *B. ms8-0021*, 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

**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 nº 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 nº 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 partícipes 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 abrigadas 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 proteínas 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.

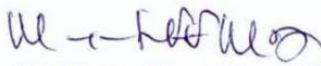
Estando assim justas e contratadas, firmam o presente instrumento em 03 (três) vias de igual teor e forma, na presença das testemunhas abaixo nomeadas e subscritas.

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 UFPB**

**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> .



**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.



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**

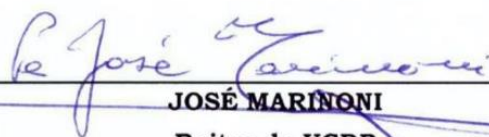
**IV - DECLARAÇÃO DO CONVENIENTE E APROVAÇÃO DO CONCEDENTE**

**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 inexistente 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,

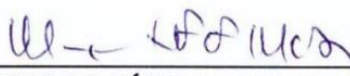
Campo Grande - MS, 21 de outubro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
**JOSÉ MARÍONI**  
Reitor da UCDB

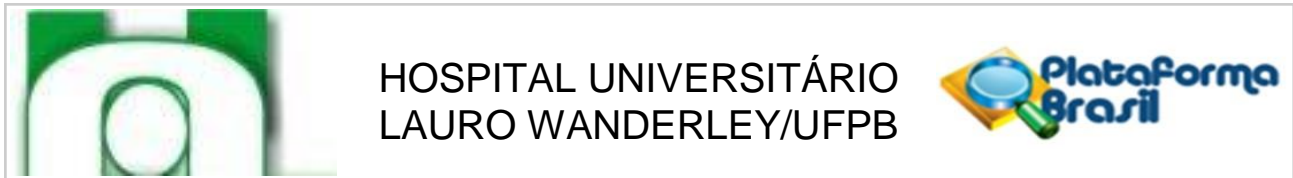
**Aprovação**

Aprovo,

João Pessoa - PB, 21 de outubro de 2014.

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

## ANEXO 3: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** SARAH DE SOUSA FERREIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 60002616.7.0000.5183

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.806.897

#### Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado agora, em sua segunda versão, comporá uma dissertação de mestrado e mostra que o veneno de serpentes peçonhentas é rico em princípios ativos e que a busca por novos compostos que possuam eficácia terapêutica e que atuem em diversos tipos de atividade biológica, associado a resultados promissores de alguns estudos, justificam o grande interesse pela toxina do veneno de serpentes, especialmente na área farmacológica. O presente estudo será experimental, laboratorial "in vitro" e utiliza a análise qualitativa dos dados. O fracionamento dos componentes protéicos do veneno bruto extraído de *B. mattogrossensis* por HPLC e em seguida será avaliado a atividade as frações do veneno frente as células sanguíneas da linhagem vermelha.

#### Objetivo da Pesquisa:

Como objetivo primário:

- O projeto propõe avaliar efeitos bioquímicos, tóxicos e farmacológicos de um pool veneno bruto extraído de serpentes brasileiras de *Bothrops mattogrossensis*, bem como correlacionar com os efeitos biológicos desencadeados por este veneno na tentativa de melhor compreender os possíveis mecanismos de ação destes compostos químicos.

Como objetivo secundário:

- Avaliar a composição molecular do veneno de *Bothrops mattogrossensis* por fracionamento e

**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



caracterização da massa molecular;

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

- Coleta de sangue venoso.
- Os participantes podem apresentar dor, vermelhidão e desconforto no momento da coleta.
- Porém é destacado pelos pesquisadores que raramente ocorrerão desmaios ou inflamação no local da coleta.

Como benefícios os pesquisadores destacam:

- A compreensão do mecanismo de ação do veneno de serpentes brasileiras da espécie *Bothrops mattogrossensis*,
- Proposta de ferramentas terapêuticas para a indústria farmacológica.

Além disso, os pesquisadores apresentam com critério de inclusão participantes da pesquisa, pessoas com idade acima de 18 anos, aparentemente saudáveis, que não tenham feito uso de medicamento nos últimos dez dias, tenham feito jejum de no mínimo 4 horas antes da coleta e que concordem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os pesquisadores apresentaram fundamentação adequada da pesquisa, embasando todas as etapas e apresentando a importância do desenvolvimento do projeto e uma alternativa futura de uma ferramenta farmacológica. O presente estudo é experimental, laboratorial "in vitro" e utilizará a análise qualitativa dos dados. Os eritrócitos humanos serão cedidos para a pesquisa pela Agência Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley da cidade de João Pessoa, estado

**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



da Paraíba, A coleta de sangue venoso ocorrerá no Laboratório de 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. O sangue venoso será coletado no mês de janeiro de 2017 e o dia de coleta será de acordo com a disponibilidade dos voluntários. O sangue deverá ser coletado por profissionais adequados seguindo sempre as normas técnicas e regras de biossegurança estabelecidos pelo Ministério da Saúde, Brasil. O armazenamento e a utilização do material biológico serão realizados de acordo com a resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Para a análise de dados será utilizado o software GraphPad Prism 6 para Windows.

Todas as amostras serão realizadas em triplicata. Serão consideradas para a análise estatística a média +/- erro padrão da média, mediana e os dados serão analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni para múltiplas médias ou teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para a medianas e as diferenças significativas de valores considerando  $p < 0,05$ , representarão intervalo de confiança de 95%. Os participantes da pesquisa serão voluntários, escolhidos aleatoriamente, que concordem em assinar o TCLE, podendo desistir a qualquer momento de participar da pesquisa.

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

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

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

#### **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



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

Os pesquisadores atenderam a todas as solicitações que ficaram pendentes na versão anterior do projeto como atualizaram os protocolos de pesquisa conforme a resolução 466/2012; Além disso, o TCLE se adequou a resolução 411/2011 do CNS, que versa sobre a coleta e armazenamento e utilização de material biológico em protocolos de pesquisa.

Dessa forma atendido todos os critérios deste comitê, o projeto foi aprovado para início das pesquisas.

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em Reunião Ordinária realizada no dia 25 de outubro 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



**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_777165.pdf	10/10/2016 12:06:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLENOVO.pdf	10/10/2016 12:04:42	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoPesquisadorNOVO.pdf	10/10/2016 12:03:34	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Outros	CartarespostaNOVO.pdf	10/10/2016 12:02:41	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_finalNOVO.pdf	10/10/2016 12:00:45	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Cronograma	CronogramaNovo.pdf	10/10/2016 12:00:16	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final.pdf	10/10/2016 11:53:56	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoPesquisador.pdf	10/10/2016 11:53:30	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	10/10/2016 11:51:03	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Outros	TermoDeCompromisso.pdf	16/09/2016 11:43:54	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Outros	FICHADECADASTRO.pdf	16/09/2016 00:25:46	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	16/09/2016 00:20:05	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final_OK.pdf	16/09/2016 00:17:36	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo.pdf	16/09/2016 00:16:51	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	scan.pdf	15/09/2016 23:02:04	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito

**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



Continuação do Parecer: 1.806.897

Outros	certidao.pdf	19/08/2016 11:07:40	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta.pdf	19/08/2016 11:05:53	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito
Cronograma	Cronograma_.docx	19/08/2016 11:01:14	SARAH DE SOUSA FERREIRA	Aceito

Página 05 de

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JOAO PESSOA, 06 de Novembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE**  
**(Coordenador)**

Página 06  
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