



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

KAREN LEONOR ANGEL CAMILO

**EFEITOS DO VENENO DE *Lachesis acrochorda* EM PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES EM RATOS E EM CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS**

FORTALEZA

2020

KAREN LEONOR ANGEL CAMILO

**EFEITOS DO VENENO DE *Lachesis acrochorda* EM PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES EM RATOS E EM CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A589e Angel Camilo, Karen Leonor.
EFEITOS DO VENENO DE Lachesis acrochorda EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS E EM CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS : EFEITOS DO VENENO DE Lachesis acrochorda EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS E EM CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS / Karen Leonor Angel Camilo. – 2020.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.

1. Veneno. 2. Lachesis. 3. Agregação plaquetária. 4. vasodilatação. 5. hipotensão. I. Título.

CDD 615

KAREN LEONOR ANGEL CAMILO

**EFEITOS DO VENENO DE *Lachesis acrochorda* EM PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES EM RATOS E EM CÉLULAS SANGUÍNEAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 07 / 02 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Jorge Calda Magalhães (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha amada mãe, Ivarluz Camilo Girón,
pelo seu exemplo de coragem e pela confiança
incondicional em mim.

À minha tia, Olga Lucia Camilo, minha
segunda mãe, pelo apoio e por sempre acreditar
em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar vida e saúde, fortaleza, paciência e energia cada um dos meus dias aqui no Brasil

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pela excelente orientação, pela confiança depositada em mim, pelo ensino, pela paciência, escuta e incentivo durante essa caminhada.

Aos professores Kalyne Luzia Almeida Moreira Leal, Alexandre Havt Bindá e Armênio Aguiar, pela importante contribuição na minha formação, pelas oportunidades, pela confiança, incentivo, orientações e receptividade nos seus laboratórios; Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC), Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM).

À Professora Ana Giselle da Costa Neves Ferreira, pela colaboração para fazer a proteômica do veneno em seu laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Fiocruz, no Rio de Janeiro.

Aos professores Emanuela Feitosa de Carvalho e Rodrigo Siqueira, pelo acompanhamento, ensino, paciência e ajuda nos experimentos *in vivo*.

Aos colegas Lyara Freitas, João António Sousa e Glautemberge, pela ajuda, ensino e tempo dedicado nos experimentos realizados com sangue humano.

Aos meus colegas de laboratório de Farmacologia do Músculo liso, Kalinne Gadelha, Daniel Maya, Karine Lima, Alfredo Vasconcelos, Camila Pinheiro e Carlos Alberto pela amizade, risadas, agradável convivência, ajuda, ensinamento e motivação nesta etapa da minha vida.

Aos meus Colegas do LTM, Mikael Almeida, Dayara Oliveira, Thiago Freitas, e o Marcos pela amizade e pela motivação.

Aos meus Colegas do CEFAC Talita Magalhães, Tálison Almeida, Kevylane Alves, Monalisa Sthefani, pela ajuda, carinho, e acolhida no laboratório.

Prof. Dr. Gerly Anne de Castro Brito, do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) pela sua ajuda no processamento do material para histologia.

Ao Professor Mário Rogério Lima Mota do Laboratório de Patologia Bucal pela leitura das amostras para histologia.

A minhas tias: Ana Milet, Gilma e Lexy Camilo Girón, pela torcida e incondicional apoio.

A minha irmã e a minha sobrinha, Lilibeth Camilo e Sara Michelle Bolanos C, por ser a motivação em cada um dos meus passos.

Ao meu namorado, Jimmy A. Guerrero Vargas, pelo amor, confiança, ajuda, e motivação incondicional.

A minha grande amiga Mary Luz Buenos, pela escuta, apoio conselhos e presença em todo os momentos.

Ao meu grande amigo Fermín Chamorro, colega de luta e de experiência, pelos ânimos, amizade, carinho, confiança e apoio sempre.

A minhas amigas Katherine Bedoya, Laura Gutierrez, Paola Samboní e Karen Castillos pela amizade, motivações e pela escuta.

Ao técnico, Haroldo Pinheiro, pelo auxílio e disponibilidade.

Aos Secretários Maxwell e Juliana pela atenção, ajuda e paciência.

À Senhora Conceição Alves e o Senhor Nonato Morais por me acolher como uma filha na sua casa, pelo carinho e pela confiança.

Enfim a todos os profissionais, familiares e amigos que contribuíram de maneira direta ou indireta para concretização desta etapa da minha vida, o meu MUITO OBRIGADA!

Para conquistar algo que você nunca teve,
é preciso fazer algo que você nunca fez.

(Chico Xavier)

RESUMO

Na Colômbia, a serpente *Lachesis acrochorda* está envolvida com 2-3% dos acidentes ofídicos, caracterizados por alta taxa de mortalidade (90%) decorrente de diversas complicações sanguíneas e cardiovasculares. Neste trabalho, alguns efeitos sanguíneos do veneno da serpente *L. acrochorda* (SVLa) foram avaliados em células sanguíneas humanas obtidas de voluntários. Efeitos em parâmetros cardiovasculares foram avaliados em ratos. O SVLa induziu coagulação e agregação plaquetária cuja magnitude foi comparável à do controle positivo adenosina difosfato (ADP), sendo observada mais rapidamente quanto maior a concentração de SVLa. Os efeitos agregantes do SVLa foram significativamente inibidos ($p < 0,05$) por ácido acetilsalicílico (AAS, inibidor da ciclooxigenase), clopidogrel (CLO, inibidor do receptor de ADP), mas principalmente por Na₂-EDTA (quelante de Ca²⁺ inibidor de metaloproteinases) e por cloridrato de fluoreto 4-(2aminoetil) benzenossulfonilo (AEBSF, inibidor de serina proteases). De acordo com os métodos de redução do sal tetrazol MTT e dos níveis de lactato desidrogenase (LDH), a viabilidade celular de neutrófilos e plaquetas não foi alterada pelo SVLa (4 µg/mL), concentração que não aumentou a atividade de mieloperoxidase estimulada em neutrófilos com acetato de forbol miristato (PMA). Em átrio direito isolado de ratos, SVLa aumentou de maneira discreta, mas significativa ($p < 0,05$) a magnitude das contrações espontâneas na faixa de concentração de 1 a 30 µg/mL. Em aorta isolada de rato, SVLa relaxou de maneira significativa em concentrações superiores a 300 µg/mL preparações contraídas com KCl ou fenilefrina. *In vivo*, SVLa (0,5 e 1,5 mg/kg, i.v.) induziu hipotensão e bradicardia, com detecção de hemorragia com danos pulmonares e renais. Em conjunto, nossos achados permitem concluir que, em condições experimentais, o SVLa manifestou coagulação, hipotensão e bradicardia. Parte dos efeitos aqui apresentados parece resultar da presença de SVMPs e SVSPs na composição do SVLa.

Palavras-chave: Veneno. *Lachesis*. Agregação plaquetária. Vasodilatação. Hipotensão.

ABSTRACT

In Colombia, the *Lachesis acrochorda* snake is involved in 2-3% of snakebites, characterized by a high mortality rate (90%) due to several blood and cardiovascular complications. In this work, some blood effects of the snake venom *L. acrochorda* (SVLa) were evaluated in human blood cells obtained from volunteers. Effects on cardiovascular parameters were evaluated in rats. SVLa induced coagulation and platelet aggregation whose magnitude was comparable to that of the positive control adenosine diphosphate (ADP), being observed more quickly the higher the concentration of SVLa. The aggregating effects of SVLa were significantly inhibited ($p < 0.05$) by acetylsalicylic acid (AAS, cyclooxygenase inhibitor), clopidogrel (CLO, ADP receptor inhibitor), but mainly by $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Ca²⁺ chelator + metalloproteinase inhibitor) and 4- (2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF, serine proteases inhibitor). According to the methods of reducing tetrazole MTT salt and lactate dehydrogenase (LDH) levels, the cell viability of neutrophils and platelets was not altered by SVLa (4 $\mu\text{g/mL}$), a concentration that did not increase myeloperoxidase activity stimulated in neutrophils with phorbol myristate acetate (PMA). In the isolated right atrium of rats, SVLa increased slightly but significantly ($p < 0.05$) the magnitude of spontaneous contractions in the concentration range from 1 to 30 $\mu\text{g/mL}$. In isolated rat aorta, SVLa significantly relaxed at concentrations greater than 300 $\mu\text{g/mL}$ preparations contracted with KCl or phenylephrine. In vivo, SVLa (0.5 and 1.5 mg/kg, i.v.) induced hypotension and bradycardia, with detection of hemorrhage with lung and kidney damage. Together, our findings allow us to conclude that, under experimental conditions, SVLa manifested coagulation, hypotension and bradycardia. Part of the effects presented here seems to result from the presence of SVMPs and SVSPs in the composition of SVLa.

Key words: Snake venom; *Lachesis*; platelet aggregation; Vasodilation; Hypotension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência do acidente ofídico no mundo.	17
Figura 2 - Distribuição do gênero <i>Lachesis</i> .	19
Figura 3 - Imagem da serpente <i>L. acrochorda</i> .	20
Figura 4 - Imagem da composição proteômica de venenos de serpentes do gênero <i>Lachesis</i> .	21
Figura 5 - Cascata de coagulação	23
Figura 6 - Mecanismos de ativação plaquetária e modo de ação das terapias antiplaquetárias existentes.	25
Figura 7 - Mecanismos de contração do músculo liso vascular.	28
Figura 8 - Mecanismos de relaxamento do músculo liso vascular.	29
Figura 9 - Sistema usado para experimentos de contratilidade in vitro de aorta e átrio de rato.	39
Figura 10 - SDS-PAGE do SVLa total em um gel de 15%.	42
Figura 11 - Efeito do SVLa na coagulação.	43
Figura 12 - Efeito do SVLa (0,5; 1; 2 e 4 µg/mL) na agregação plaquetária em plasma humano.	44
Figura 13 - Inibição pelo ácido acetilsalicílico (AAS) da agregação plaquetária induzida pelo ADP ou SVLa.	45
Figura 14 - Inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP ou SVLa na presença de clopidogrel (CLO).	46
Figura 15 - Efeito dos inibidores de SVSP e SVMP, o AEBSF (8 mM) e NA2-EDTA (13 mM) respectivamente na agregação causada por SVLa.	47
Figura 16 - Efeito do SVLa a sobre a viabilidade de plaqueta humanas	48
	49
Figura 17 - Atividade do SVLa sobre a viabilidade celular em neutrófilos.	
Figura 18 - Avaliação da toxicidade do SVLa em neutrófilos humanos através de mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH).	50
Figura 19 - Efeito do SVLa na liberação de MPO em neutrófilos humanos.	51

Figura 20 - Efeito vasodilatador do SVLa (1-1000 µg/mL) em aorta isolada de rato, pré-contraída com K ⁺ ou Phe.	52
Figura 21 - Efeito do SVLa (1-1000 µg/mL) em músculo atrial direito de rato isolado.	53
Figura 22 - Efeito de SVLa na pressão sanguínea e na frequência cardíaca de ratos.	55
Figura 23 - Avaliação histológica dos efeitos causados por SVLa em pulmão e rim	56
Figura 24 - Avaliação histológica dos efeitos causados por SVLa em Fígado, coração e intestino.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ADP	Adenosina di-fosfato
AEBSF	Cloridrato de fluoreto de 4- (2-aminoetil) benzenossulfonilo,
AMPc	Monofosfato cíclico de adonosina
AVC	Acidente vascular cerebral
BPPs	Peptídeos potenciadores de bradicinina
Ca ²⁺	Íon de cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEUA	Comitê de bioética animal
CIBUC	Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca
CLO	Clopidogrel
COX-1	Ciclooxigenase-1 plaquetária
CTLP	Proteínas tipo lectina do tipo C
DFP	Fluorofosfato de diisopropilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECG	Electrocardiograma
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
HBSS	Solução de sal equilibrada de Hank
HEMOCE	Centro de Hematologia e hemoterapia do Ceará
KCl	Cloreto de potássio
LAO	L-aminoácido oxidase

LDH	Lactato-deidrogenase
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazólio
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PARs	Receptores ativados por protease
PLA ₂	Fosfolipases A ₂
PMN	Polimorfonucleares
PRP	Plasma rico em plaquetas
SVLa	Veneno de serpente <i>Lachesis acrochorda</i>
SVMP	Metaloproteinases de veneno de serpente
SVSP	Serina proteinase de veneno de serpente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TX	Triton x-100
TxA ₂	Tromboxano A ₂ .
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Serpentes.....	18
1.2. Família Viperidae.....	18
1.3. Gênero <i>Lachesis</i>	18
1.4. Espécie <i>Lachesis acrochorda</i>	19
1.5. Veneno de serpentes.....	20
1.6. Efeitos de venenos de serpente na hemostase.....	21
1.7. Coagulação do sangue <i>in vitro</i>	23
1.8. Agregação plaquetária.....	24
<i>Agonistas e antagonistas de agregação</i>	24
1.9. Fármacos antiplaquetários.....	25
1.10. Neutrófilos.....	26
1.11. Efeitos cardiovasculares do veneno.....	27
1.11.1. <i>Músculo liso vascular</i>	27
1.11.2. <i>Artérias</i>	27
1.11.3. <i>Mecanismo contrátil no músculo liso</i>	27
1.11.4. <i>Mecanismo do Relaxamento do músculo liso</i>	28
1.11.5. <i>Pressão arterial</i>	29
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
Objetivo geral.....	32
Objetivos específicos.....	32
4. MÉTODOS.....	33
4.1. Obtenção do veneno.....	33
4.2. Análise do perfil bioquímico do SVLa.....	33
4.2.1. <i>Dosagem de proteína no SVLa</i>	33
4.2.2. <i>Eletroforese do SVLa</i>	34
4.2.3. <i>Análise bioquímica do SVLa</i>	34
4.3. Teste de coagulação.....	34
4.4. Avaliação da agregação plaquetária.....	35
4.4.1. <i>Obtenção do sangue humano</i>	35
4.4.2. <i>Coleta do sangue</i>	35
4.4.3. <i>Inibição da ciclooxigenase plaquetária</i>	35
4.4.4. <i>Inibição do ADP na agregação</i>	35
4.4.5. <i>Papel da SVSP e SVMP na agregação plaquetária ex vivo</i>	36
4.5. Estudo citotóxicos.....	36
4.5.1. <i>Avaliação em plaquetas</i>	36

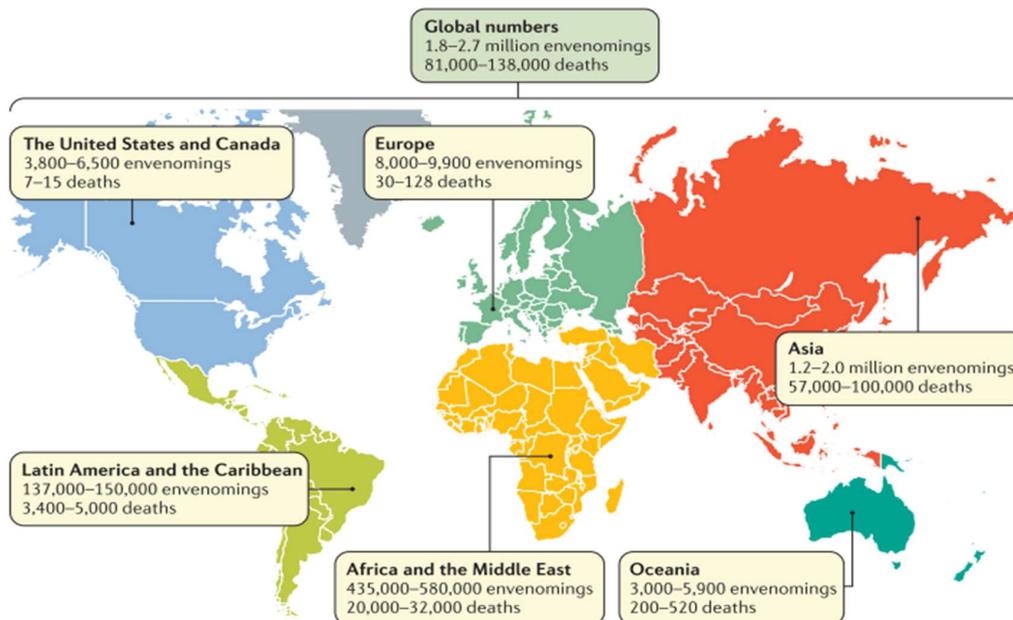
4.5.2. Avaliação dos neutrófilos	36
4.5.4. Determinação de Lactato Desidrogenase (LDH).....	37
4.5.5. Avaliação da atividade inflamatória	37
4.6. Obtenção dos animais.....	38
4.7. Experimentos com órgãos isolados	38
4.8. Experimentos <i>in vivo</i>	39
4.8.1. Avaliação da pressão arterial.....	39
4.8.2. Análise Histológica.....	40
4.9. Análise estatística	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Dosagem de Proteína.....	41
5.2. Eletroforese do SVLa	41
5.3. Efeito do SVLa na coagulação	42
5.4. Determinação do efeito do SVLa na agregação plaquetária em plasma humano	43
5.4.1. Inibição da ciclooxigenase na agregação	44
5.4.2. Inibição do ADP na agregação plaquetária.....	45
5.4.3 Efeito da Serina protease (SVSP) e Metaloproteinase (SVMP) na agregação plaquetária.	47
5.5. Citotoxicidade.....	48
5.5.1. Efeito do SVLa sobre a atividade metabólica mitocondrial em plaquetas.....	48
5.5.2. Efeito do SVLa sobre a atividade metabólica mitocondrial em neutrófilos.....	49
5.5.3. Efeito do SVLa sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)	49
5.5.4. Efeito do SVLa sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos humanos.....	50
5.6. Efeitos do SVLa em tecidos isolados	51
5.6.1. Efeitos vasorrelaxantes do SVLa em contrações induzidas por fenilefrina ou KCl em aorta isolada de rato.....	51
5.6.2. Efeito do SVLa na frequência em preparações de átrio direito isolado de rato.	52
5.8. Efeito do SVLa de ratos <i>in vivo</i>	54
5.8.1. Efeitos do SVLa na pressão arterial.....	54
5.8.2. Análise histológica	55
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	63
8. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Serpentes existem desde o final do período Jurássico e início do período Cretáceo. Embora o homem não faça parte de sua cadeia trófica, mordidas de serpentes em humanos são frequentes e caracterizam o que se denomina acidente ofídico. Assim como no Brasil, na Colômbia, países sul-americanos e países localizados nas regiões tropicais, o ofidismo é problema de saúde pública que acontece especialmente nas áreas rurais, onde a pouca disponibilidade de antivenenos é principal fator da alta mortalidade (GUTIÉRREZ et al., 2010).

O envenenamento por picada de serpente é uma doença tropical negligenciada em que aproximadamente 5,4 milhões dos quais entre 1,8–2,7 milhões de pessoas apresentam envenenamento. Destes acidentes, estima-se que ocorrem de 81.000 a 138.000 mortes (Figura 1) (GUTIÉRREZ et al., 2017b). Os países mais afetados são os da África subsaariana, sul da Ásia e da América Latina, nos quais o principal fator que contribui para a morbidade e mortalidade associadas às picadas de serpente é a menor disponibilidade de antiveneno nessas regiões (GUTIÉRREZ et al., 2010). Para a América Latina, estima-se que há 137.000-150.000 acidentes ofídicos anuais, dos quais 3.400-5.000 são fatais (GUTIÉRREZ et al., 2017a; WALTEROS; PAREDES, 2014) devido à alta toxicidade dos venenos. Até 46ª semana do ano de 2018 foram reportados 4 582 casos de ofidismo na Colômbia, indicando um aumento de 4,1% com relação aos registros do ano anterior (INS, 2019).

Figura 1: incidência do acidente ofídico no mundo.



(Fonte: Adaptado de GUTIÉRREZ et al., 2017.)

1.1. Serpentes

As serpentes pertencem ao reino Animalia, classe Sauropsida, subordinada Serpentes. Na atualidade, é reportada a existência de mais de 3.000 espécies distribuídas por todo o mundo, representada por 465 gêneros e 20 famílias, das quais 500 espécies são consideradas como venenosas (CASTRILLÓN-ESTRADA et al., 2007), sua distribuição geográfica está limitada a altitudes inferiores de 2500 m.s.n.m. (PAREDES, 2012). Na Colômbia, há mais de 270 espécies de serpentes; 49 são venenosas para humanos, 30 pertencem à família Elapidae e 19 à família Viperidae, incluindo os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* como os principais gêneros que afetam os humanos (LYNCH, 2012).

1.2. Família Viperidae

A família *Viperidae* compreende um grupo de serpentes que se caracterizam por serem venenosas e perigosas, podendo causar lesões permanentes ou morte. Apresentam dentição solenóglifa, geralmente têm cabeça triangular, pupilas verticais e apresentam fossas termorreceptoras (AYERBE; LATORRE, 2010). Estas serpentes apresentam comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas. Nesta família se incluem as serpentes causais da maior quantidade de acidentes ofídicos da América (GUTIÉRREZ et al., 2017), Em Colômbia a família viperidae está representada por gêneros como *Bothrops*, *crotalus* e o gênero *Lachesis* que é o objeto deste estudo.

1.3. Gênero *Lachesis*

As serpentes do gênero *Lachesis* habitam zonas arborizadas e remotas na América Central e América do Sul, também na ilha de Trindade. Engloba as maiores víboras do mundo, apresentando adultos que alcançam 2-2,5 m de comprimento (o maior espécime conhecido media 3,65 m) (AYERBE; LATORRE, 2010; PLA et al., 2013). O envenenamento humano por *Lachesis* é pouco frequente com um número de 2% na América Latina, mas é considerado como grave, porque apesar de ter toxicidade e atividade letal, se comparada à de outros viperídeos, a peçonha do gênero *Lachesis* é inoculada em grandes quantidades no momento de picada (200-400 mg) podendo levar à morte. Para o gênero *Lachesis* são reportados sintomas como evidentes lesões tissulares (edema, hemorragia e necrose), náuseas, coagulopatias, hipotensão, bradicardia, diarreia, vômitos, transtornos de choque e alterações renais. Atualmente o gênero *Lachesis* é representado por 4 espécies (Figura 3): *L. stenophrys*, distribuída da costa do Caribe da América Central; *L. melanocephala*, tem uma distribuição pequena, restrita ao Parque Nacional Corcovado, ao longo da costa do Pacífico, no sudoeste da Costa Rica, e possivelmente na parte ocidental do Panamá; *L. muta*, distribuída na América do Sul ao leste dos Andes; e a espécie objeto do presente estudo, *L. acrochorda* (chochoan

bushmaster, em tradução livre “mestre dos arbustos”), está distribuída no Atlântico e Pacífico colombiano, nas beiras do oeste do Panamá e na Colômbia, ao noroeste, na costa atlântica, onde se estende para o sul, nos vales dos rios Cauca e Magdalena, e ao longo do lado do Pacífico da Colômbia e no noroeste do Equador (MADRIGAL et al., 2012; NÚÑEZ RANGEL et al., 2012).

Figura 2: distribuição do gênero *Lachesis*.



Fonte: Adaptado de MADRIGAL et al., 2012.

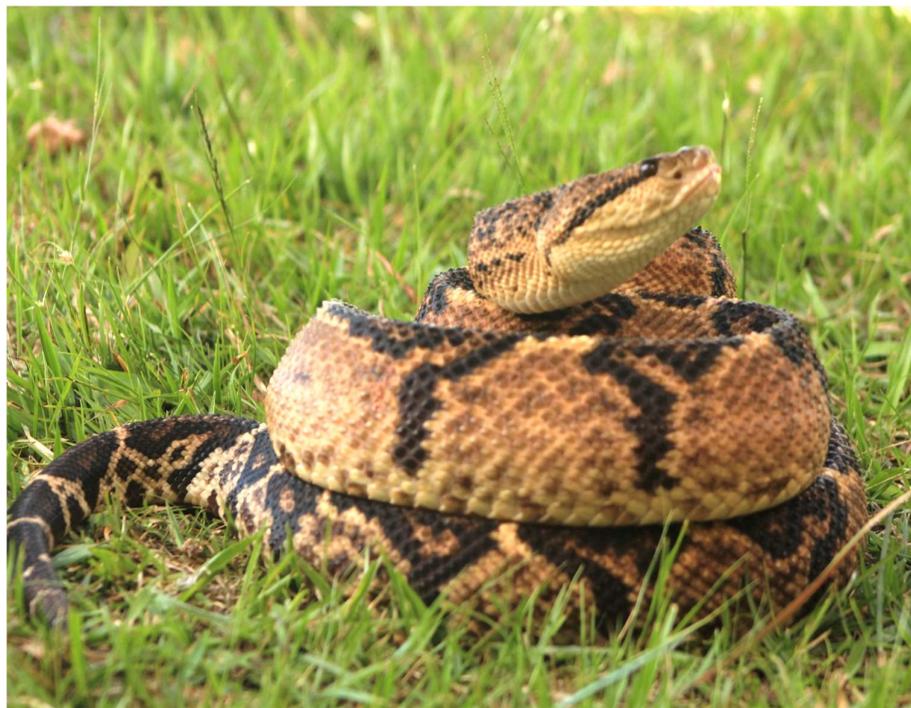
L. stenophrys (*Ls*), *L. melanocephala* (*Lme*), *L. muta rhombeata* (*Lmr*), *L. muta muta* (*Lmm*) e *L. acrochorda* (*La*)

1.4. Espécie *Lachesis acrochorda*

A serpente *L. acrochorda* é popularmente conhecida como "verrugosa", "pudridora" ou "surucucu" (Figura 3). É uma das espécies responsáveis por ofidismo na Colômbia, causando entre 2-3% das picadas e provocando aproximadamente 90% de mortalidade. Embora não haja relatos que o veneno laquétrico seja neurotóxico, existem casos clínicos com registro de alterações vasculares e cardíacas, com relatos de coagulação, hipotensão imediata e bradicardia (AYERBE; LATORRE, 2010; OTERO et al., 1992). Para testar esses relatos em condições controladas em laboratório, este trabalho foi planejado para

conhecer os efeitos cardiovasculares causados pelo veneno de *L. acrochorda* quando administrado *in vivo*, também seus efeitos em tecidos isolados como átrio, músculo liso vascular, e em células sanguíneas isoladas a fresco de acordo com algumas considerações descritas abaixo.

Figura 3: Imagem da serpente *L. acrochorda*.

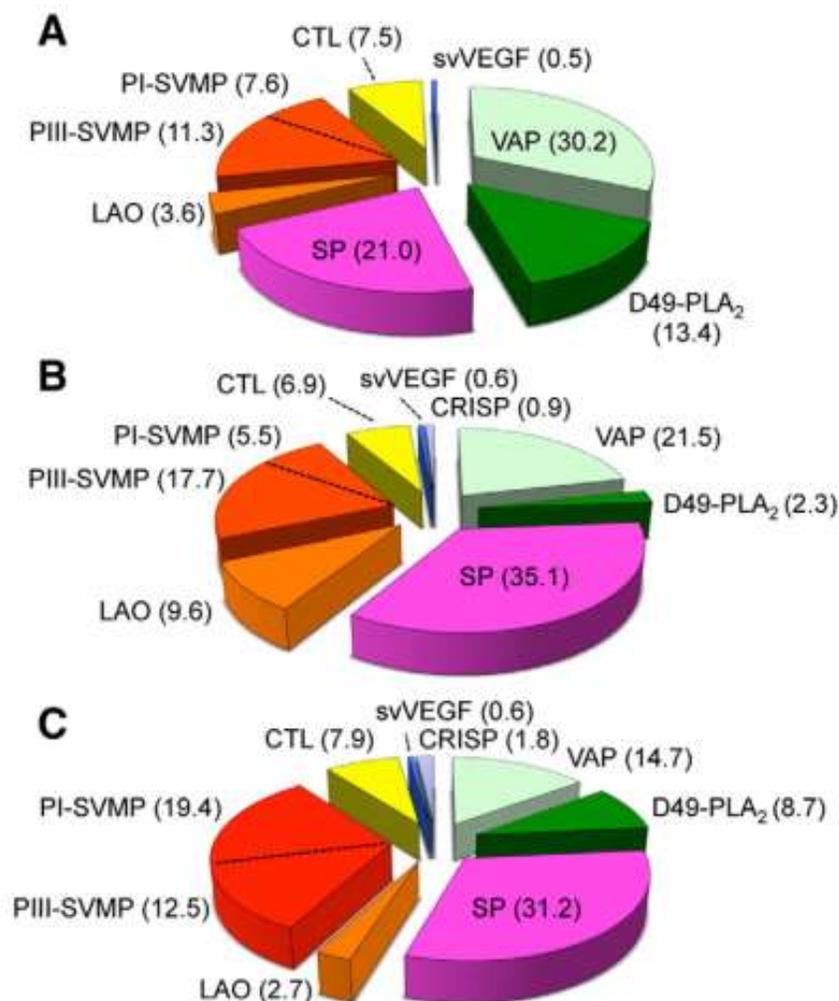


Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

1.5. Veneno de serpentes

Os venenos das serpentes são misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos que exercem ampla variabilidade na atividade biológica, a composição destes é de 90 % de proteínas. Alta variabilidade na composição química do veneno das serpentes está relacionada à variação de manifestações clínicas nos envenenamentos, incluindo aí dano tecidual local, alterações hemostáticas e efeitos sistêmicos potencialmente letais (GUTIÉRREZ et al., 2017). Estes venenos são constituídos de diferentes tipos de proteínas que podem variar entre espécies (Figura 4) que dão diferentes características aos venenos e que estão envolvidas na variabilidade dos sintomas resultantes das complicações nas vítimas de mordida de serpente (CARDOSO et al., 2003; MORA-OBANDO et al., 2014; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

Figura 4: Imagem da composição proteômica de venenos de serpentes do gênero *Lachesis*.



Adaptado de MADRIGAL et al., 2012.

Composição proteômica de diferentes espécies do gênero *Lachesis*. A, *L. melanocephala*; B, *L. acrochorda* e C, *L. muta*. serina proteinase (SP), peptídeos de bradicinina potencial (VAP), metaloproteinases de veneno de serpente (SVMP), ácido L-amino-oxidase (LAO), proteínas de lectina do tipo C (CTL), fosfolipases A2 (PLA₂), veneno de serpente com fator de crescimento endotelial vascular (svVEGF) e proteína secretora rica em cisteína (CRISP).

1.6. Efeitos de venenos de serpente na hemostase

O envenenamento por serpentes da família viperidae, dependendo da composição da peçonha, pode causar sangramento, incoagulabilidade sanguínea, trombocitopenia e disfunção plaquetária, ou mesmo efeitos pró-coagulantes em humanos e modelos animais (BENVENUTI et al., 2003; SENISE; YAMASHITA; SANTORO, 2015; YAMASHITA et al., 2014). Trombocitopenia e defeitos na função plaquetária contribuem para manifestações hemorrágicas em pacientes mordidos por algumas serpentes do gênero *Bothrops*. Geralmente,

esses distúrbios hemostáticos são atribuídos, principalmente, a duas famílias de proteínas presentes nos venenos de viperídeos: as metaloproteinases de veneno de serpente (SVMP, do Inglês, snake venom metalloproteinase) e serina proteinase de veneno de serpente (SVSP, snake venom serine protease) (YAMASHITA et al., 2014).

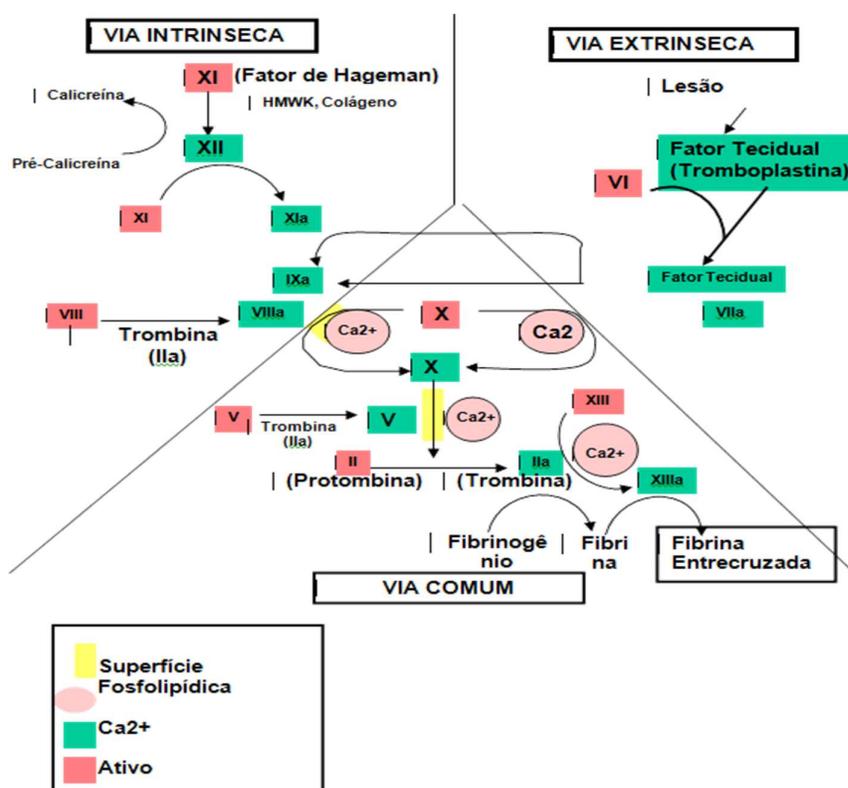
As metaloproteinases (SVMPs) estão entre as toxinas mais abundantes em muitos venenos de viperídeos e são os principais responsáveis pela hemorragia, que ocorre após envenenamento interferindo assim no sistema hemostático por facilitação da perda de sangue da vasculatura da presa (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). São um grupo de endopeptidases dependentes de zinco que exibem atividades hemorrágicas, proteolíticas e pró-coagulantes e que são inibidas por quelantes de metais como Na₂-EDTA (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012; YAMASHITA et al., 2014).

Os venenos de serpentes viperídeas contêm abundância de serina e metaloproteases. Algumas das serina proteinases assemelham-se à trombina na sua capacidade de desencadear a coagulação do fibrinogênio através da liberação de fibrinopeptídeo; outras carecem de atividade de coagulação com fibrinogênio, mas podem agregar diretamente plaquetas em plasma rico em plaquetas e suspensões de plaquetas lavadas (SERRANO et al., 1995). Crotalocitina, enzima agregadora de plaquetas, foi isolada do veneno de *Crotalus horridus horridus* (SCHMAIER; COLMAN, 1980). Do veneno de *Bothrops jararacussu*, HILL-EUBANKS; PARKER; LOLLAR, 1989, isolaram um ativador F VII1, BJV-VIIIcp, que também causa a agregação de plaquetas humanas lavadas. Também, outra serina proteinase básica, MSP 1, foi isolada do veneno de *Bothrops moojeni* (SERRANO; SAMPAIO; MANDELBAUM, 1993). A MSP 1 exibe atividade agregadora direta de plaquetas e aumenta a agregação plaquetária induzida pelo ADP. Todos estes indutores de agregação plaquetária de veneno de serpente foram considerados serina proteinases clássicas sensíveis ao fluorofosfato de diisopropilo (DFP) com atividade amidolítica em substratos sintéticos de trombina (SERRANO et al., 1995). As SVSP são caracterizadas pela presença de resíduos serina altamente reativos no sítio catalítico e são sensíveis aos reagentes como o fluoreto de fenil-metilsulfonila ou o cloridrato de 4- (2-aminoetil) benzenossulfonil fluoreto (AEBSF) (YAMASHITA et al., 2014). Outra família de proteínas, as proteínas lectina do tipo C (CTLP), que também estão presentes em grandes quantidades em veneno de viperídeos (NICOLAU et al., 2017) podem também atuar na modulação da função plaquetária e de proteínas de coagulação sanguínea (ARLINGHAUS; EBLE, 2012).

1.7. Coagulação do sangue *in vitro*

O sangue humano normalmente coagula dentro de 4 a 8 minutos. A coagulação é evitada se um quelante, tal como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou citrato, for adicionado para ligar o cálcio. Recalcificado, o plasma coagula em 2 a 4 minutos. O tempo de coagulação após recalcificação é encurtado em 26 a 33 s pela adição de fosfolípidos carregados negativamente e uma substância particulada como caulim (silicato de alumínio) ou celite (terra de diatomáceas), que ativam o fator XII da cascata da coagulação; a medida em questão é chamada de tempo de tromboplastina parcial ativada (aTTP). Como alternativa, o plasma recalcificado coagula dentro de 12 a 14 s após a adição de "tromboplastina" (mistura de TF e fosfolípidios) e, neste caso, a medida é chamada de tempo de protrombina (TP, tempo de protrombina). Dois caminhos de coagulação vão desencadear a via comum da coagulação que culmina na gênese da enzima trombina, que, por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (FRANCO, 2001; GOODMAN & GILMAN, 2011) (Figura 5).

Figura 5: Cascata de coagulação



Fonte: Tomado de Hepcentro, 2018

1.8. Agregação plaquetária

As plaquetas são elementos figurados que proporcionam a formação do tampão hemostático inicial nos locais de lesão vascular, além de participarem em processos de trombozes patológicas, que levam ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e trombozes vasculares periféricas. As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos, gerados pela fragmentação de megacariócitos na medula óssea e depuradas no sistema retículo endotelial. Após a lesão vascular, as plaquetas são recrutadas para promover adesão, ativação e agregação, eventos que constituem a formação do tampão plaquetário, a base fisiológica que dá suporte físico e metabólico para a ocorrência da hemostasia evitando, assim, a perda de sangue. A coagulação sanguínea é a passagem do sangue do estado líquido para sólido, e é iniciada em cascatas que são classificadas como via intrínseca ou via extrínseca, a depender do agente desencadeador (XU et al., 2016).

Agonistas e antagonistas de agregação

Vale a pena ressaltar que a ativação plaquetária pode ser modulada por diferentes tipos de agonistas que, ao se ligarem nos seus receptores específicos, iniciam uma série de reações bioquímicas que desencadeiam o processo de secreção granular e a formação de agregados plaquetários. Os principais agonistas plaquetários de relevância fisiológica são ADP (difosfato de adenosina), trombina, colágeno, ácido araquidônico e epinefrina. Podem ser classificados como fortes e fracos, dependendo da capacidade em estimular a secreção de grânulos plaquetários (GOODMAN & GILMAN, 2011)

Embora seja agregante plaquetário qualificado como fraco, ADP é um importante mediador da ativação e amplificação da agregação plaquetária. O ADP interage com a superfície das plaquetas através de receptores da família P2, cujos dois subtipos podem ser diferenciados pela via de ativação intracelular: P2X (ligado aos canais iônicos) e P2Y (acoplado à proteína G) (FALCÃO et al., 2013).

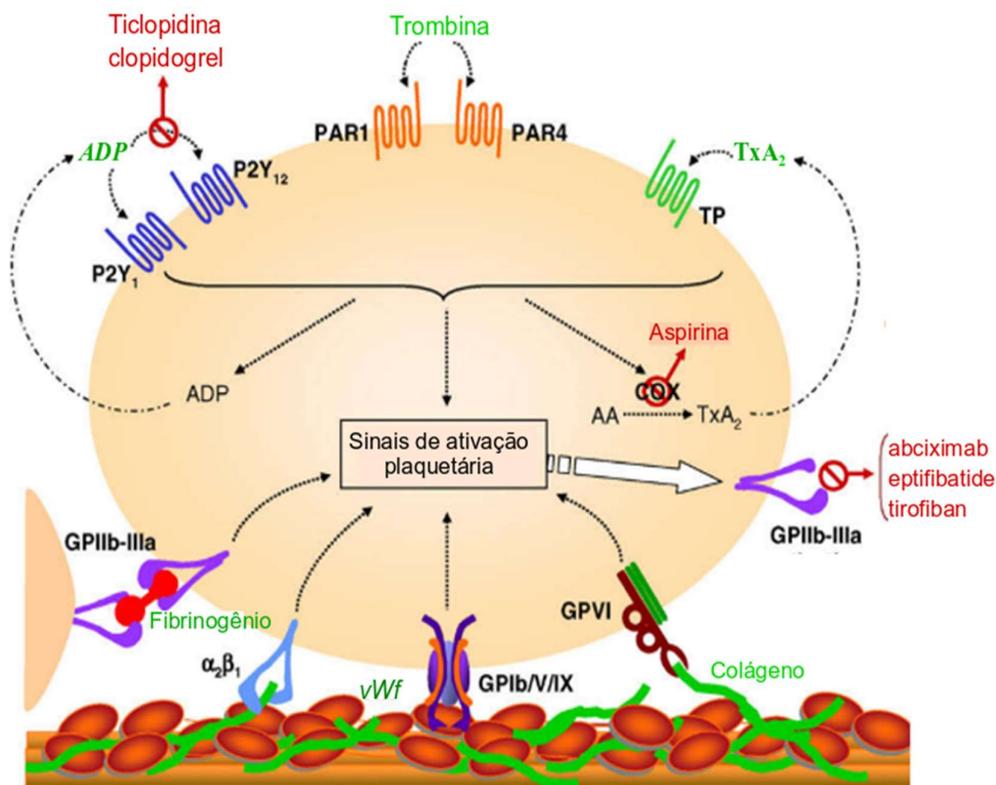
A trombina, por outro lado, é um dos mais potentes ativadores plaquetários, sendo capaz de estimular a secreção plaquetária em condições nas quais não há agregação. A sinalização mediada pela trombina ocorre, pelo menos em parte, através dos receptores ativados por protease (PARs), ligados à proteína G. Estes receptores são capazes de converter um evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembranar. As plaquetas humanas expressam os receptores PAR-1 e PAR-4. O PAR-1 medeia respostas plaquetárias rápidas em baixas concentrações de trombina, enquanto o PAR-4 responde com altas concentrações (GOODMAN & GILMAN, 2011). Além de ativar plaquetas através da

clivagem do receptor PAR, a trombina também cliva a glicoproteína V (GPV) de complexo GPIb-IX-V, o que permite a sua ligação à GPIb α , processo que resulta em ativação plaquetária. A trombina (fator IIa da cascata de coagulação) também é responsável pela conversão de fribinogênio em fibrina, via final da cascata de coagulação (GOODMAN & GILMAN, 2011; GUYTON; HALL, 2017).

1.9. Fármacos antiplaquetários

Nos últimos anos, inibidores potentes da função plaquetária foram sintetizados e agem por mecanismos definidos e específicos (GOODMAN & GILMAN, 2011), conforme pode ser visto na figura 6.

Figura 6: Mecanismos de ativação plaquetária e modo de ação das terapias antiplaquetárias existentes.



Fonte: Adaptado de GOODMAN & GILMAN, 2011

Ácido acetilsalicílico (AAS)

Nas plaquetas, o principal produto da ciclooxigenase é o tromboxano A₂. (TxA₂), indutor lábil da agregação plaquetária e potente vasoconstritor. O ácido acetilsalicílico bloqueia a produção de tromboxano A₂ pela acetilação de um resíduo de serina próximo ao

sítio ativo da ciclooxigenase-1 plaquetária (COX-1), a enzima que gera o endoperóxido cíclico precursor de TxA_2 . Por serem anucleadas, as plaquetas não sintetizam novas proteínas, razão pela qual a ação bloqueadora do ácido acetilsalicílico na COX-1 plaquetária é permanente (GOODMAN & GILMAN, 2011).

Clopidogrel (CLO)

Plaquetas contêm dois receptores purinérgicos P2Y, o P2Y1 e o P2Y12; ambos receptores para ADP e acoplados à proteína G (GPCR). Uma vez ativado por ADP, o receptor P2Y1 plaquetário se acopla à via de Gq1-PLC-IP3-Ca²⁺ para induzir agregação. O receptor P2Y12, ao ser ativado pelo ADP, inibe a adenililciclase e, conseqüentemente, diminui os níveis de AMP cíclico para resultar em menor inibição da ativação plaquetária. Portanto, o clopidogrel é potente inibidor irreversível dos receptores plaquetários P2Y12, sendo o seu perfil toxicológico mais satisfatório do que a ticlopidina à medida que, em raras ocasiões, origina trombocitopenia e leucopenia (BENNETT et al., 1999). O clopidogrel é um pró-fármaco cuja ação começa de forma lenta (FALCÃO et al., 2013).

Eptifibatida e inibidores da glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa).

A glicoproteína IIb/IIIa é uma integrina de superfície plaquetária, denominada $\alpha IIb\beta 3$. A GP IIb/IIIa é inativa em plaquetas em repouso, mas sofre transformação conformacional quando as plaquetas são ativadas. Esta transformação dá à glicoproteína IIb/IIIa a capacidade de agir como um receptor de fibrinogênio e de fator de von Willebrand, que fixa as plaquetas para, assim, mediar a agregação. Os inibidores de GPIIb-IIIa como eptifatide, abciximab e tirofiban agem inibindo via comum na agregação plaquetária - a ligação dos ligantes adesivos, mais notavelmente o fibrinogênio, à GPIIb-IIIa e são os mais potentes agentes antiplaquetários disponíveis. Embora os inibidores da GPIIb-IIIa tenham superado a baixa eficácia associada ao uso de aspirina e/ou clopidogrel, eles apresentam algumas limitações (GOODMAN & GILMAN, 2011; HAMILTON, 2009).

Em vista de avaliar os efeitos inflamatórios causados pelo veneno de serpente *L. achrochorda* (SVLa) foram testados alguns ensaios de citotoxicidade em células inflamatórias, como os neutrófilos.

1.10. Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no corpo humano, mas possuem vida útil curta e, para manter a homeostase, são continuamente liberados pela medula óssea (ROSE & MACKAY, 2014). Como parte do sistema imunológico inato, os neutrófilos são

componentes cruciais na primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. A resposta inflamatória mediada por neutrófilos é processo de múltiplas etapas que envolve a adesão inicial de células circulantes ao endotélio vascular ativado, seguida de extravasamento e migração para focos inflamatórios e destruição final *in situ* (KAPLAN, 2011).

1.11. Efeitos cardiovasculares do veneno

Uma das sintomatologias mais frequentes nos acidentes causados por *Lachesis* é a bradicardia (CASTRILLÓN-ESTRADA et al., 2007; MADRIGAL et al., 2012), por isso um estudo mais aprofundado sobre os efeitos cardiovasculares diretos que podem ser desencadeados durante o envenenamento se faz necessário. Além desse efeito, a hipotensão e a procoagulação são outros sintomas frequentemente relatados, embora não se saiba se decorre de efeitos cardiotóxicos do veneno ou de ações vasculares, ou de ambos.

1.11.1. Músculo liso vascular

O músculo liso está presente em vários sistemas de compõem o organismo humano, particularmente no revestimento de órgãos como vasos sanguíneos, estômago, intestinos, traqueia, útero, dentre outros, sendo um alvo importante para estudos relacionados com a fisiologia e farmacologia de diversos produtos naturais (BRITO, 2012). As células do músculo liso são pequenas, mononucleadas e têm formato fusiforme. Elas geralmente são dispostas em camadas helicoidais ou circular ao redor dos vasos sanguíneos maiores e em uma única camada em vasos menores como as arteríolas (GOODMAN & GILMAN, 2011).

1.11.2. Artérias

O sangue, ao ser bombeados pelos ventrículos, passa para as grandes artérias (artérias aorta e pulmonar). A aorta possui 3 camadas (túnicas): íntima, mais interna e delgada, apresentando células endoteliais, está em contato com o lúmen vascular; média, constituída por células musculares lisas e longitudinais; e adventícia, mas externa, constituída por tecido fibroblástico denso, vasos nutridores, linfáticos e nervos. É o segmento de maior pressão da circulação, chegando a uma pressão máxima, em média e no repouso, de 120 mmHg durante a sístole (contração do músculo cardíaco) e caindo para 80 mmHg durante a diástole (relaxamento do coração) (KUSUMOTO, 2001).

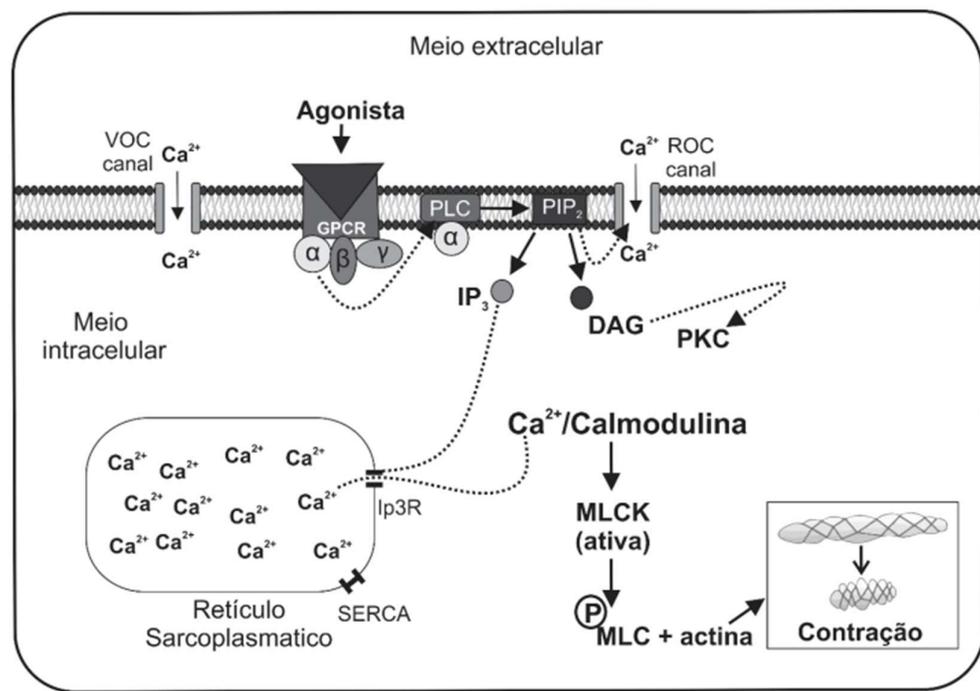
1.11.3. Mecanismo contrátil no músculo liso

No vaso intacto, o processo de contração das células musculares lisas vasculares é regulado, podendo sofrer influências múltiplas, incluindo estímulos mecânicos (alongamentos)

que induzem a ativação das proteínas contráteis actina e miosina. Alterações no potencial de membrana, causadas pelo disparo de potenciais de ação ou pela ativação de canais iônicos dependentes do alongamento na membrana plasmática também podem desencadear a contração.

O potencial de membrana do músculo liso está sujeito a muitas influências externas, diferentemente dos músculos esqueléticos e cardíacos. A contração do músculo liso ocorre em resposta a uma elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular (Figura 7). O Ca^{2+} atua como o regulador mais importante da função celular. Muitas substâncias, bem como mecanismos fisiológicos, atuam direta ou indiretamente ao influenciarem as concentrações intracelulares de Ca^{2+} livre (RANG et al., 2016). Na maior parte dos músculos lisos, o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular provoca contração como resultado da ativação de proteínas cinases sensíveis ao Ca^{2+} , tais como a cinase da cadeia leve da miosina, dependente de calmodulina. A fosforilação da cadeia leve da miosina está associada ao desenvolvimento de tensão (GOODMAN & GILMAN, 2011; GUYTON; HALL, 2017).

Figura 7: Mecanismos de contração do músculo liso vascular.



Fonte: adaptado de (WEBB, 2003).

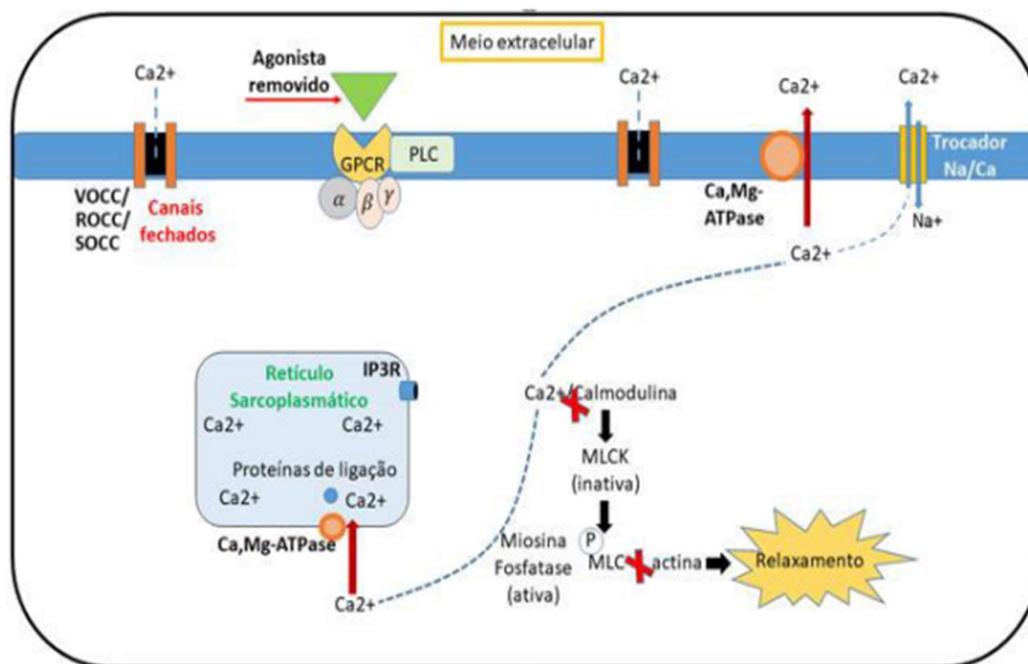
1.11.4. Mecanismo do Relaxamento do músculo liso

O relaxamento da musculatura lisa ocorre através da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de alguma substância que estimule a inibição do mecanismo contrátil

(WEBB, 2003). Independentemente disso, o processo de relaxamento requer diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) (SOMLYO; SOMLYO, 2000).

Vários mecanismos estão envolvidos na remoção do Ca^{2+} citosólico e envolvem o retículo sarcoplasmático (RS) e a membrana plasmática. A captação de Ca^{2+} no RS é dependente da hidrólise do ATP. A enzima ATPase ativada por íons magnésio (Mg^{2+}) e Ca^{2+} , $[\text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+}]$ -ATPase, quando fosforilada, liga dois íons Ca^{2+} , que são então translocados e liberados dentro do RS. O Mg^{2+} é necessário para a atividade da enzima, ligando-se ao sítio catalítico da ATPase para mediar a reação. As proteínas sarcoplasmáticas de ligação de Ca^{2+} , calsequestrina e calreticulina também contribuem para diminuir os níveis de Ca^{2+} intracelular. A membrana plasmática também contém $[\text{Mg}^{2+} + \text{Ca}^{2+}]$ -ATPases, fornecendo um mecanismo adicional para reduzir a concentração deste íon na célula. Os trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também estão localizados na membrana plasmática e auxiliam na diminuição do Ca^{2+} intracelular (figura 8) (WEBB, 2003).

Figura 8: Mecanismos de relaxamento do músculo liso vascular.



Fonte: adaptado de (WEBB, 2003).

1.11.5. Pressão arterial

O sistema cardiovascular permite a manutenção da pressão arterial (PA) e a distribuição de sangue para os tecidos, fornecendo nutrientes vitais e permitindo remover os resíduos do metabolismo celular. Está constituído pelo coração, que apresenta mecanismos

autônomos de controle e pela rede de capilares e vasos, que permitem a distribuição e retorno do sangue (BARRET et al., 2014).

A PA é uma das variáveis hemodinâmicas de medida mais comum, pois, além de ser aferida de modo relativamente fácil, pode fornecer informações importantes sobre a homeostase cardiovascular. Como a quantidade de sangue na árvore arterial, não é constante, mas varia com os fluxos de entrada, então tem pressão arterial sistólica e diastólica que consiste no maior valor de pressão dentro das artérias, fato que coincide com a sístole ventricular e a pressão arterial diastólica que consiste no menor valor de pressão dentro das artérias, e ocorre no final da diástole ventricular (CURI, RUI & PROCOPIO, 2011).

A função cardíaca é influenciada pela inervação simpática e parassimpática, os estímulos destas vias permitem modificações no bombeamento cardíaco para manter a homeostase do corpo. O coração possui fibras adrenérgicas, os nervos simpáticos liberam noradrenalina, que interage com receptores adrenérgicos β_1 para aumentar a frequência cardíaca (FC - efeito cronotrópico), velocidade de condução do potencial de ação (efeito dromotrópico) e a força de contração (efeito inotrópico). As fibras nervosas parassimpáticas colinérgicas chegam ao coração através do nervo vago e inervam o nodo sinoatrial (NSA), nodo atrioventricular (AV) e músculo atrial. A acetilcolina interage com os receptores muscarínicos para reduzir a FC (nodo SA) e gera efeito dromotrópico negativo (BARRET *et al.*, 2014).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Existem alguns relatos nos quais é possível compreender os sintomas gerados pelos acidentes lachésicos, dentre os quais é comum encontrar: sangramento leve ao redor da mordida, bolhas, sudorese profusa, cólicas abdominais, náuseas, "sintomas vagais" responsáveis por hipotensão, coagulação, diarreia e bradicardia (CASTRILLÓN-ESTRADA et al., 2007; MADRIGAL et al., 2012), Alterações eletrocardiográficas como elevação da onda T, morte celular, edema interfibrilar e elevação da fração enzimática CKMB (ÁNGEL-CAMILO, 2016).

Entretanto, além da sintomatologia clínica, não foram feitos estudos experimentais sobre os danos cardiovasculares diretos causados pela ação do veneno de serpentes do gênero *Lachesis*, e ainda menos da espécie *L. acrochorda*, motivo pelo qual o manejo clínico atual pode ser inadequado contra o envenenamento causado por esta espécie. Outra situação que aumenta a letalidade do envenenamento lachésico é que na atualidade não existe um soro antiofídico de uso específico para esta espécie, o que obriga o uso de soro polivalente que poderia ter uma resposta de neutralização diminuída para o tratamento deste acidente. Por isso, é importante fazer estudos que permitam conhecer de forma mais detalhada cada um dos efeitos causados por esse veneno.

As análises proteômicas dos venenos das *Lachesis* identificaram uma série de proteínas enzimáticas e não enzimáticas, principalmente SVSPs, SVMPs, fosfolipases A2 (PLA2), incluindo enzimas do tipo trombina, enzimas do tipo calicreína e fibrinogenases, lectinas do tipo C e L-aminoácido oxidase (LAO); várias destas proteínas foram isoladas e caracterizadas (MADRIGAL et al., 2012; PLA et al., 2013). Estes venenos também contêm peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) (DE OLIVEIRA et al., 2009; PLA et al., 2013). Embora existam extensos estudos bioquímicos de venenos de serpentes do gênero *Lachesis*, com a caracterização de vários componentes do veneno, particularmente SVMPs, SVSPs e PLA, relativamente pouco se sabe sobre as causas da hipotensão neste veneno e os mecanismos envolvidos, o que faz necessário conhecer os efeitos sobre a resistência vascular periférica e a resposta no débito cardíaco (frequência cardíaca).

Embora vários estudos tenham investigado as ações de componentes de venenos individuais *in vivo*, ainda há a necessidade de uma análise na toxicidade celular, possíveis distúrbios na hemostase e avaliação das respostas cardiovasculares do veneno do SVLa. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos nas células (neutrófilos e plaquetas), na pressão arterial e no tônus vascular causados pelo veneno de *L. acrochorda*. Com isso, esperamos

poder contribuir com informações experimentais que permitam entender e, potencialmente, traçar plano de ação no controle dos sintomas e danos causados pelo envenenamento por *Lachesis*.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- ✓ Determinar os efeitos do veneno de *L. acrochorda* em parâmetros cardiovasculares de ratos e em células sanguíneas humanas.

Objetivos específicos

- ✓ Conhecer o perfil proteico do veneno de *L. acrochorda*;
- ✓ Identificar se o veneno de *L. acrochorda* exerce efeito na coagulação e na agregação plaquetária;
- ✓ Determinar a citotoxicidade do veneno de *L. acrochorda* em plaquetas e neutrófilos humanos;
- ✓ Avaliar o efeito do veneno de *L. acrochorda* sobre a atividade catalítica da enzima mieloperoxidase em neutrófilos ativados por forbol-12-miristato-13-acetato (PMA);
- ✓ Estudar a ação do veneno de *L. acrochorda* sobre a contratilidade do músculo liso aórtico e em átrio isolado;
- ✓ Estabelecer o efeito do veneno de *L. acrochorda* efeito na pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos.

4. MÉTODOS

4.1. Obtenção do veneno

A extração do veneno de *L. acrochorda* foi realizada manualmente. Este procedimento requer que os animais sejam induzidos a morder um funil de vidro, previamente revestido no topo com papel parafilm, a fim de mimetizar uma mordida convencional e que tenha pouca possibilidade de contaminação. Na parte inferior, usou-se um tubo falcon para coletar o veneno.

Uma vez extraído o veneno, o mesmo foi aliquoteado em tubos Eppendorf estéreis de 1,5 mL, sendo realizados os seguintes procedimentos: centrifugação a 15.000 rpm, a 8 °C por 15 minutos (em centrífuga Labnet Hermle Z 233 MK-2) e logo após, foi recuperado o sobrenadante, que é o que contém as proteínas. A amostra foi selada com papel parafilm, congelada com nitrogênio líquido até atingir -80 ° C e liofilizada. Finalmente, o veneno foi armazenado a -20 ° C, até o momento de uso no experimento.

O veneno da serpente de *L. acrochorda* foi fornecido pelo Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), Colômbia, e o Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT), Colômbia.

4.2. Análise do perfil bioquímico do SVLa

A análise proteômica foi realizada no Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

4.2.1. Dosagem de proteína no SVLa

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de ácido bicinchonínico (BCA). Inicialmente foi preparado o reagente de trabalho que consistiu em misturar 50 partes do reagente A (Solução de Ácido Bicinchonínico, contendo ácido bicinchonínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em 0,1 N NaOH, pH final 11.25) com 1 parte do reagente B (Solução de Sulfato de Cobre (III) pentahidratado 4% (w/v) Standard de proteína (Albumina de soro Bovino ou BSA) e misturá-los até obter uma cor verde claro. A curva foi realizada em duplicata. Foram adicionados 2 ml do reagente de trabalho em cada tubo. Foram usadas quantidades que vão de 0-50 µl de BSA ou amostra e completou-se o volume final para obter um total de 100 µl com água MilliQ. Em seguida foram adicionados 2 ml do reagente de trabalho por tubo seguido imediatamente de incubação a 37°C por 30 min. Por fim foram transferidos 200 µl de cada tubo de reação para uma placa de 96 poços de fundo chato e realizada a leitura a 562 nm (SMITH et al., 1985).

4.2.2. Eletroforese do SVLa

A presença de macromoléculas de proteína na SVLa foi avaliada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Para tanto, foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel (Mini-Protean® II, BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) (LAEMMLI, 1970). Também foi aplicado no gel 3 µL do marcador de peso molecular de referência. O gel de acrilamida a 15% foi submetido a corrente máxima sob diferença de tensão constante de 200 V por 1:40 h e observação da linha de frente atingindo o final do gel sem excedê-lo. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250 (MORRISSEY, 1981).

4.2.3. Análise bioquímica do SVLa

Cada banda obtida no gel foi cortada com bisturi (pedaços de 1mm²), também foi cortado um pedaço de poliácrlamida para processar como controle positivo (BSA do controle de peso molecular). Posteriormente foi retirado o corante e SDS dos pedaços de gel com solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM. Para isso foram feitas 3 lavagens de 15 min com 200 µL de cada vez, agitando os pedaços do gel no vortex. Depois de removido o descorante, os géis foram secados no Speed Vac por 15 minutos (idealmente, os pedaços de gel devem fazer um barulhinho quando sacudidos contra as paredes do eppendorf). Foram adicionados 15 µL da solução de tripsina diluída e mantidos os pedaços de gel por 45min para início do processo de digestão. Finalmente as amostras foram secadas completamente e solubilizadas com 12-20 µL de ácido fórmico 1%, seguido de ultrassom 10 minutos, vórtex, ultrassom 10 minutos. Os peptídeos foram guardados no freezer para posterior análise por espectrometria de massas (SHEVCHENKO et al., 1996).

4.3. Teste de coagulação

No teste de coagulação foi avaliado o tempo de protrombina no plasma pobre em plaquetas, amostras de sangue citratado foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 min. Posteriormente, 100 µL de plasma foram incubados por 5 min a 37 ° C com reagente TP CLOT a 37 °C. No tubo de controle, uma fonte de fator de tecido enriquecido com Ca²⁺ (tromboplastina) foi adicionada ao tubo de controle, enquanto apenas SVLa (4-50 µg / mL) foi adicionada aos tubos de ensaio. Os tubos de controle ou teste foram agitados lentamente por mais 1 minuto e depois medidos o tempo de coagulação e a razão normalizada internacional (INR).

4.4. Avaliação da agregação plaquetária

4.4.1. Obtenção do sangue humano

Para o tratamento de amostras de sangue humano, o projeto foi submetido e aprovado mediante Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 11590519.7.1001.5054, com parecer nº 3.355.242 emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (Anexo 2). Para os ensaios *in vitro* foram utilizados neutrófilos humanos isolados a partir do subproduto de sangue humano cedido pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE (buffycoat) e o estudo de agregação plaquetária, foi realizado com sangue humano coletado de doadores voluntários, com prévia assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.4.2. Coleta do sangue

O sangue foi coletado de doadores voluntários como estudantes e trabalhadores da UFC, em tubo com citrato vacuette-Ref. 454327. O primeiro tubo de cada doador foi descartado para evitar possível ativação das plaquetas por resíduo tecidual. Homogeneizou-se de 2-4 vezes por inversão suave após da coleta. Para obter o plasma rico em plaquetas (PRP), as amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente durante 10 min a 1000 rpm. Por fim, se recuperou o PRP em tubo falcon plástico.

As suspensões de PRP foram pré-aquecidas a 37 °C e depois tratadas com SVLa durante 10 min com agitação constante (1200 rpm). A incubação plaquetária foi imediatamente seguida pela adição do SVLa nas diferentes concentrações (0,5, 1, 2 e 4 µg/mL), o ADP foi usado como controle positivo, para saber se as plaquetas estavam agregando (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996). Para identificar o possível mecanismos de ação do SVLa, diferentes fármacos com efeito e mecanismo conhecidos foram testados.

4.4.3. Inibição da ciclooxigenase plaquetária

O ácido acetilsalicílico (AAS, Sigma A5376) foi dissolvido em solução salina 0.9%, para obter uma solução de 50 µM. Aliquotas de 450 µL de PPR foram incubadas com 10 µL de solução de AAS ou veículo por 5 min, e então as plaquetas foram agregadas pela adição de ADP (10 µM) como controle positivo de agregação ou SVLa (0,4 µg/mL).

4.4.4. Inibição do ADP na agregação

O clopidogrel (CLO) foi dissolvido em solução salina 0.9%, para obter uma solução de 10 µM. As alíquotas de 450 µL de RPR foram incubadas com 10 µL de solução de clopidogrel ou veículo por 5 min, e então as plaquetas foram agregadas pela adição de ADP

(10 µM) como controle positivo de agregação, e o SVLa (0,4 µg/mL).

4.4.5. Papel da SVSP e SVMP na agregação plaquetária ex vivo.

Com base nos resultados obtidos do SVLa na agregação plaquetária, foram testadas a participação da atividade enzimática catalítica da SVSP e SVMP na agregação plaquetária, estas enzimas foram inibidas por de AEBSF (8 mM) ou Na₂-EDTA (13 mM), respectivamente, como descrito por YAMASHITA et al. (2014). Posteriormente, as plaquetas humanas (450 µL) foram estimuladas pela adição de controle (salina 0.9 %) ou SVLa (0,4 µg/mL).

4.5. Estudo citotóxicos

4.5.1. Avaliação em plaquetas

A citotoxicidade do veneno em plaquetas também foi avaliada através do ensaio do MTT (MOSMANN, 1983). O SVLa foi incubado com o PRP em concentrações crescentes (0,5, 1, 2 e 4 µg/mL) e, decorridos 30 min de incubação, o meio foi descartado e incubado um novo meio (200 µL) contendo 5% de MTT, na concentração de 5 mg/mL, sendo estas células incubadas por período adicional de 3 h. Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionados então 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, as placas foram agitadas durante 15 min e a absorbância medida. Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata.

4.5.2. Avaliação dos neutrófilos

Em vista da característica inflamatória dos venenos de serpentes, foram avaliados os efeitos dos SVLa em células inflamatórias como os polimorfonucleares (PMN) humanos, predominantemente neutrófilos (80-90 %) com viabilidade de $90 \pm 2,0\%$ (exclusão ao azul de tripan) foram isolados de acordo o método de LUCISANO; MANTOVANI (1984). Para isso, o sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o plasma lavado com solução salina, utilizando solução de gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos.

4.5.3. Atividade metabólica mitocondrial em plaquetas e neutrófilos (Teste do MTT).

Para avaliar a citotoxicidade através do ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolio (MTT; MOSMANN, 1983), o veneno foi incubado com neutrófilos ou PRP, isolados em concentrações crescentes (0,5; 1; 2 e 4; µg/mL). Decorridos 30 min de incubação, o meio foi descartado e incubado em novo meio (200 µL) contendo 5% de MTT, na concentração de 5 mg/mL, sendo estas células incubadas por período adicional de 3 h. Por fim, o sobrenadante foi descartado, foi incubado a 37 °C de 24-48 h e, após isso, adicionados 150

μL de dimetilsulfóxido (DMSO) puro. Posteriormente, as placas foram agitadas durante 15 min e a leitura feita a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.4. Determinação de Lactato Desidrogenase (LDH).

O LDH é um ensaio que consiste na determinação da atividade da enzima lactato-deidrogenase (LDH) no meio extracelular, para identificar lesões na membrana celular. O princípio do ensaio constitui em medida espectrofotométrica do consumo de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) durante a ação catalítica da LDH que reduz o piruvato a lactato (BERGMEYER; BERNT, 1963; METCALF et al., 1986). A citotoxicidade do veneno foi avaliada pela medida de LDH em neutrófilos isolados, através de kit de detecção (Roche Molecular Biochemicals, UK) de acordo com as instruções do fabricante.

O ensaio foi realizado utilizando o kit de LDH (Liquidiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorbância devido à oxidação de NAD^+ , a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. As alíquotas de 250 μL de substrato foram pré-incubadas como o sobrenadante por 3 min, a 37 °C. Foi realizada a leitura da absorbância em 340 nm nos tempos 1 e 3 min, á 37 °C, em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = \left(\frac{A1 - A2}{2} \right) \times 1746,03$$

Onde:

A= atividade da enzima LDH na amostra em U/L

A1= absorbância inicial (1 min) em 340 nm.

A2= absorbância final (3 min) em 340 nm.

1746,03= fator de cálculo estipulado pelo fabricante para o volume de amostra de 25 μL .

A citotoxicidade do SVLa foi avaliada em triplicata.

4.5.5. Avaliação da atividade inflamatória

Estimulação das células. Suspensão de neutrófilos humanos (5×10^6 células/mL) foi pré-incubada por 30 min a 37°C na presença ou na ausência (Hanks gel, células não-tratadas) de indometacina (100 μM). A seguir, foi adicionado forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 0,1 μM) por 15 minutos a 37 °C. Na sequência, o material foi centrifugado durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas, foi utilizado nos ensaios enzimáticos realizados segundo metodologia descrita por ÚBEDA e colaboradores (2002). Posteriormente foi realizada a determinação da concentração de MPO. Ao sobrenadante foi acrescido 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 1,5 mM) e a reação foi interrompida pela adição de acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A absorbância foi determinada em 620 nm. A

construção de uma curva padrão foi realizada pela adição de quantidades crescentes de MPO (0,125 – 3 U/mL). Os resultados foram expressos como percentual de inibição da liberação de MPO (DE YOUNG et al., 1989).

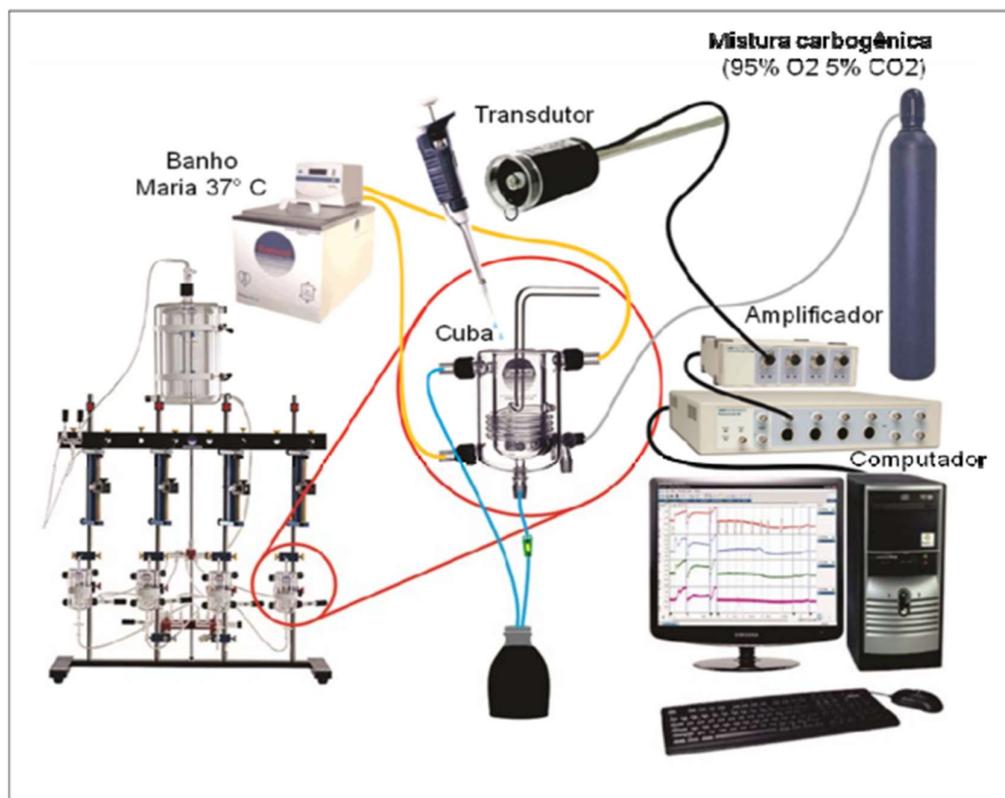
4.6. Obtenção dos animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos com um peso entre 260 e 300 g, provenientes do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (Brasil). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, aclimatizados com temperatura constante de $22,0 \pm 0,5$ °C, luminosidade (12 h de ciclo claro/escuro), umidade e circulação de ar controlado, recebendo ração padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação com Animal (CONCEA) e submetido à aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA nº 9555140618) da Universidade Federal do Ceará (Anexo 1).

4.7. Experimentos com órgãos isolados

Os animais foram sacrificados por overdose de anestésico imediatamente antes do início dos experimentos para a obtenção dos tecidos. O átrio e aorta torácica foram rapidamente retirados e imersos em solução fisiológica à temperatura ambiente. Após a remoção dos tecidos aderentes, o átrio foi montado no sistema de órgão isolado para esperar os registros de resposta de atividade espontânea. Enquanto a aorta foi cortada transversalmente em segmentos em forma de anel (1 x 5 mm) e ligados a peças triangulares de fio de aço (0,3 mm de diâmetro) que foram suspensas em cuba para órgão isolado de 5 mL contendo solução de Krebs a 37 °C, aerada continuamente com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Anéis de aorta foram mantidos sob tensão basal de 1 g. A tensão ativa do tecido foi registrada usando-se transdutor de força isométrico (ML870B60/C-V, AD Instruments, Austrália) conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab™ 8/30, AD Instruments, Austrália), como esquematizados na figura 9. Após período de estabilização do tecido no sistema (pelo menos 60 min), as contrações controle foram induzidas pelo aumento hipertônico de concentração de KCl para 60 mM na solução extracelular no banho nos experimentos de aorta. As preparações de aorta foram consideradas equilibradas quando duas contrações sucessivas mostraram amplitudes semelhantes. Após a estabilização das respostas tanto de viabilidade como contráteis espontâneas, foram adicionadas doses crescentes de veneno (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600, 1000 µg/mL), num intervalo de tempo de 5 min. Para átrio isolado a tensão basal foi 0,5 g.

Figura 9: sistema usado para experimentos de contratilidade *in vitro* de aorta e átrio de rato.



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo liso (LAFARMULI).

4.8. Experimentos *in vivo*

4.8.1. Avaliação da pressão arterial

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e a artéria femoral esquerda foi canulada para medição da pressão sanguínea e a veia femoral para injeção de veneno (n = 5). As cânulas foram previamente preenchidas com solução salina heparinizada (10 UI/mL). O veneno foi administrado pela via intravenosa (iv) (0,5 e 1,5 mg/kg em 100 μ L de solução salina a 0,9%). Os parâmetros hemodinâmicos foram continuamente monitorados com um módulo de aquisição de dados PowerLab e analisados usando o software Labchart Pro 7 (ADInstruments, Newcastle, Austrália); parâmetros incluídos na tensão arterial (sistólica, diastólica e média de pulso) foram registrados usando transdutor de pressão sanguínea MLT-0699/670 (ADInstrumentos), de cujo sinal se derivou a frequência cardíaca. Também foi registrado o electrocardiograma (ECG) de cada animal. Após os registros, os ratos sobreviventes foram anestesiados com overdose de anestésico (DIAS et al., 2016).

4.8.2. Análise Histológica

Os tecidos coletados (coração, pulmão, rim, fígado e intestino) do estudo foram seccionados e armazenados em cassetes histológicos e imersos em formol 10% tamponado por 24 horas. Logo após esse período foi armazenado em álcool 70% até o processo de fixação. O material foi processado rotineiramente para exame histopatológico em processador automático de tecidos, desidratado em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento, realizou-se a inclusão do material em parafina. O material nos blocos de parafina foi cortado em 5µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e posteriormente registradas através de fotomicrografias.

4.9. Análise estatística

Na análise estatística, seguimos um delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram analisados em termos de ajuste à curva normal e homogeneidade de variâncias, permitindo a escolha de ANOVA unidirecional (paramétrico) ou Kruskal-Wallis (não paramétrico), seguido de um teste post-Hoc. Todas as análises e curvas de dose-resposta foram mapeadas usando o software GraphPad-Prism 5.0. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (S.E.M.). A significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

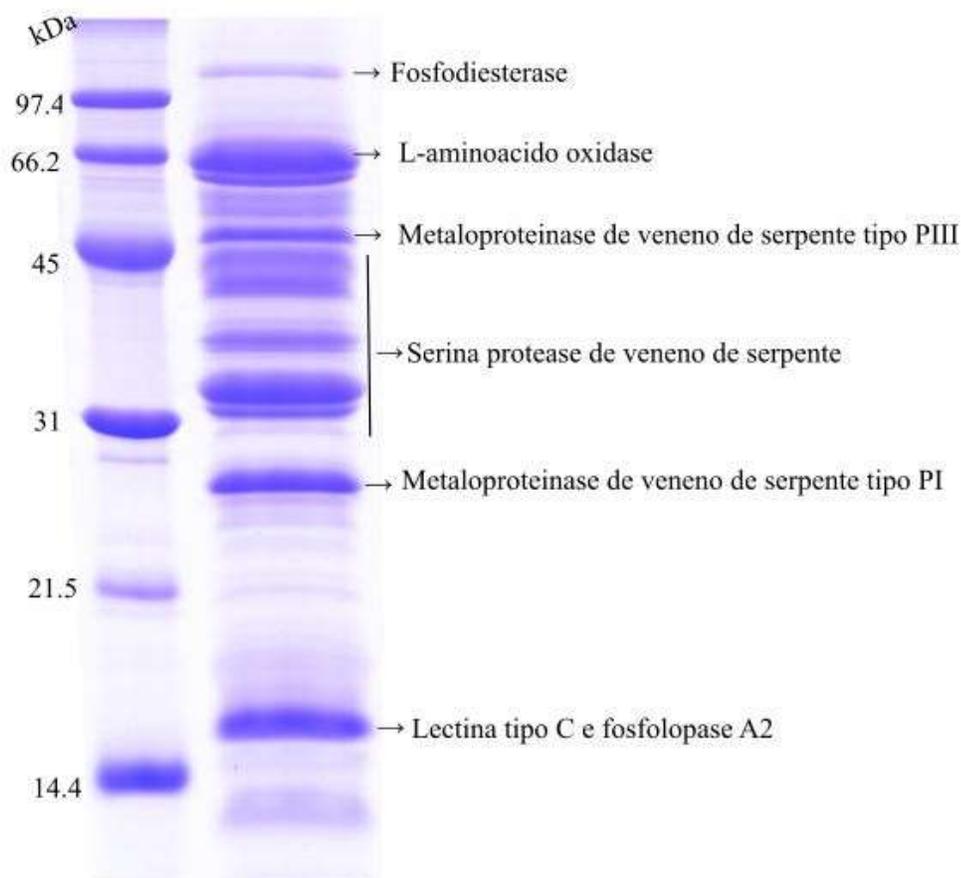
5.1. Dosagem de Proteína

Na Dosagem de proteína do SVLa, realizada diante o método do BCA, mostro que o veneno tem um 60% de proteína na sua composição. A partir daquilo foram realizados os experimentos de eletroforese e avaliação de perfil bioquímico.

5.2. Eletroforese do SVLa

A avaliação do total de SVLa em SDS-PAGE revelou bandas com massas moleculares variando de 5 a 110 kDa (Figura 10). A análise bioquímica individual de cada banda diante espectrometria de massas, identificou peptídeos compatíveis com a presença de lectina tipo C e fosfolipase A2 (entre 14,4 - 21,5 kDa); metaloproteinase PI de veneno de cobra (entre 21,5-31 kDa); serina proteases de veneno de serpente (várias bandas de 31 a 45 kDa); metaloproteinase PIII de veneno de serpente (entre 45 - 66,2 kDa); L-aminoácido oxidase (~ 66,2 kDa); e fosfodiesterase (banda acima de 97,4 kDa).

Figura 10: SDS-PAGE do SVLa total em um gel de 15%.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

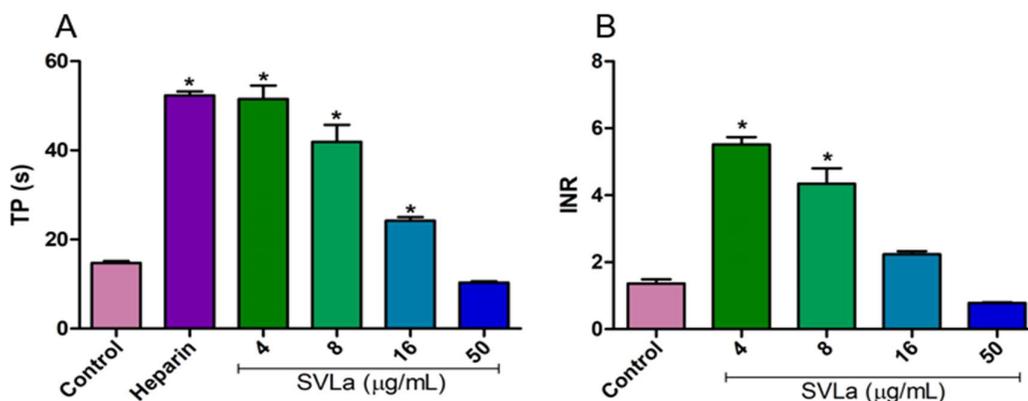
A execução de SVLa ocorreu no tampão de redução antes do carregamento e corada com azul de Coomassie. A faixa esquerda indica o marcador de proteína e a faixa direita corresponde a SVLa (20 µg de veneno protéico) separado pela corrente aplicada sob diferença de tensão constante de 200 V por 100 min. Foram indicadas massas moleculares de 14,4 a 97,4 kDa. No lado direito foram identificadas as famílias de proteínas identificadas por espectrometria de massas, usando o software PatternLab4 para identificar os peptídeos.

5.3. Efeito do SVLa na coagulação

Foi avaliado o efeito do SVLa na coagulação, especificamente pela via extrínseca da coagulação, com o teste de tempo de protrombina (TP) em plasma humano. Para este experimento, foram usadas as concentrações de 4, 8, 16, 50 µg/mL que foram escolhidas com base em experimentos prévios. Na Figura 11A mostra-se que uma fonte de fator tecidual (tromboplastina) desencadeou a coagulação com um tempo de protrombina de $14,7 \pm 0,6$ s (Controle), tempo significativamente aumentado quando a reação ocorreu na presença de heparina (0,5 UI/mL; $52,3 \pm 2,1$ s; $p < 0,05$, teste de Dunnett). SVLa (4-50 µg/mL) também foi capaz de desencadear coagulação em amostras de plasma humano. A 4 µg/mL, o tempo de

protrombina correspondeu a $51,3 \pm 2,3$ s, valor significativamente superior ao do tubo controle ($p < 0,05$). A $50 \mu\text{g/mL}$, a SVLa induziu um tempo de protrombina ($10,3 \pm 1,2$ s) que não diferiu do valor medido no tubo controle ($p > 0,05$). A Figura 11B mostra que o tratamento do plasma humano com SVLa resultou em valores da razão normalizada internacional (INR) que foram inicialmente mais altos do que no tubo de controle, mas que diminuíram em concentrações mais altas de SVLa ($p < 0,05$, teste de Dunnett).

Figura 11: Efeito do SVLa na coagulação.



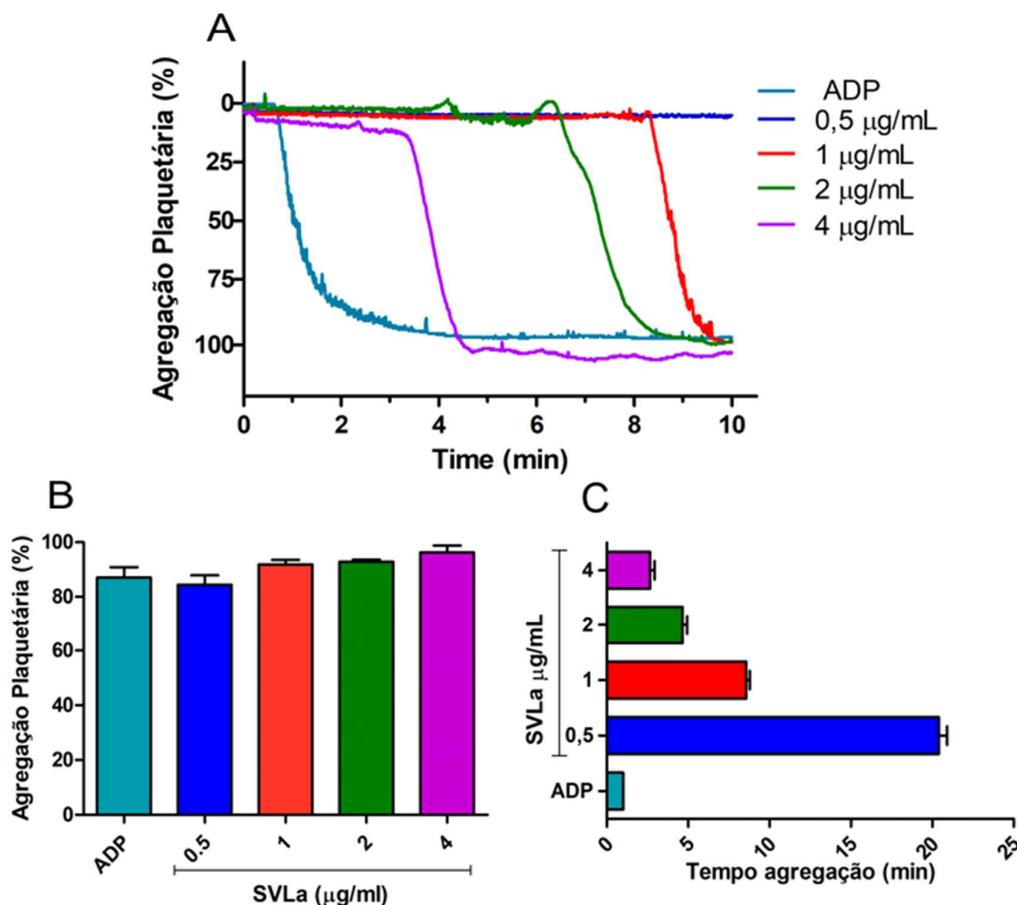
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

O gráfico mostra o efeito do SVLa na coagulação. Em A, tempo de protrombina (PT) em segundos medido em um tubo contendo a fonte de fator tecidual enriquecido em Ca^{2+} (tromboplastina) na ausência (Controle) ou na presença de $0,5 \text{ UI / mL}$ de heparina (Heparina), um anticoagulante composto. O TP também foi medido quando SVLa ($4\text{-}50 \mu\text{g/mL}$) foi adicionado ao tubo como substituto da tromboplastina. Em B, mostra os mesmos resultados para SVLa de acordo com os valores da razão normalizada internacional (INR). Os dados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (S.E.M.). *, $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

5.4. Determinação do efeito do SVLa na agregação plaquetária em plasma humano

Foi avaliado o efeito do SVLa na agregação plaquetária diante a adição de SVLa ($0,5; 1; 2; 4 \mu\text{g/mL}$). Em amostras de plasma rico em plaquetas (PRP), SVLa causou alta agregação plaquetária (observado como deflexão para baixo no traçado da Figura 12A) nas concentrações testadas de $1, 2$ e $4 \mu\text{g/mL}$, cuja magnitude de agregação foi igualmente comparável à do ADP, usado como controle positivo (Figura 12B). O tempo para alcançar a resposta agregante foi inversamente dependente da concentração do veneno (a concentração mais alta induziu agregação em menor tempo), tendo uma diferença estatisticamente significativa das concentrações testadas versus a resposta com ADP (teste de Dunnett) (Figura 12C).

Figura 12: Efeito do SVLa na agregação plaquetária em plasma humano.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

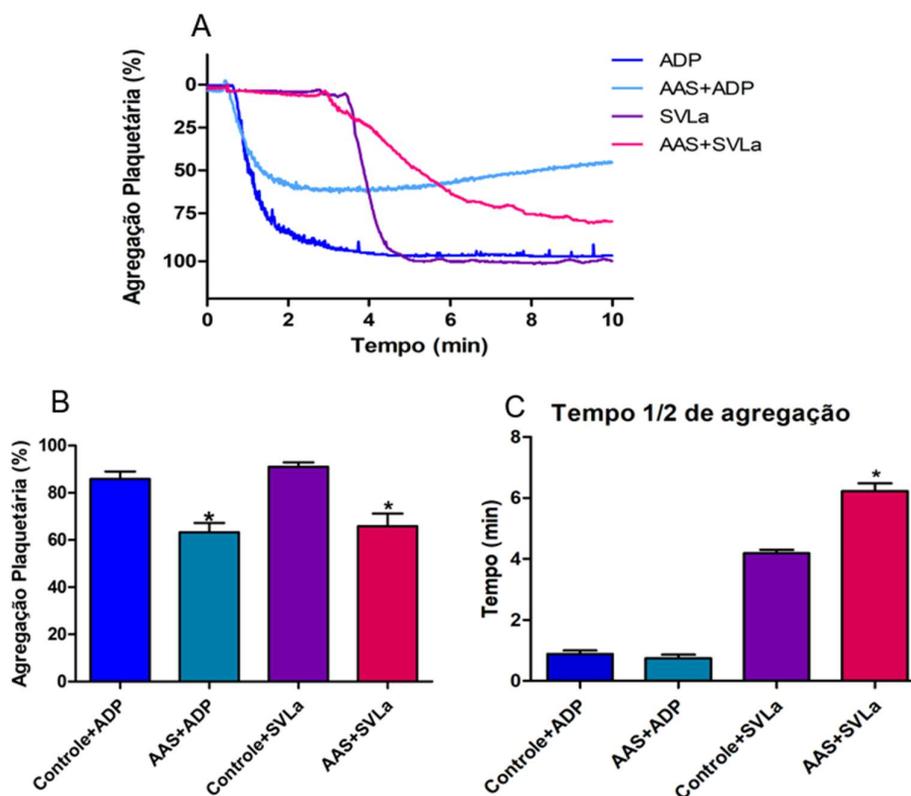
O gráfico mostra em A, traços experimentais mostrando agregação plaquetária (indicada pela deflexão descendente no traço experimental) causada por 10 µM de adenosina difosfato (ADP) ou SVLa em concentrações variando de 0,5 a 4 µg / mL. Observe que o tempo nesta figura foi limitado a apenas 10 min. Em B, porcentagem de agregação máxima de plaquetas em diferentes concentrações de veneno (dados foram obtidos aos 20 min de registro para incluir o resultado com 0,5 µg / mL de SVLa). C, tempo (em min) para desencadear a agregação plaquetária em cada concentração de SVLa ou ADP. Em B e C, os dados são médios ± S.E.M.

5.4.1. Inibição da ciclooxigenase na agregação

Diante os resultados obtidos com o SVLa (4 µg/mL), foram iniciados estudos para verificar a possível via de ação do veneno sobre a agregação, observando quais vias de ativação plaquetária poderiam estar envolvidas no efeito agregante. A contribuição da síntese de TXA₂ para agregação plaquetária induzida por SVLa foi analisada usando um inibidor irreversível da ciclooxigenase plaquetária, o AAS (Figura 13). As plaquetas que foram previamente incubadas com AAS (50 µM), reduziram a magnitude de agregação a 65,8 ± 5,3%

(n = 6) (Figura 13A), valor menor que inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP ou pelo SVLa (figuras 13A e 13B). ($p < 0,05$, teste de ANOVA; Figura 13A e 13B). Entretanto o tempo para induzir 50% de agregação ($t_{1/2}$) foi aumentado o significativamente apenas pelo SVLa (de $4,2 \pm 0,1$ min (ausência de AAS) para $6,2 \pm 0,2$ min (presença de AAS) ($p < 0,05$, teste de ANOVA; Figura 13C).

Figura 13: Inibição pelo ácido acetilsalicílico (AAS) da agregação plaquetária induzida pelo ADP ou SVLa.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

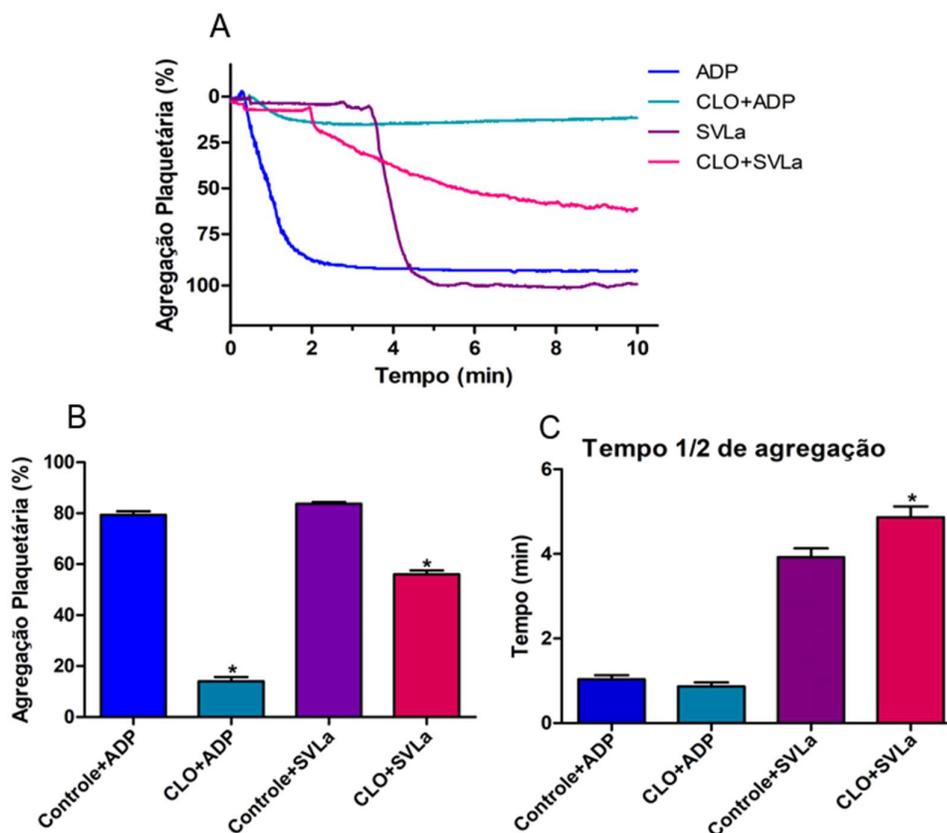
O gráfico mostra a resposta da incubação das plaquetas por 5 min com $50 \mu\text{M}$ de AAS (inibidor irreversível da cicloxigenase 1) ou nos controles que tinham solução salina $0,9 \text{ mg/mL}$ foi adicionado de $4 \mu\text{g/mL}$ SVLa ou $10 \mu\text{M}$ ADP para induzir agregação. A, registros originais da resposta do ADP (à esquerda) ou de SVLa (à direita) em PRP mantido na ausência ou na presença de AAS; B, Percentuais de agregação plaquetária, em dados obtidos no tempo 10 min. C, tempo para acontecer 50% da agregação plaquetária ($t_{1/2}$). Os resultados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). *, $p < 0,05$, teste de ANOVA, vs. veículo.

5.4.2. Inibição do ADP na agregação plaquetária

Clopidogrel inibe de forma seletiva e irreversível a agregação plaquetária induzida pelo ADP, impedindo a ligação do difosfato de adenosina ao receptor de plaquetas (FALCÃO et al., 2013). As Figuras 14A e 14B mostram que $4,4 \text{ mM}$ de clopidogrel inibiu significativamente a agregação causada por ADP de $79,4 \pm 1,4\%$ (n = 8) para $14,0 \pm 1,7\%$ (n

= 8) ($p < 0,05$, teste de ANOVA). Na mesma concentração, clopidogrel também reduziu de forma significativa a agregação induzida por SVLa de $83,7 \pm 0,7\%$ ($n= 7$) para $56,0 \pm 1,5$ ($n = 8$) ($p < 0,05$, teste de Tukey's), com alteração significativa no tempo médio da agregação, que teve um aumento significativo de $3,8 \pm 0,7$ min para $5,0 \pm 1,2$ (Figura 14C) ($P < 0,05$, teste de ANOVA).

Figura 14: Inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP ou SVLa na presença de clopidogrel (CLO).



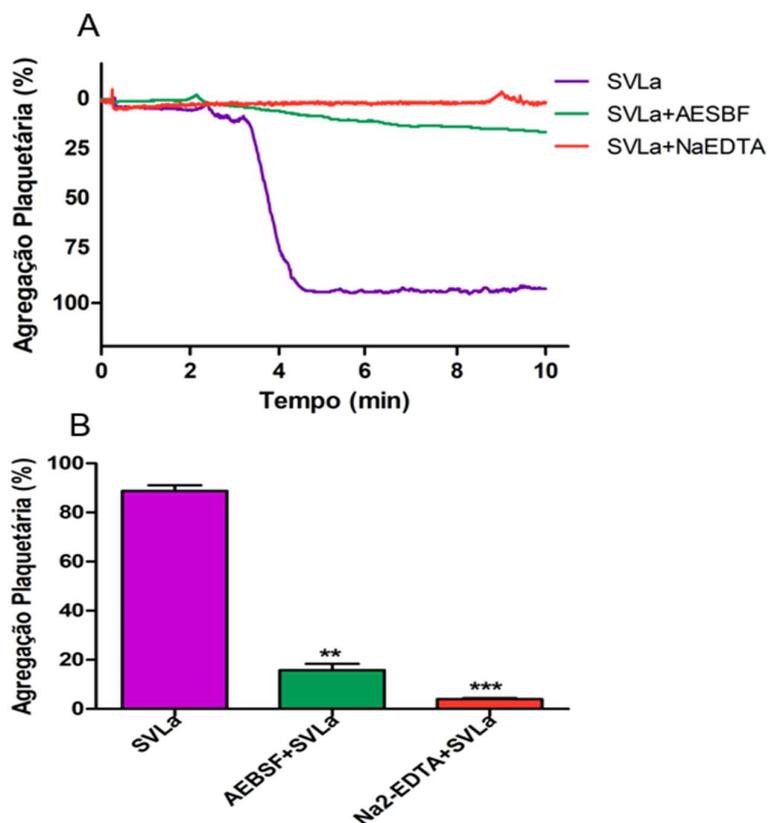
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

O gráfico mostra a resposta da incubação das plaquetas por 5 min com 4,4 mM de CLO ou controle fio incubado com solução salina 0,9 mg/mL e agregação produzida pela adição de 4 μ g/mL SVLa ou 10 μ M ADP. A, registros originais da resposta do ADP (à esquerda) ou de SVLa (à direita) em PRP mantido na ausência ou na presença de CLO. B, Percentuais de agregação plaquetária, em dados obtidos no tempo 10 min. C, tempo para acontecer 50% da agregação plaquetária (t1/2). Os resultados foram expressos com a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). *, $p < 0,05$, teste de ANOVA, vs. veículo.

5.4.3 Efeito da Serina protease (SVSP) e Metaloproteinase (SVMP) na agregação plaquetária.

Para avaliar o envolvimento das enzimas SVMP e SVSP presentes no SVLa sobre a agregação plaquetária, o PRP foi incubado com inibidores específicos para essas proteínas, e depois avaliou-se a extensão da agregação plaquetária (Figura 15). A magnitude da agregação plaquetária induzida por SVLa também foi significativamente reduzida ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) para $15,7 \pm 2,6\%$ ($n = 12$) e $4,0 \pm 0,5\%$ ($n = 9$) quando o teste foi realizado na presença de 8 mM de AEBSF (inibidor de SVSP) ou 13 mM de Na₂-EDTA (inibidor de SVMP) (Figura 15 A e 15B), respectivamente. Tais valores foram significativamente inferiores a $88,8 \pm 2,3\%$ ($n = 9$) no controle.

Figura 15: Efeito dos inibidores de SVSP e SVMP, o AEBSF (8 mM) e NA₂-EDTA (13 mM) respectivamente na agregação causada por SVLa.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

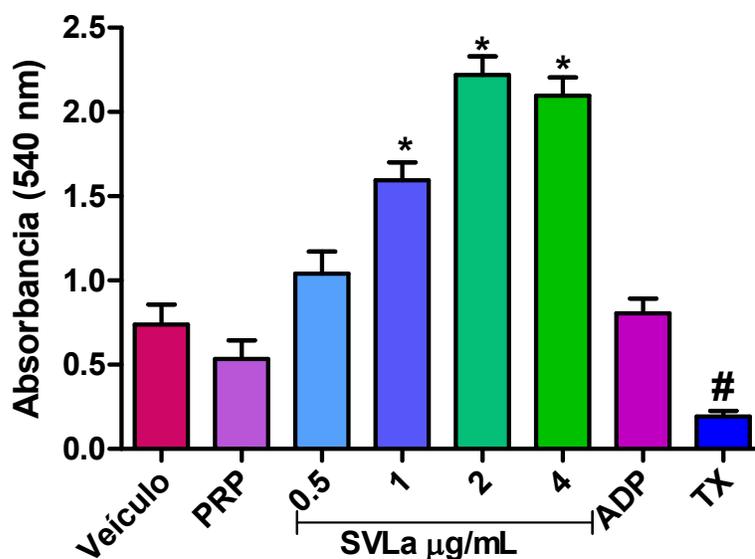
O gráfico mostra a resposta da incubação das plaquetas com inibidores de SVSP e SVMP. A, registros originais da resposta do veneno em PRP mantido na ausência ou na presença dos inibidores de SVSP e SVMP, EABSF e Na₂-EDTA respectivamente. B, Percentuais de agregação plaquetária, em dados obtidos no tempo 10 min; os resultados foram expressos com a média ± erro padrão da média (E.P.M.). ***, $p < 0,001$, teste de Kruskal-Wallis test, (Dunn's) vs. SVLa sem inibidores.

5.5. Citotoxicidade

5.5.1. Efeito do SVLa sobre a atividade metabólica mitocondrial em plaquetas

A adição do SVLa em concentrações crescentes (0,5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$) em PRP causou aumento significativo da absorbância a 540 nm avaliada através do teste de MTT (Figura 16), mas não reporta inviabilidade celular. A absorbância passou de $0,5 \pm 0,1$ no grupo PRP ($n = 17$) para $2,2 \pm 0,1$ na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 15$), valores com diferença estatística ($p < 0,05$, teste de Tukey). Por outro lado, o Triton X-100 0,2% v/v (padrão tóxico) reduziu significativamente a absorbância para $0,2 \pm 0,03$ ($n = 14$; $p < 0,05$, teste de Tukey vs. veículo), considerada como redução de viabilidade celular. ($p < 0,05$, teste de Tukey; comparação vs. PRP).

Figura 16. Efeito do SVLa sobre a viabilidade de plaquetas



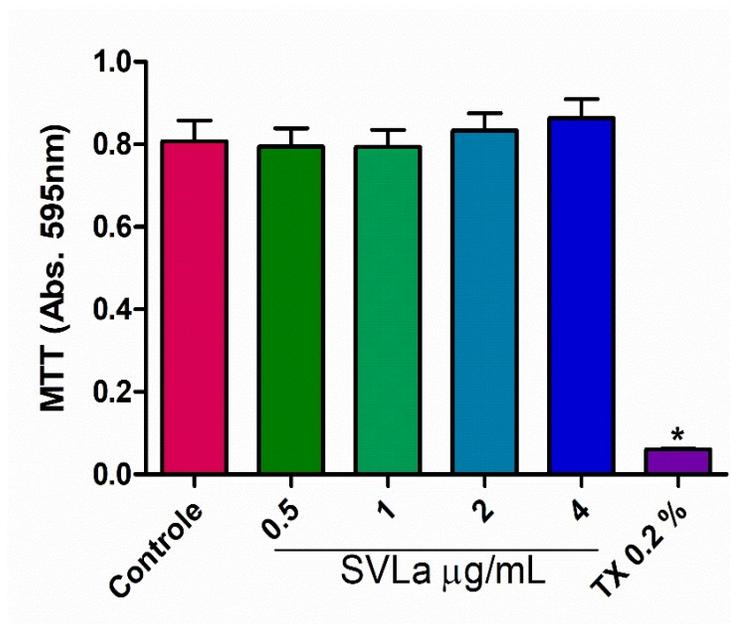
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Valores de absorbância a 540 nm em amostras de PRP em tratamento com SVLa (0,5 - 4 $\mu\text{g/mL}$). Observe que 10 μM de adenosina difosfato (ADP) não foram alterados, enquanto 0,2% (v / v) de triton X-100 reduziu significativamente os valores de absorbância no ensaio MTT. Os dados são médios \pm S.E.M. de absorbância, * $p < 0,05$ vs. Controle, ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

5.5.2. Efeito do SVLa sobre a atividade metabólica mitocondrial em neutrófilos

Usaram-se as mesmas doses de SVLa (0,5, 1, 2, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) empregadas nos testes de agregação. No teste de MTT, o SVLa não causou redução significativa do metabolismo mitocondrial celular (Figura 17), as diferenças das absorbâncias obtidas para cada um dos tratamentos não foram estatisticamente significativas com as encontradas no controle ($p < 0,05$, teste de Dunnett). Por outro lado, na presença de Triton X-100 0,2% v/v (TX, padrão tóxico) o número a absorbância foi $0,0607 \pm 0,1$ ($n = 3$), valores significativamente menores quando comparados ao grupo do veículo ($p < 0,05$, teste de Dunnett).

Figura 17. Atividade do SVLa sobre a viabilidade celular em neutrófilos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

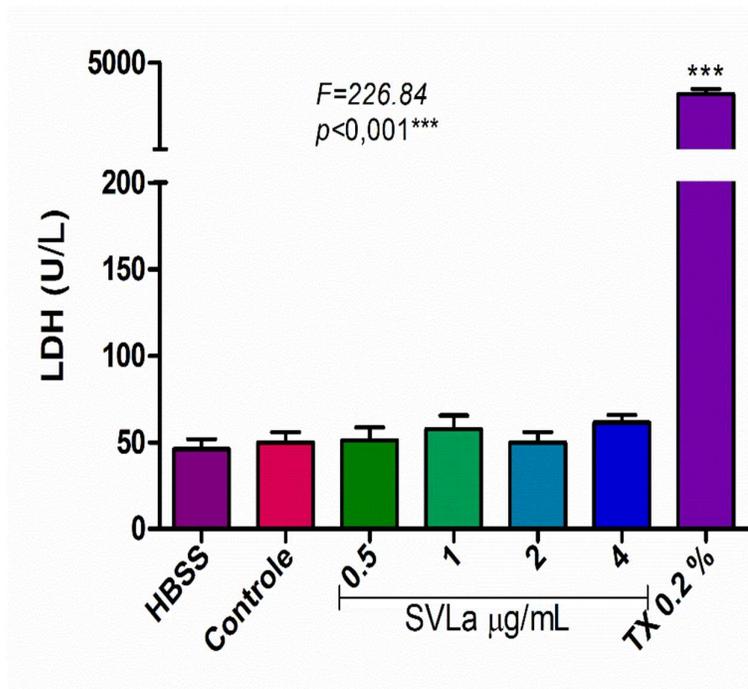
foram avaliados em neutrófilos mantidos na ausência ou na presença de SVLa (0,5 - 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Observe que o veneno era não causou mudanças significativas no ensaio do MTT, enquanto o triton X-100 a 0,2% (v / v) reduziu significativamente os valores experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M, *, $p < 0,05$, ANOVA e teste de Dunnett vs. HBSS.

5.5.3. Efeito do SVLa sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)

A figura 18 mostra o efeito do SVLa sobre a atividade enzimática de neutrófilos mensurada através da atividade da enzima LDH. Pode ser observado que a adição do veículo à suspensão de células (grupo veículo - salina 0,9 %), não alterou significativamente a atividade da enzima LDH em relação ao grupo tratado com HBSS (células não tratadas). Enquanto ao tratamento das células com Triton X-100 (padrão tóxico) aumentou

significativamente a atividade da enzima LDH. A adição do SVLa (0,5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$) não promoveu o aumento significativo da atividade de LDH em relação ao grupo controle.

Figura 18: Avaliação da toxicidade do SVLa em neutrófilos humanos através de mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH).



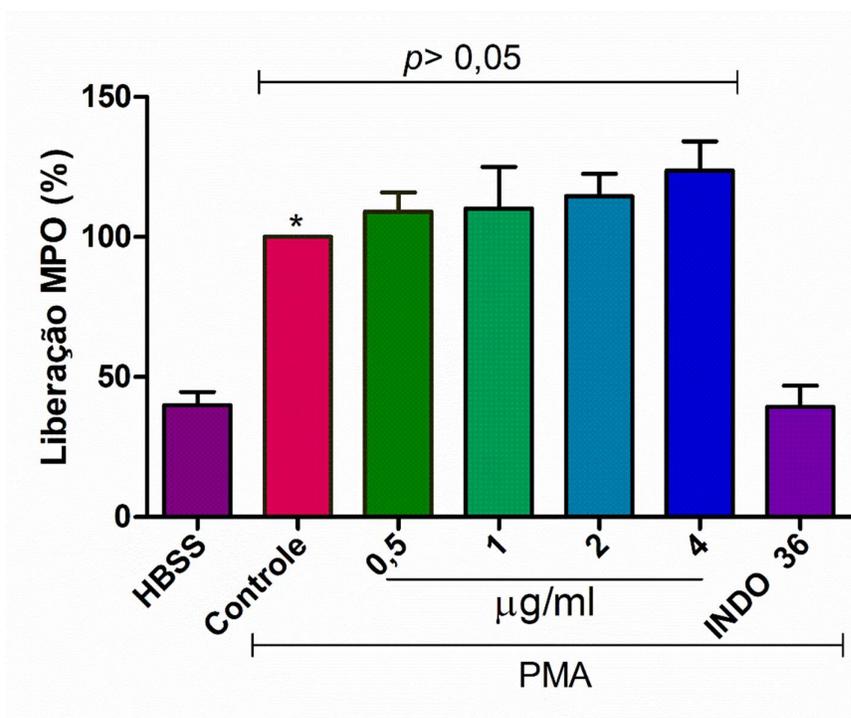
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foram avaliados em neutrófilos mantidos na ausência ou na presença de SVLa (0,5 - 4 $\mu\text{g/mL}$). Observe que o veneno não produziu mudanças significativas no ensaio, enquanto o triton X-100 a 0,2% (v / v) aumentou significativamente os valores experimentais. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M, ***, $p < 0,001$ - ANOVA e teste de Bonferroni vs HBSS.

5.5.4. Efeito do SVLa sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos humanos

A Figura 19 mostra que o tratamento de neutrófilos humanos com PMA aumentou os níveis de MPO de $39,4 \pm 2,3\%$ para $100,0 \pm 3,2\%$ ($p < 0,05$) adição do SVLa em concentrações crescentes (0,5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$) aos neutrófilos humanos não causou redução significativa da liberação de MPO, avaliada através do teste de MPO quando comparada ao grupo veículo (100% de liberação de MPO), dose maior demonstrou um leve aumento, no percentual de liberação que sugere um leve efeito pro-inflamatório que não foi estatisticamente significativo. Por outro lado, o INDO 36 e o HBSS apresentaram redução da liberação de MPO quando comparado ao grupo controle.

Figura 19. Efeito do SVLa na liberação de MPO em neutrófilos humanos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

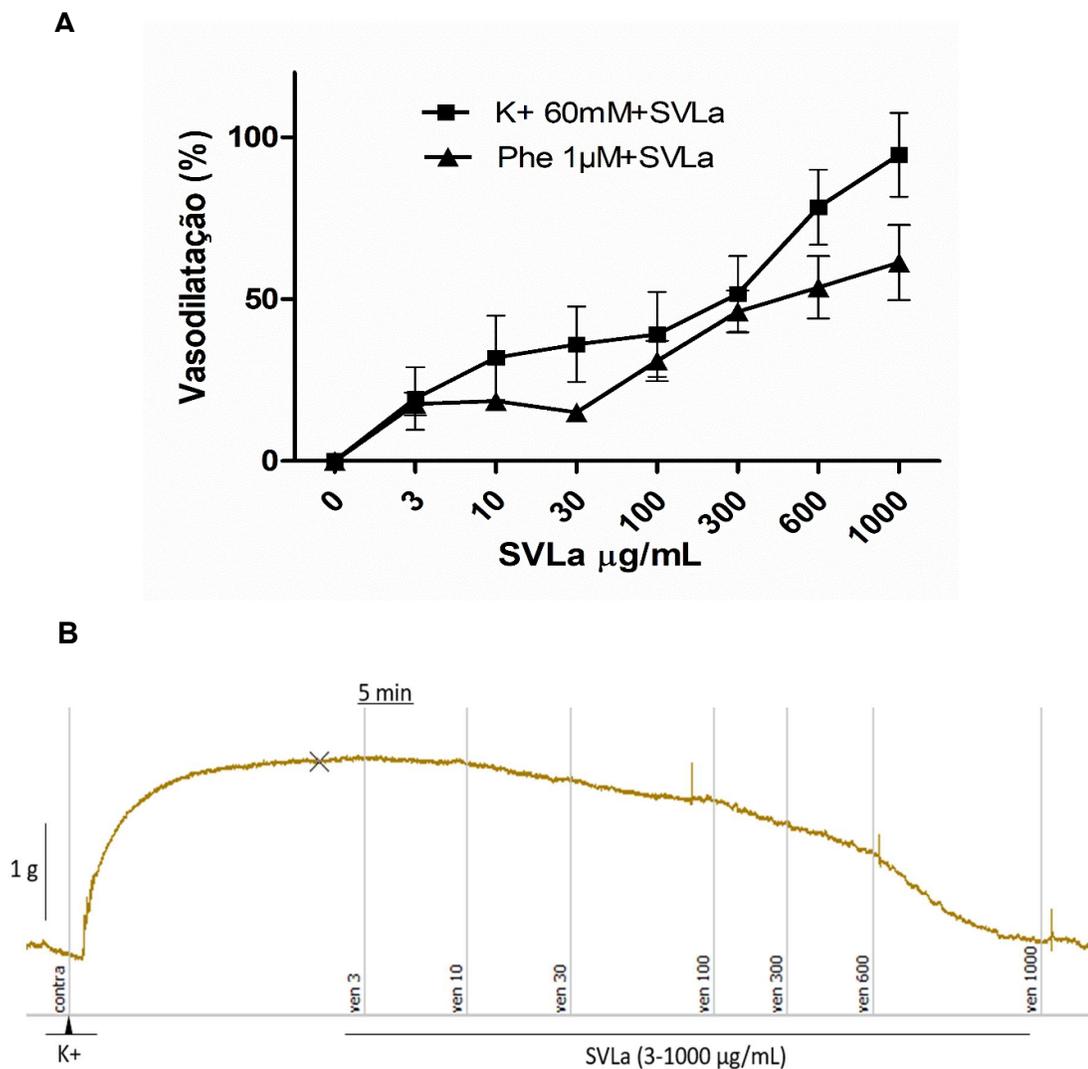
Os níveis de mieloperoxidase (MPO) aumentaram significativamente em neutrófilos submetidos à estimulação com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) em comparação com o controle. Observe que SVLa não alterou os níveis aumentados de MPO em comparação com o grupo controle. Por outro lado, 100 µM de indometacina (INDO) reduziram os níveis de MPO para valores que não diferiram do grupo controle. Os dados foram expressos em médias \pm S.E.M. *, $p < 0,05$, ANOVA e teste de Bonferroni.

5.6. Efeitos do SVLa em tecidos isolados

5.6.1. Efeitos vasorrelaxantes do SVLa em contrações induzidas por fenilefrina ou KCl em aorta isolada de rato.

Em anéis de aorta sem endotélio, concentrações crescentes de veneno de *L. acrochorda* (SVLa 1-1000 µg/mL) relaxaram de maneira dependente da concentração ($p < 0,001$, ANOVA) a contração sustentada induzida por KCl (60 mM) ou por fenilefrina (Phe, 1 µM) (Figura 20). Na maior concentração testada (1000 µg/mL), o relaxamento induzido por SVLa na contração em resposta ao KCl foi $94,6 \pm 12,9\%$ ($n = 5$), enquanto que na contração em resposta à Phe foi de $61,3 \pm 11,6\%$ ($n = 4$), valores sem diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA) entre si.

Figura 20. Efeito vasodilatador do SVLa (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) em aorta isolada de rato, pré-contrainda com K^+ ou Phe.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

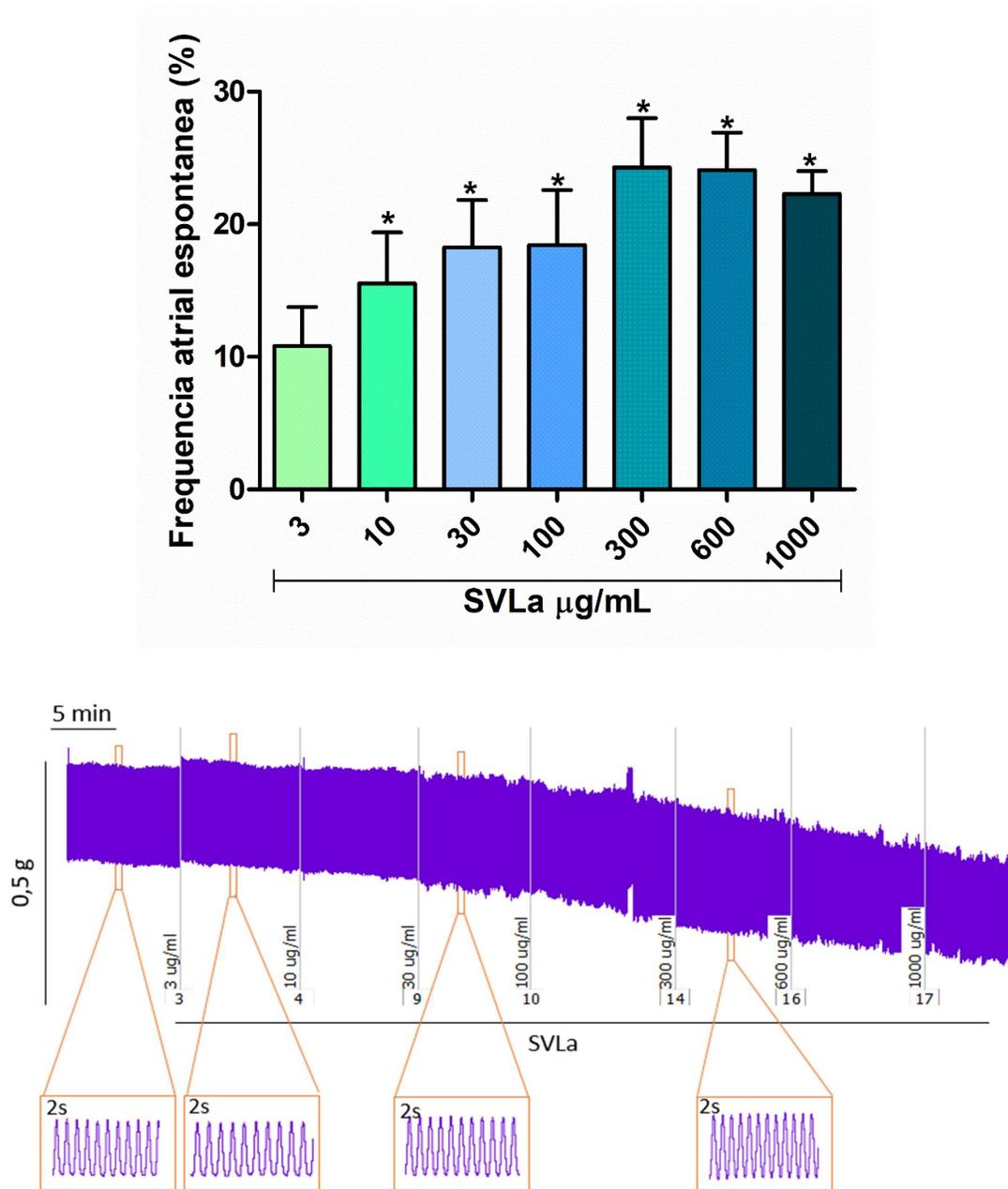
Gráfico mostrando valores médios dos efeitos de SVLa expressos em % do valor assintótico da contração induzida por fenilefrina (1 μM) ou KCl (60 mM) antes da adição de SVLa. Em A, gráfico com os valores médios do relaxamento induzido pela adição cumulativa de SVLa no estado estacionário de uma contração induzida por fenilefrina 1 μM ou KCl 60 mM. Um traço experimental típico de uma contração induzida por KCl com o efeito relaxante induzido por SVLa é mostrado no painel B. Os dados são médios \pm S.E.M. *, $p < 0,05$, ANOVA.

5.6.2. Efeito do SVLa na frequência em preparações de átrio direito isolado de rato.

Nas preparações de átrio direito isolado, a curva acumulativa de diferentes concentrações de veneno de *L. acrochorda* (SVLa 1-1000 $\mu\text{g/mL}$) produziu aumento na frequência das contrações espontâneas das preparações atriais quando da adição de SVLa. O

aumento foi evidente desde a primeira concentração com diferença estatística significativa ($p < 0,05$, ANOVA) desde a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Na concentração 300 $\mu\text{g/mL}$, o átrio teve uma máxima que permaneceu estável na dose de 600 300 $\mu\text{g/mL}$. Tudo isso baseado no valor controle interno obtido antes de administração do SVLa (Figura 21).

Figura 21: Efeito do SVLa (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) em músculo atrial direito de rato isolado.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

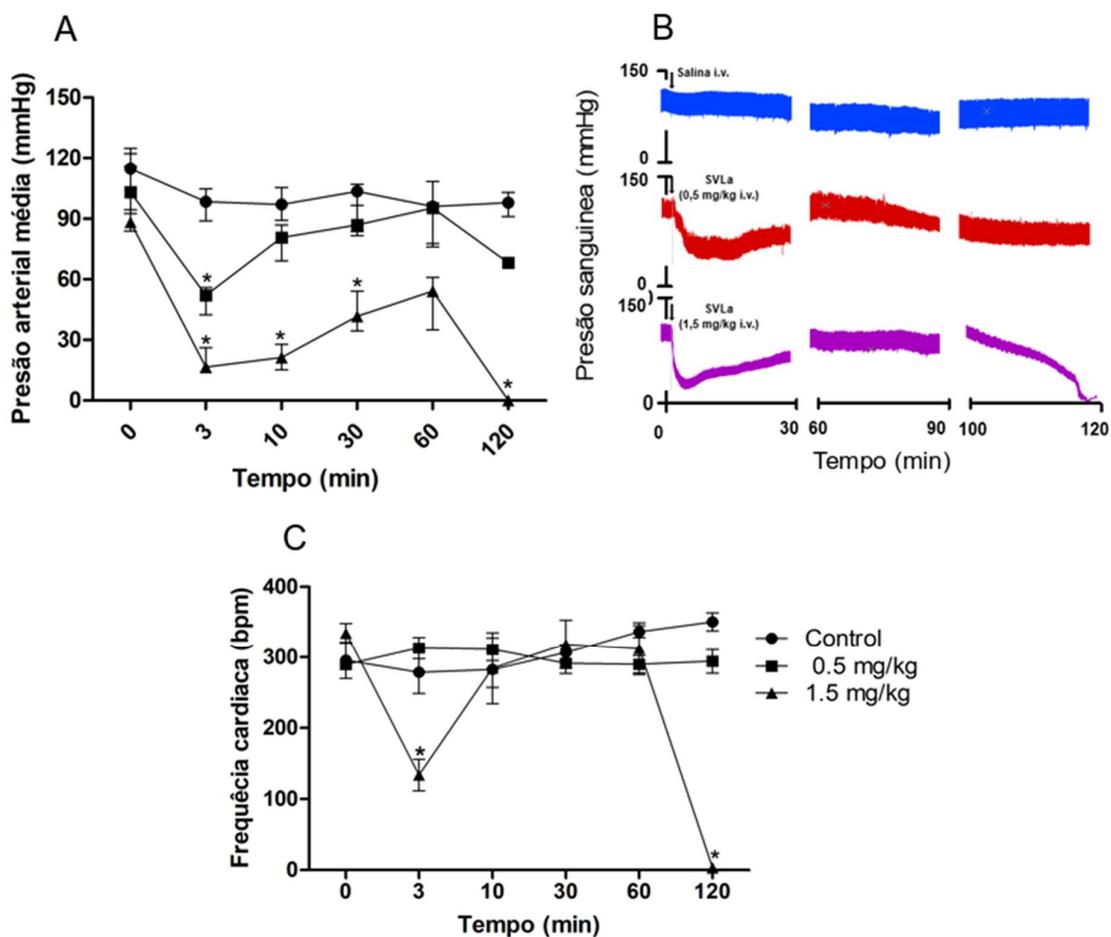
A imagem mostra a resposta do músculo atrial na exposição a SVLa. Em A, gráfico que mostra o efeito crescente induzido por SVLa (3 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) na frequência das contrações espontâneas registradas nas preparações do átrio direito. No painel B, observe que a magnitude das contrações não mudou, mas a frequência aumentou em resposta ao tratamento com SVLa. Os dados são médios \pm S.E.M. *, $p < 0,05$, ANOVA e teste de Dunnett.

5.8. Efeito do SVLa de ratos *in vivo*

5.8.1. Efeitos do SVLa na pressão arterial.

Para conhecer os efeitos causados pelo SVLa na pressão arterial em ratos, foram testadas duas doses (0,5 e 1,5 mg/kg, i.v.). A escolha das doses foi realizada tendo como referência as doses utilizadas para o estudo hemodinâmico realizado por outros autores com o veneno da serpente *Lachesis muta* do Brasil (DIAS et al., 2016). Na inoculação (i.v.) da dose 0,5 mg/kg, ocorreu hipotensão imediata (dentro de 1 min), que foi máxima dentro dos 3 primeiros minutos, mas recuperou 50% da queda inicial nos primeiros 10 min, retornando aos níveis pré-veneno no intervalo de 60 min após a injeção (Figura 22A). Esta recuperação foi seguida por uma tendência à diminuição da pressão arterial em fases posteriores. Na administração do SVLa (1,5 mg/kg, i.v.) resultou numa imediata hipotensão que foi máxima dentro dos primeiros 5 min, teve um retorno gradual (50 %) dentro dos 60 min, mas os animais posteriormente apresentaram uma diminuição total da pressão e morreram dentro dos 120 min (Figura 22A). Na dose de 0,5 mg/kg, i.v. não houve alterações significativas na frequência cardíaca durante todo o experimento em comparação com os valores de pré-veneno ou para os controles tratados com solução salina. Enquanto a dose de 1,5 mg/kg, i.v., teve uma queda nos primeiros 3 min com recuperação aos 60 min, seguida de uma queda fatal (Figura 22B). Com relação à frequência cardíaca, não foi alterada significativamente na dose de 0,5 mg/kg, i.v., mas na dose de 1,5 mg/kg, i.v. apresentou bradicardia, depois uma leve recuperação seguida de uma segunda queda que letal (Figura 22C). Em ratos injetados apenas com solução salina, não houve alterações significativas na pressão arterial ou na frequência cardíaca.

Figura 22: Efeito de SVLa na pressão sanguínea e na frequência cardíaca de ratos.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

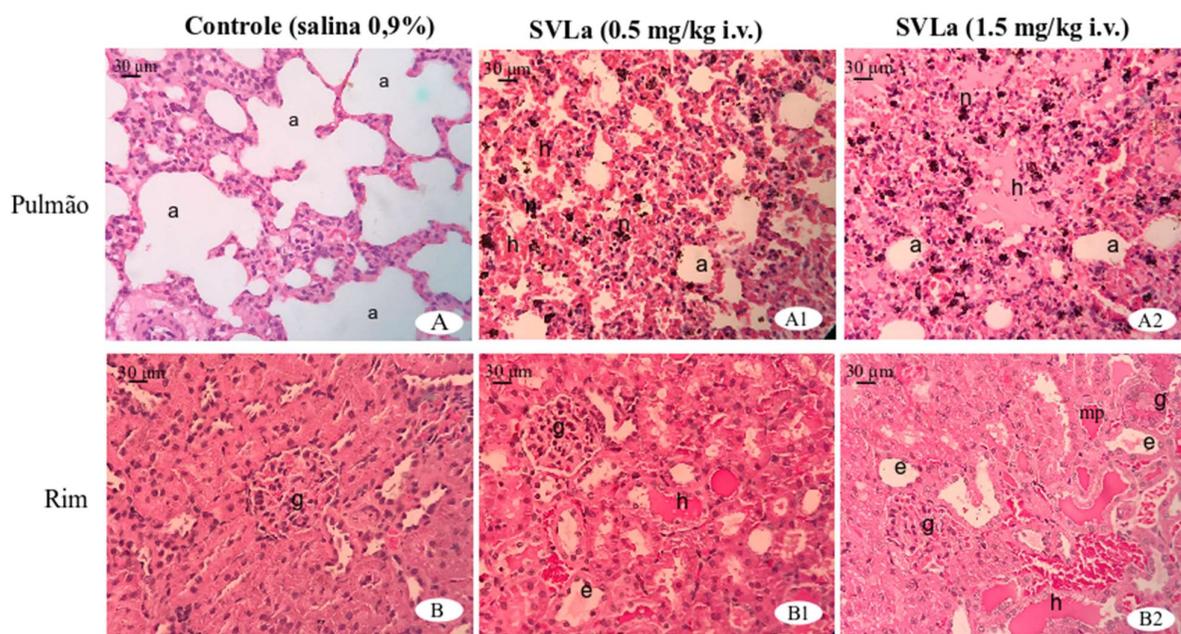
O gráfico mostra o comportamento da pressão sanguínea e da frequência cardíaca na injeção de SVLa. Em A, valores da pressão arterial média (PAM) medidos em diferentes tempos após o tratamento de ratos com SVLa (0,5 ou 1,5 mg / kg, i.v.). No painel A1, traços típicos obtidos a partir dos registros hemodinâmicos. Em B, valores da frequência cardíaca derivados de sinais de pulso de pressão. Em experimentos com SVLa (1,5 mg / kg), a queda na PAM e na FC aos 120 minutos indica que todos os animais morreram. *, $p < 0,05$, vs. valores de cada parâmetro antes da injeção do pós-teste SVLa, ANOVA e Bonferroni).

5.8.2. Análise histológica

A análise histológica mostrou que ratos submetidos à injeção intravenosa de SVLa (0,5 ou 1,5 mg / kg) apresentam dano em tecidos como rim e pulmão. Os animais tratados com SVLa 0,5 mg/kg apresentaram tecidos pulmonares com zonas de hemorragia intra-alveolar e sedimentação de eritrócitos, infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos (Figura 23A1). Os rins apresentaram estrutura glomerular preservada, mas com inchaço e

vacuolização acentuados do epitélio tubular, ductos dilatados contendo material eosinofílico luminal proteico, degeneração das células epiteliais tubulares, ectasia e pequenos focos de células inflamatórias Figura 23 B1). Os animais submetidos a 1,5 mg/kg de SVLa, além da acentuada hemorragia intra-alveolar, também apresentaram sinais de edema e infiltrado inflamatório neutrofilico difuso no tecido pulmonar (Figura 23 A2). Nos tecidos renais (Figura 23 B2), foram observados inchaço e vacuolização acentuados do epitélio tubular, ductos dilatados, acúmulo intratubular de material proteico, degeneração das células epiteliais, ectasia e focos de células inflamatórias.

Figura 23: Avaliação histológica dos efeitos causados por SVLa em pulmão e Rim.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

A imagem mostra os tecidos do pulmão (painéis A) e rim (painéis B) sob coloração com hematoxilina e eosina. Os ratos anestesiados foram injetados com SVLa (0,5 [painéis A1 e B1] ou 1,5 mg / kg [painéis A2 e B2], i.v.) ou veículo (solução salina a 0,9%, painéis A ou B). Hemorragia (h), infiltrado inflamatório (neutrófilos, n), ectasias (e) são destacados nas imagens. Alvéolos (a); Glomérulos (g). Acúmulo intratubular de material proteico (mp). Coloração com HE. Barras de escala: 30 µm em todos os painéis.

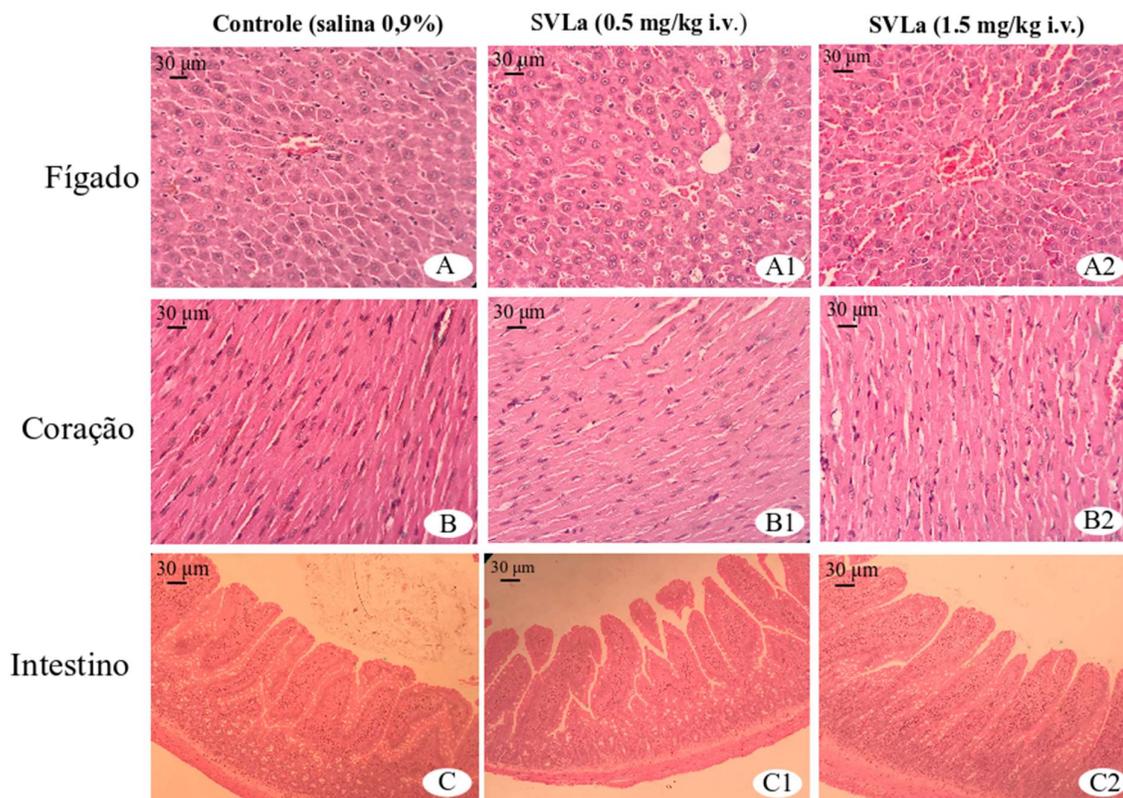
Por outro lado, a injeção de SVLa (0,5 ou 1,5 mg / kg) não revelaram lesões detectáveis ao microscópio em órgãos como fígado, intestino e coração. No fígado, os animais do grupo controle evidenciaram manutenção da arquitetura lobular com organização cordonal de hepatócitos e ausência de infiltrado inflamatório. Os espaços sinusoidais estavam

preservados, bem como a morfologia dos hepatócitos. Foram observados apenas raros focos de tumefação celular e vacuolização, porém sem sinais de toxicidade hepática (Figura 24A), enquanto aos animais tratados com 0,5 mg/Kg de SVLa mostraram manutenção da arquitetura lobular com organização cordonal de hepatócitos e ausência de infiltrado inflamatório. Os espaços sinusoidais estavam preservados, bem como a morfologia dos hepatócitos. Foram observados apenas pequenos focos de tumefação celular e vacuolização, porém sem sinais de toxicidade hepática (Figura 24 A1), e o mesmo aconteceu como os animais tratados com a dose de 1,5 mg/Kg de SVLa (Figura 24 A2), o que evidencia que o SVLa não está causando um dano direto no tecido hepático.

Enquanto a histologia do coração, o grupo controle tratado com solução salina 0,9%, evidenciou tecido cardíaco com preservação da arquitetura, presença de miócitos típicos, sem sinais de alterações nas fibras musculares cardíacas, ausência de focos inflamatórios, bem como cavidades cardíacas amplas e revestidas por endotélio típico. Observaram-se, ainda, múltiplos vasos sanguíneos (artérias e veias) demonstrando paredes e camadas sem alterações evidentes (Figura 24 B), e para os tratamentos com as doses de SVLa (0,5 e 1,5 mg/kg) também não apresentaram alterações nas fibras musculares cardíacas, lesões estruturais, ausência de focos inflamatórios com paredes e camadas sem alterações evidentes (Figura 24 B1 e B2).

Na histotologia intestinal os animais do grupo controle apresentaram a arquitetura intestinal, com presença de vilosidades preservadas, bem como as criptas intestinais. As camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa se apresentavam visíveis e sem alterações. Não foram observados focos inflamatórios, sinais de hemorragia, nem alterações do epitélio intestinal e células caliciformes (Figura 24 C). Enquanto aos animais dos grupos tratados com SVLa (0,5 e 1,5 mg/kg) também não apresentaram alterações na arquitetura intestinal, vilosidades preservadas, bem como as criptas intestinais. As camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa se apresentavam visíveis e sem alterações. Também não foram observados focos inflamatórios, sinais de hemorragia, nem alterações do epitélio intestinal e células (Figura 24 C1 e C2).

Figura 24: Avaliação histológica dos efeitos causados por SVLa em Fígado, coração e intestino.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Histologia do fígado, coração e intestino de ratos anestesiados e injetados com veneno de *L. acrochorda* (0,5 e 1,5 mg/kg, i.v.). A, B e C, os ratos de controle receberam solução salina a 0,9% isoladamente (100 ml). A1, B1 e C1, os ratos injetados com dose de SVLa de 0,5 mg/kg, i.v.. A2, B2 e C2, ratos injetados com dose de SVLa 1,5 mg/kg, i.v. os tecidos não apresentaram evidências de efeitos tóxicos causado pelo SVLa. Coloração com HE. Barras de escala: 30 mm em todos os painéis.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo reporta pela primeira vez, em condições experimentais, os efeitos causados pelo SVLa. Efeitos sanguíneos como coagulação e agregação plaquetária em sangue humano, assim como ausências da diminuição na viabilidade celular em plaquetas e neutrófilos humanos isolados, ao menos nas concentrações adotadas neste estudo. Em tecidos isolados, o SVLa teve efeitos vasodilatadores em doses altas e aumentos na frequência espontânea atrial. *In vivo*, após injeção intravascular foi evidenciada hipotensão e bradicardia, e histologicamente revelam-se especialmente danos hemorrágicos pulmonares e renais.

Alterações hemostáticas, como sangramento leve ao redor da mordida ou coagulação, estão entre os sintomas comuns relatados em virtude de acidentes com *Lachesis* (CASTRILLÓN-ESTRADA et al., 2007; MADRIGAL et al., 2012). No presente estudo, as alterações hemostáticas da resposta à SVLa foram evidenciadas *in vitro* pelos valores de TP e INR no sangue humano, métodos tradicionalmente adotados para avaliar a via extrínseca da coagulação (GOODMAN & GILMAN, 2011). Tais descobertas indicam que SVLa tem propriedades coagulantes, pelo menos nas condições aqui testadas. Esta atividade coagulante poderia estar relacionada com a presença de Serina proteases (KINI, 2005) presentes no SVLa reportadas por MADRIGAL et al., (2012) e evidências no estudo do perfil bioquímico deste veneno realizado neste estudo (Figura 7).

In vitro, SVLa revela-se como potente agregante plaquetário. Tal efeito foi observado com 0.5 µg/mL, concentração de SVLa menor que aquelas reportadas com o veneno de *Bothrops jararaca* que agregou plaquetas em concentrações entre 20 e 80 µg/mL (ANTUNES et al., 2010; DAVEY; LÜSCHER, 1965; ROSA et al., 2019). Inibidores de agregação plaquetária como AAS e clopidogrel reduziram a agregação em resposta ao SVLa, indicando que a ação agregante do veneno envolve participação de TXA₂ e ADP. Tais achados diferem o SVLa do veneno de *Bothrops colombiensis*, capaz de induzir agregação plaquetária em baixas concentrações (~0.2 ng/mL), efeito que não foi inibido por AAS ou clopidogrel (ARTEAGA-VIZCAÍNO et al., 2011). Nas plaquetas, enquanto o AAS inibe a síntese de TXA₂, metabólito que age em receptores próprios para induzir agregação (GOODMAN & GILMAN, 2011), clopidogrel é bloqueador do receptor de ADP, importante agregante em condições fisiológicas (FALCÃO et al., 2013). TXA₂ e ADP agem em sinergismo durante o processo de ativação de plaquetas (FALCÃO et al., 2013).

Distúrbios hemostáticos podem ser decorrentes da ação de enzimas proteolíticas como serino-proteases e metaloproteinases e análises proteômicas recentes mostram-nas presentes em venenos de crotalídeos e viperídeos (YAMASHITA et al., 2014). Neste estudo, reportamos que o inibidor irreversível de serino-protease AEBSF e o inibidor de metaloproteases Na₂-EDTA inibiram quase que totalmente a agregação plaquetária causada pelo SVLa. Achados na literatura onde agregação plaquetária induzida por veneno de *Lachesis muta* foi completamente abolida em plaquetas de coelho lavadas pelo fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF), um inibidor de SVSP e pelo Na₂-EDTA, um inibidor de SVMP (FRANCISCHETTI et al., 1998). Esses resultados evidenciam que tanto a SVSP como as SVMP contribuem para atividade agregante do SVLa. Vale ressaltar que estas proteínas já foram relatadas como constituintes do SVLa (MADRIGAL et al., 2012) e no perfil bioquímico realizado neste estudo. Por outro lado, SVMP e SVSP parecem não participar dos processos de agregação plaquetária e trombocitopenia observadas pelo veneno de *B. jararaca* (ROSA et al., 2019; YAMASHITA et al., 2014), devido a que nestes estudos os efeitos de agregação plaquetária causada pelo veneno, não foram inibidos quando as plaquetas foram previamente incubadas com inibidores tanto de SVMP como SVSP.

O ensaio do MTT em plaquetas mostrou que SVLa aumentou a absorbância de forma dependente da concentração, o que sugere aumento da redução do sal MTT em formazan. Resultado semelhante já foi relatado em células RAW 264,7 mantidas na presença de veneno do viperídeo *Bothropoides insularis* (MENEZES et al., 2016). Tradicionalmente adotado como medida da viabilidade celular, o resultado do ensaio do MTT nessas condições experimentais pode sugerir proliferação celular ou aumento da atividade metabólica em resposta ao veneno. Em plaquetas, elementos sanguíneos desprovidos de núcleo, a hipótese de aumento da atividade metabólica parece se relacionar bem ao efeito ativador induzido pelo SVLa, o qual resulta na formação do agregado de plaquetas. Tal hipótese é reforçada pelos resultados obtidos com neutrófilos quando não foram evidenciadas, na presença de SVLa, alterações da absorbância no ensaio com MTT. Também não foram alterados os níveis de LDH após tratamento com SVLa, descartando assim eventual dano da membrana celular para surgimento desses efeitos, pelo menos nas doses testadas. Tais achados destacam os efeitos do SVLa daqueles de outros venenos, como o da serpente *Bothrops leucurus*, citotóxico para plaquetas uma vez que reduz em até 90 % a viabilidade celular (BUSTILLO et al., 2015; FRANCISCHETTI et al., 1998).

Nos neutrófilos, SVLa não aumentou a ação do PMA na atividade da enzima MPO, que pode ser devido a que as células já estavam no ponto máximo de excitabilidade pela presença de PMA. Embora incapaz aumentar estimulação direta na atividade dos

neutrófilos *ex vivo*, no presente estudo observamos a presença de neutrófilos nos tecidos de animais inoculados por via intravenosa com SVLa, principalmente rins e pulmão. O recrutamento de neutrófilos pode ocorrer devido à resposta inflamatória no papel regenerativo dessas células nos tecidos danificados pelo veneno (TEXEIRA et al., 2003). O veneno de *Bothriopsis bilineata*, outro viperídeo, induziu inflamação e infiltração acentuada de neutrófilos associada ao envenenamento por *Bothrops* (PORTO et al., 2007). Semelhante ao efeito induzido por SVLa, o veneno de *B. bilineata* não afetou a viabilidade de neutrófilos *in vitro*, indicando baixa toxicidade de veneno nesse tipo de célula (SETUBAL et al., 2013).

Alterações cardiovasculares também foram avaliadas no presente estudo. Administrado por via endovenosa, SVLa induziu hipotensão prolongada, efeito que pode ser causado por resposta vasodilatadora. De fato, preparações isoladas de aorta de rato e doses altas relaxaram em resposta ao SVLa. Nestes experimentos, as preparações foram previamente contraídas por fenilefrina ou por alta concentração de KCl. Em comum, estes agentes contráteis aumentam as concentrações intracelulares de Ca^{2+} , a fenilefrina por ativar receptores α_1 adrenérgicos acoplados à proteína G (CONSOLINI; RAGONE, 2017; MARTÍNEZ-SALAS; IBARRA-BARAJAS; VILLALOBOS-MOLINA, 2010; RANG et al., 2016), KCl por despolarizar o potencial elétrico transmembrana (RATZ et al., 2005; WEBB, 2003). Como o efeito vasodilatador do SVLa revelou perfil semelhante para fenilefrina e KCl, é provável que sua ação seja inespecífica ou que interfira com o influxo de Ca^{2+} para a célula muscular lisa. De fato, bloqueio de canais de Ca^{2+} do tipo L por enzimas SVMs tem sido sugerido de forma independente da ação enzimática para produzir efeitos vasodilatadores contra esses agentes contráteis. Uma metaloproteinase de classe P-III isolada do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* causa essas propriedades em aorta de camundongo, resultando em potente efeito vasodilatador (ZHANG et al., 2009). De qualquer forma, o efeito hipotensivo causado pelo veneno parece não depender somente dos efeitos causados no músculo liso já que o efeito vasodilatador foi causado apenas em altas concentrações do SVLa, mas vale ressaltar que os experimentos com órgãos isolados foram realizados com aorta sem endotélio, o que não descarta a possibilidade de que o SVLa cause hipotensão pelo efeito vasodilatador.

A exposição ao SVLa induziu aumento na frequência de batimentos espontâneos em preparações isoladas de átrio direito de rato. Embora de pequena magnitude (~25%), o efeito acelerador *in vitro* foi significativo e parece não se relacionar com a bradicardia observada após administração endovenosa do SVLa. É possível que os efeitos sistêmicos do SVLa envolvam vias neurais parassimpáticas. De fato, indivíduos picados por serpentes do gênero *Lachesis* podem apresentar síndrome que envolve náusea, vômito, cólica abdominal, diarreia, sudorese, hipotensão, bradicardia e choque, possivelmente de origem autonômica

(JORGE MT et al., 1997). Em comparação a outros venenos, estudos reportam efeito bifásico para as serpentes *Vipera lebetina* (FATEHI-HASSANABAD; FATEHI, 2004), *Bothrops jararacussu* (RODRIGUES, 2010) e a *Cerastes vipera* (ALZAHABY et al., 1995). A exposição do átrio direito do rato ao veneno destas serpentes induziu aumento transitório, seguido por uma redução sustentada na amplitude e frequência das contrações espontâneas.

Nossos resultados também concordam com a literatura que reportam efeitos hipotensores em outras espécies de viperídeos como *L. muta* (DIAS et al., 2016), *B. jararacussu* (SIFUENTES et al., 2008), *B. atrox* (GLUSA; BRAUNS; STOCKER, 1991) que produzem uma redução rápida na pressão arterial. Mas também algumas espécies não apresentam hipotensão como *V. lebetina* (FATEHI-HASSANABAD; FATEHI, 2004) e *Lachesis muta stenophrys* (GRANADOS-ZÚÑIGA; ARAGÓN-ORTÍZ, 1998). Estas diferenças na resposta hipotensora dos venenos, pode estar influenciada por sua composição proteômica (DINIZ; OLIVEIRA, 1992; MARSH et al., 1997; PLA et al., 2013; SOARES et al., 2005; YARLEQUE et al., 1989) Especificamente pelas enzimas como fosfodiesterases, SVSP e fosfolipases A2 (PÉTERFI et al., 2019).

7. CONCLUSÃO

- A partir das evidências aqui apresentadas, pode-se concluir que o SVLa é capaz de, em condições experimentais, manifestar efeitos relacionados a muitos sintomas apresentados por vítimas de picadas de serpentes deste gênero como agregação plaquetária, coagulação, hipotensão e bradicardia.
- Dada a natureza complexa da composição química do SVLa, os efeitos dependentes da concentração de SVLa, são diversos e ocorrem em diferentes níveis celular, tecidual e sistêmico.
- Os efeitos podem ser observados em pequenas concentrações ou doses do SVLa, revelando considerável potência ao ser comparado com relatos na literatura acerca dos efeitos de venenos de outras espécies expostos a abordagens experimentais semelhantes.
- Parte dos efeitos aqui apresentados parece resultante da suposta presença de Fosfodiesterase, SVMPS e SVSPs, na composição do SVLa.

8. REFERÊNCIAS

- ABNISA, F. et al. How to get published. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2014.
- ALZAHABY, M. et al. Some pharmacological studies on the effects of Cerastes vipera (Sahara sand viper) snake venom. **Toxicon**, v. 33, n. 10, p. 1299–1311, out. 1995.
- ÁNGEL-CAMILO, K. L. **Determinación del efecto cardiotoxico sobre Rattus norvegicus cepa wistar causado por el veneno de Lachesis acrochorda (serpentes: viperidae)**. [s.l: s.n.].
- ANTUNES, T. C. et al. Comparative analysis of newborn and adult Bothrops jararaca snake venoms Thatiane. **Toxicon**, v. 56, p. 1443–1458, 2010.
- ARTEAGA-VIZCAÍNO, M. et al. Efecto del veneno total Bothrops colombiensis sobre la agregacion de plaquetas. **FCV-LUZ**, v. 21, p. 548–556, 2011.
- AYERBE, S.; LATORRE, J. **Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico**. Popayán: [s.n.].
- BARRET, K. E. et al. **Fisiología Médica de Ganong**. 24. ed. México: [s.n.].
- BENNETT, C. L. et al. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Associated With Ticlopidine in the Setting of Coronary Artery Stents and Stroke Prevention. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 21, p. 2524, 22 nov. 1999.
- BENVENUTI, L. A. et al. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after Bothrops jararacussu snakebite: a case report. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 331–334, set. 2003.
- BRITO, T. **Vasodilatação causada pelo 1-Nitro-2-feniletano em aorta de rato: provável estimulação da Guanilato ciclase**. [s.l.] Univerdade Federal do Ceará, 2012.
- BUSTILLO, S. et al. Phospholipase A2 enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 30–36, out. 2015.
- CARDOSO, J. L. C. et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. S87, dez. 2003.
- CASTRILLÓN-ESTRADA, D. F. et al. **Envenenamiento ofídico** Salud Uninorte, 2007.
- CONSOLINI, A. E.; RAGONE, M. I. Farmacodinamia del músculo liso vascular. In: EDULP (Ed.). **Farmacodinamia general e interacciones medicamentosas: mecanismos de acción de fármacos y metodologías de estudio experimental**. 1. ed. [s.l.] 2017, 2017. p. 103–112.
- CURI, RUI & PROCOPIO, J. Regulação da pressão arterial. In: **Fisiologia básica**. [s.l: s.n.]. p. 413–424.

DAVEY, M. G.; LÜSCHER, E. F. Actions of Some Coagulant Snake Venoms on Blood Platelet. **Nature**, v. 207, p. 730–732, 1965.

DE OLIVEIRA, D. G. L. et al. Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, n. 1, p. 21–29, 2009.

DIAS, L. et al. Hemodynamic responses to *Lachesis muta* (South American bushmaster) snake venom in anesthetized rats. **Toxicon**, v. 123, p. 1–14, 2016.

DINIZ, M. R. V.; OLIVEIRA, E. B. Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (bushmaster). **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 247–258, mar. 1992.

FALCÃO, F. J. DE A. et al. P2Y₁₂ Platelet Receptors: Importance in Percutaneous Coronary Intervention. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2013.

FATEHI-HASSANABAD, Z.; FATEHI, M. Characterisation of some pharmacological effects of the venom from *Vipera lebetina*. **Toxicon**, v. 43, n. 4, p. 385–391, mar. 2004.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. Bothrops sp. Snake Venoms: Comparison of Some Biochemical and Physicochemical Properties and Interference in Platelet Functions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119C, No., p. 21–29, 1998.

GLUSA, E.; BRAUNS, H.; STOCKER, K. Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* snake venom, on isolated pig coronary arteries. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 725–732, jan. 1991.

GOODMAN & GILMAN. las bases farmacológicas de la terapéutica. In: LAURENCE L. BRUNTON, P. (Ed.). 12. ed. Mexico: [s.n.]. p. 849.

GRANADOS-ZÚÑIGA, J.; ARAGÓN-ORTÍZ, F. [Cardiovascular alterations induced by the venom of *Lachesis muta* (serpentes: Viperidae) and its fibrinogenolytic enzyme]. **Revista de biología tropical**, v. 46, n. 4, p. 1149–57, dez. 1998.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. **Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach** **Toxicon**, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Correction: Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17079, 2017a.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Correction: Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17079, 5 dez. 2017b.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Guyton & Hall Tratado de Fisiología Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

HILL-EUBANKS, D. C.; PARKER, C. G.; LOLLAR, P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 17, p. 6508–6512, set. 1989.

JORGE MT et al. Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 545–554, abr. 1997.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2 \beta 1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemical Journal**, v. 320, n. 2, p. 635–641, 1 dez. 1996.

KAPLAN, M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 12, p. 691–699, 27 dez. 2011.

KUSUMOTO, F. **Fisiopatología cardiovascular**. 1ª ed. São Paulo: [s.n.].

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

MADRIGAL, M. et al. Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. **Journal of proteomics**, v. 77, p. 280–97, 21 dez. 2012.

MARSH, N. et al. The Gaboon viper, *Bitis gabonica*: Hemorrhagic, metabolic, cardiovascular and clinical effects of the venom. **Life Sciences**, v. 61, n. 8, p. 763–769, jul. 1997.

MARTÍNEZ-SALAS, S. G.; IBARRA-BARAJAS, M.; VILLALOBOS-MOLINA, C. R. Farmacogenética de los receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos: un largo camino por recorrer. **Rev Sanid Milit Mex**, v. 64, n. 4, p. 184–191, 2010.

MENEZES, R. R. P. P. B. DE et al. Involvement of Nitric Oxide on *Bothropoides insularis* Venom Biological Effects on Murine Macrophages In Vitro. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151029, 14 mar. 2016.

MORA-OBANDO, D. et al. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbeii* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. **Journal of Proteomics**, v. 96, p. 159–172, jan. 2014.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 307–310, nov. 1981.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

NICOLAU, C. A. et al. An in-depth snake venom proteopectidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 214–231, jan. 2017.

OTERO, R. et al. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989 - febrero de 1990). **Acta Médica Colombiana**, v. 17, p. 21, 1992.

- PÉTERFI, O. et al. Hypotensive Snake Venom Components—A Mini-Review. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2778, 31 jul. 2019.
- PLA, D. et al. Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*. **Journal of proteomics**, v. 89, p. 112–23, 26 ago. 2013.
- PORTO, B. N. et al. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 270–277, ago. 2007.
- RANG, H. P. et al. Farmacologia. In: ELSEVIER (Ed.). **Farmacologia**. 8. ed. [s.l: s.n.]. p. 265–284.
- RATZ, P. H. et al. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C769–C783, abr. 2005.
- RODRIGUES, M. A. P. **Toxicidade da peçonha de *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) e bothropstoxina em atrio isolado de rato**, 2010.
- ROSA, J. G. et al. Comparative study of platelet aggregation and secretion induced by *Bothrops jararaca* snake venom and thrombin. **Toxicon**, v. 159, p. 50–60, 2019.
- SCHMAIER, A. H.; COLMAN, R. W. Crotalocytin: Characterization of the Timber Rattlesnake Platelet Activating Protein. **Blood**, v. 56, p. 1020–1028, 1980.
- SENISE, L. V; YAMASHITA, K. M.; SANTORO, M. L. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 11, p. 1528–1536, 16 nov. 2015.
- SERRANO, S. M. T. et al. Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of a Serine Proteinase, PA-B J, with Platelet-Aggregating Activity from the Venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, p. 7186–7193, 1995.
- SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom—II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 483–492, abr. 1993.
- SETUBAL, S. DA S. et al. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. **Toxicon**, v. 76, p. 143–149, dez. 2013.
- SIFUENTES, D. N. et al. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 28–36, 2008.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 150, p. 76–85, 1985.

SOARES, M. R. et al. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 1, p. 31–38, jul. 2005.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of Physiology**, v. 522, n. 2, p. 177–185, jan. 2000.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 1, p. 164–176, jan. 2012.

WALTEROS, D.; PAREDES, A. Vigilancia y Analisis del Riesgo en Salud Pública Protocolo de Vigilancia en Salud Pública ACCIDENTE OFIDICO. p. 1–29, 2014.

WEBB, R. C. SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 201–206, dez. 2003a.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 201–206, dez. 2003b.

XU, X. R. et al. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 53, n. 6, p. 409–430, 22 nov. 2016.

YAMASHITA, K. M. et al. Bothrops jararaca Venom Metalloproteinases Are Essential for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2814, 15 maio 2014.

YARLEQUE, A. et al. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). **Toxicon**, v. 27, n. 11, p. 1189–1197, jan. 1989.

ZHANG, P. et al. Stejnihagin, a novel snake metalloproteinase from *Trimeresurus stejnegeri* venom, inhibited L-type Ca²⁺ channels. **Toxicon**, v. 53, n. 2, p. 309–315, fev. 2009.

Anexo 1



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Determinação in vitro dos efeitos cardiovasculares causados pelo veneno de *Lachesis acrochorda*", protocolada sob o CEUA nº 9555140618 (ID 000403), sob a responsabilidade de **Pedro Jorge Caldas Magalhães e equipe; Alexandre Havt Bindá ; Jimmy Alexander Guerrero Vargas; Karen Leonor Angel Camilo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 22/08/2018.

We certify that the proposal "In vitro characterization from cardiovascular effects caused by *Lachesis acrochorda* venom", utilizing 80 Heterogenics rats (80 males), protocol number CEUA 9555140618 (ID 000403), under the responsibility of **Pedro Jorge Caldas Magalhães and team; Alexandre Havt Bindá ; Jimmy Alexander Guerrero Vargas; Karen Leonor Angel Camilo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 08/22/2018.

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

Vigência da Proposta: de **07/2018** a **07/2019**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 12 semanas**

N: **80**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso**

Fortaleza, 02 de outubro de 2018

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXO 2

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de efeitos Bioquímicos e celulares em elementos figurados do sangue causados pelo veneno da Lachesis acrochorda

Pesquisador: KAREN ANGEL

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11590519.7.1001.5054

Instituição Proponente: Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.355.242

Apresentação do Projeto:

O ofidismo é um problema de saúde pública que tem sido mal dimensionado, pois a vigilância epidemiológica, a produção de antivenenos, o conhecimento sobre prevenção, tratamento e manejo em casos de ofidismo são limitados, o que torna o acidente ofídico um risco para a sociedade, especialmente para a população que está nas áreas rurais, sendo estas as vítimas mais vulneráveis (GUTIÉRREZ et al., 2010). para esta pesquisa, serão necessárias amostras de sangue humano rico em neutrófilos, que serão obtidas do subproduto de sangue humano cedido pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE (buffycoat) e as amostras para as provas de agregação plaquetária de pessoas voluntárias com assinatura prévia do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O estudo será baseado em análise estatística dos resultados obtidos para cada um dos testes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliação dos efeitos Bioquímicos e celulares em elementos figurados do sangue causados pelo veneno de L. acrochorda.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a citotoxicidade in vitro do veneno de L. acrochorda sobre neutrófilos humanos.
- Determinar o efeito do veneno de L. acrochorda sobre a degranulação dos neutrófilos ativados

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

Continuação do Parecer: 3.355.242

pelo análogo do diacilglicerol forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), através da mensuração da enzima mieloperoxidase.

- Avaliar o efeito do veneno de *L. acrochorda* sobre a atividade catalítica da enzima mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos ativados por PMA.
- Analisar o efeito do veneno de *L. acrochorda* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos, empregando a técnica de quimioluminescência.
- Estabelecer o efeito do veneno de *L. acrochorda* na agregação plaquetária do sangue humano utilizando diferentes fármacos com efeitos conhecidos para identificar o possível mecanismo de ação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Benefícios:

- Melhorar o tratamento do envenenamento causado pela mordida de *L. acrochorda*.
- Conhecer os mecanismos de ação do veneno de *L. acrochorda* no sangue para conseguir melhorar o tratamento do acidente.
- Aumentar o conhecimento cientista relacionado com os efeitos causados pelo veneno de serpente.
- Identificação de possíveis efeitos farmacológicos do veneno de *L. acrochorda*.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Proposta relevante que poderá contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas no manejo ambulatorial do ofidismo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram devidamente anexados.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1298934.pdf	13/05/2019 11:58:18		Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Continuação do Parecer: 3.355.242

Cronograma	CRONOGRAMA_ATUALIZADO.pdf	13/05/2019 11:55:59	KAREN ANGEL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ATUALIZADO.pdf	13/05/2019 11:53:23	KAREN ANGEL	Aceito
Outros	OFICIO_ENCAMINHAMENTO.pdf	20/03/2019 12:03:36	KAREN ANGEL	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_NOVA.pdf	20/03/2019 11:56:33	KAREN ANGEL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORI_LAB_PROFE_HELENA.pdf	20/02/2019 14:07:34	KAREN ANGEL	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	TERMO_FIEL_DEPOSITARIO.pdf	14/02/2019 18:34:59	KAREN ANGEL	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DOS_INVESTIGADOR_ES.pdf	14/02/2019 18:30:15	KAREN ANGEL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PLATAFORMA_KAREN.pdf	14/02/2019 18:24:58	KAREN ANGEL	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_DO_PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	14/02/2019 18:17:16	KAREN ANGEL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORRIZACAO_DO_ENSINO_DE_PESQUISA.pdf	14/02/2019 18:16:54	KAREN ANGEL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_DO_CHEFE_DE_SERVICIO.pdf	14/02/2019 18:16:32	KAREN ANGEL	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 29 de Maio de 2019

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000