

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PEDRO SANTOS COSTA

Efeitos da peçonha de *Bothrops jararacussu* em eritrócitos humanos

Uberlândia, MG

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PEDRO SANTOS COSTA

Efeitos da peçonha de *Bothrops jararacussu* em eritrócitos humanos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito final para
obtenção do grau de bacharel em biotecnologia

Orientador: Nilson Penha-Silva

Coorientador: Lucas Moreira Cunha

Uberlândia, MG

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PEDRO SANTOS COSTA

Efeitos da peçonha de *Bothrops jararacussu* em eritrócitos humanos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito final para
obtenção do grau de bacharel em biotecnologia

Uberlândia, 11 de setembro de 2025

Banca Examinadora:

Lucas Moreira Cunha, Doutor (UFU)

Dayane Cristine Silva, Mestre (UFU)

Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, Doutora (UFU)

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha mãe e meus avós, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado durante toda a minha trajetória, e também aos meus amigos, pelo incentivo durante essa caminhada.

Agradeço ao Prof. Dr. Nilson Penha-Silva pela disponibilidade, por todo o conhecimento e pela oportunidade de desenvolver não apenas este trabalho, mas também pela contribuição para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço à Doutoranda Dayane Cristine Silva e ao Dr. Lucas Moreira Cunha, pelo auxílio e orientação desde o início do projeto.

Agradeço à Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, não apenas por ter cedido gentilmente as peçonhas utilizadas neste trabalho, mas também por todas as orientações realizadas durante o período do desenvolvimento.

Agradeço à Dra. Tamires dos Santos Paschoal pelo auxílio com a obtenção das amostras de sangue de descarte que foram utilizadas durante os experimentos, sem as quais não teria sido possível realizar este trabalho.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) por disponibilizarem a utilização da leitora de placa para realização deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: Os eritrócitos, que têm uma forma discoidal, são envolvidos por uma membrana constituída por uma bicamada lipídica formada por fosfolipídeos – os quais incluem fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina – além de diferentes proteínas. Ademais, a membrana dos eritrócitos também é maleável, o que facilita a sua movimentação sob certas localidades, como nos capilares, onde há o estreitamento dos vasos sanguíneos. Essas características distintas, juntamente com o fato de que essas células não apresentam organelas citoplasmáticas, tornam os eritrócitos modelos interessantes para se estudar os efeitos de certas substâncias sobre a bicamada lipídica. Dentre estas substâncias pode-se citar as peçonhas ofídicas, uma vez que elas são caracterizadas por muitas enzimas, como a fosfolipase A₂ (PLA₂), que catalisa a quebra de fosfolipídeos, sobretudo fosfatidilcolina (lecitina), levando a uma desestabilização da membrana eritrocitária, o que, posteriormente, promove o aumento da fragilidade osmótica e, conseqüentemente, a lise celular. **Objetivo:** Dessa forma, o objetivo desse estudo foi analisar o efeito da peçonha de uma das serpentes brasileiras mais importantes, a *Bothrops jararacussu*, sobre a fragilidade osmótica e a estrutura da membrana dos eritrócitos. **Métodos:** Para tal, foram feitos testes em diferentes concentrações de NaCl e da peçonha bruta da *Bothrops jararacussu*. Adicionalmente, foi realizada também a coloração de Wright para investigar o efeito da peçonha sobre a morfologia da membrana eritrocitária. **Resultados:** A partir desses testes foi possível constatar que a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* não é capaz, quando sozinha, de causar um aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos, porém na presença de gema de ovo, uma fonte de glicerofosfolipídeos exógenos, observa-se um aumento de fragilidade osmótica. Assim, o tratamento com a peçonha bruta em conjunto com a gema de ovo levou a uma mudança da forma normal de disco bicôncavo dos eritrócitos para uma forma equinocítica, caracterizada por espinhos regularmente espaçados em sua superfície. Essa mudança parece estar associada à formação de lisolecitina a partir da ação da PLA₂ sobre a lecitina. **Conclusão:** Diante desses resultados, pode-se verificar que, embora a peçonha bruta, quando sozinha, não seja capaz de causar diretamente um aumento na instabilidade da membrana eritrocitária, esse fenômeno pode aparecer quando concentrações de glicerofosfolipídeos estão aumentadas.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*; Eritrócitos; Fosfolipase A₂; Fragilidade osmótica; Peçonha bruta

ABSTRACT

Introduction: Erythrocytes, which have a discoidal shape, are surrounded by a membrane consisting of a lipid bilayer formed by phospholipids – such as phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and sphingomyelin – and many proteins. Furthermore, the erythrocyte membrane is also malleable, which facilitates its movement in specific locations, such as capillaries, where blood vessels are narrowed. These distinct characteristics, together with the fact that these cells lack cytoplasmic organelles, make erythrocytes an enjoyable model for studying the effects of certain substances on the lipid bilayer. Among these substances, snake venoms are characterized by many enzymes, including phospholipase A₂ (PLA₂), which catalyzes the cleavage of phospholipids, particularly phosphatidylcholine (lecithin). This leads to destabilization of the erythrocyte membrane, which subsequently promotes increased osmotic fragility and, consequently, cell lysis.

Objective: Therefore, this study aimed to analyze the effect of the venom of one of the most important Brazilian snakes, *Bothrops jararacussu*, on osmotic fragility and erythrocyte membrane structure. **Methods:** Tests were performed using different concentrations of NaCl and crude *Bothrops jararacussu* venom. Wright staining was also performed to investigate the effect of venom on erythrocyte membrane morphology. **Results:** These tests demonstrated that crude *Bothrops jararacussu* venom alone does not increase erythrocyte osmotic fragility. However, in the presence of egg yolk, a source of exogenous glycerophospholipids, increased osmotic fragility was observed. Thus, treatment with crude venom combined with egg yolk led to a change in the standard biconcave disc shape of erythrocytes to an echinocyte shape, characterized by regularly spaced spines on their surface. This change appears to be associated with the formation of lysolecithin from the action of PLA₂ on lecithin. **Conclusion:** Given these results, it can be seen that, although raw venom, when alone, is not capable of directly causing an increase in erythrocyte membrane instability, this phenomenon can appear when concentrations of glycerophospholipids are increased.

Keywords: *Bothrops jararacussu*; Crude venom; Erythrocytes; Osmotic fragility; Phospholipase A₂.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do processo de eritropoiese.....	5
Figura 2 - Mecanismos de ativação da via de eritose.	7
Figura 3 - Representação esquemática da ação da PLA2.....	11
Figura 4 - Representação do gráfico obtido através da equação de Boltzmann.....	12
Figura 5 - Representação da estabilidade da membrana eritrocitária frente a diferentes concentrações de NaCl.	14
Figura 6 - Teste direto de fragilidade osmótica, ou seja, na ausência de gema de ovo, em eritrócitos presentes no sangue total.	21
Figura 7 - Teste direto de fragilidade osmótica, ou seja, na ausência de gema de ovo, em eritrócitos isolados	21
Figura 8 - Teste indireto de fragilidade osmótica, ou seja, na presença de gema de ovo, em eritrócitos presentes no sangue total	23
Figura 9 - Teste indireto de fragilidade osmótica, ou seja, na presença de gema de ovo, em eritrócitos isolados	24
Figura 10 - Influência da concentração da gema de ovo sobre a lise de eritrócitos	26
Figura 11 - Influência da concentração da peçonha bruta de Bothrops jararacussu sobre a lise de eritrócitos em sangue total na ausência e na presença de gema de ovo	27
Figura 12 - Influência do tempo na ação da peçonha bruta de Bothrops Jararacussu sobre sangue, tanto na ausência como na presença de gema de ovo.....	28
Figura 13 - Imagens de microscopia óptica obtidas após a coloração pelo método de Wright.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais componentes das peçonhas das famílias <i>Viperidae</i> e <i>Elapidae</i>	8
Tabela 2 - Número de acidentes ofídicos referentes ao ano de 2023.....	9
Tabela 3. Concentrações utilizadas para avaliação da influência da concentração da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> sobre a lise de eritrócitos	18
Tabela 4. Diferentes diluições do substrato fosfolipídico (gema de ovo)	19
Tabela 5. Parâmetros do teste de fragilidade osmótica obtidos através dos testes diretos, ou seja, na ausência de gema de ovo	22
Tabela 6. Parâmetros do teste de fragilidade osmótica obtidos através dos testes indiretos, ou seja, na presença de gema de ovo.	24

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão bibliográfica.....	1
1.1.1 Estrutura celular	1
1.1.2 Características da membrana plasmática	1
1.1.3 Eritrócitos	3
1.1.3.1 Origem e desenvolvimento dos eritrócitos	4
1.1.3.2 Membrana celular de eritrócitos.....	5
1.1.3.3 Deformação e lise de eritrócitos.....	6
1.1.4 Peçonhas ofídicas e fragilidade de membrana de eritrócitos.....	8
1.1.5 <i>Bothrops jararacussu</i>	11
1.1.6 Teste de fragilidade osmótica	12
1.1.6 Relação eritrócito-peçonha	14
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4. METODOLOGIA	16
4.1 Coleta das amostras de sangue.....	16
4.2 Preparo das soluções de peçonha bruta	16
4.3 Lavagem dos eritrócitos	16
4.4 Teste de fragilidade osmótica	16
4.5 Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford.....	17
4.6 Influência da concentração da peçonha bruta sobre a lise de eritrócitos.....	17
4.7 Influência da concentração de gema de ovo sobre a lise de eritrócitos.....	18
4.8 Influência do tempo no efeito da peçonha de <i>Bothrops Jararacussu</i> sobre o sangue total e eritrócitos lavados	19
4.9 Coloração de eritrócitos pelo método de Wright	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Fragilidade osmótica	20
5.2 Influência da concentração da gema de ovo sobre a lise de eritrócitos pela peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>	25
5.3 Influência da concentração da peçonha bruta de <i>Bothrops jararacussu</i> sobre a lise de eritrócitos.....	26

5.4 Influência do tempo no efeito da peçonha de <i>Bothrops Jararacussu</i> sobre o sangue total e eritrócitos lavados	27
5.5 Coloração de eritrócitos pelo método de Wright	28
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Estrutura celular

As células, unidades básicas dos organismos vivos, são essenciais para a manutenção de sua homeostase estrutural e funcional. Em humanos, existem cerca de 36 trilhões de células, que se distinguem não apenas por sua estrutura, mas também por suas diferentes funcionalidades (HATTON; GALBRAITH; MERLEAU; MIETTINEN *et al.*, 2023). Apesar de existir grandes diferenças entre essas unidades básicas, pode-se notar que elas apresentam, na maioria dos casos, algumas estruturas em comum, como núcleo, citoplasma e membrana plasmática, as quais são essenciais para manter a viabilidade celular.

Embora todos estes componentes sejam essenciais para a célula desempenhar o seu papel, a membrana plasmática se destaca como uma estrutura fundamental para a sobrevivência celular. De modo geral, essa estrutura é formada por uma bicamada lipídica fluida, na qual se encontram diversas moléculas que desempenham funções essenciais. Essa bicamada separa e delimita o espaço intracelular, impedindo o contato direto entre os componentes celulares internos e o meio circundante (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; MORGAN *et al.*, 2017). Apesar dessa delimitação, é necessário que alguns componentes consigam atravessar esta barreira, já que esses são importantes para o desempenho de certas atividades e, para isto, a membrana dispõe de certos mecanismos de transporte. Dentre esses mecanismos, podemos citar o transporte passivo, no qual moléculas de pequeno tamanho atravessam a membrana plasmática sem o gasto de energia e de acordo com o gradiente de concentração (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2019). Além disso, é possível que as moléculas atravessem a bicamada por meio do chamado transporte ativo, o qual ocorre com o auxílio de transportadores proteicos, havendo não só a necessidade do gasto de energia, mas também a existência de um transporte contra um gradiente de concentração (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2019).

1.1.2 Características da membrana plasmática

Em relação à sua composição, a membrana plasmática contém fosfolípidos, colesterol, proteínas e carboidratos, os quais desempenham funções distintas e essenciais para a sobrevivência celular. Os lípidos representam a maior parte da bicamada, uma vez que a estrutura base da membrana celular é formada, primordialmente, por glicerofosfolípidos e

esfingolipídeos, que são moléculas anfipáticas, ou seja, apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Essa característica permite que as células formem uma bicamada, na qual a parte interna é altamente hidrofóbica, o que dificulta a passagem de moléculas mais polares (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; MORGAN *et al.*, 2017).

Além disso, os lipídios também são essenciais não só para o reparo, mas também para a modulação da conformação e rigidez da bicamada (HORN; JAISWAL, 2019; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023). O influxo de cálcio originário da região extracelular, por exemplo, ativa vias de sinalização necessárias para o reparo da membrana, uma vez que promove mudanças estruturais nos lipídeos que, quando descontroladas, podem gerar quadros patogênicos (HORN; JAISWAL, 2019).

Assim como os lipídeos, as proteínas também desempenham funções celulares importantes, já que elas estão relacionadas não só com a formação de canais iônicos, mas também com as reações enzimáticas e a comunicação da célula com a região extracelular (JELOKHANI-NIARAKI, 2022). De modo geral, as proteínas presentes na membrana plasmática das células podem apresentar diferentes disposições, uma vez que elas podem estar localizadas de modo integral, como também de modo periférico. Enquanto as proteínas integrais apresentam domínios transmembranares (únicos ou múltiplos), as proteínas periféricas não atravessam completamente a membrana, uma vez que elas estão associadas a uma das duas camadas através da ligação a proteínas integrais ou aos lipídeos presentes na bicamada (TAN; TAN; CHUNG, 2008).

A porção proteica presente na membrana plasmática das células pode formar canais iônicos, estruturas fundamentais para o processo de sinalização, especialmente nas células do sistema nervoso, que dependem do fluxo de íons para liberar certos tipos de neurotransmissores. Ademais, a porção proteica da membrana plasmática das células é um alvo importante para a ligação de fármacos, como o grupo de proteínas G acopladas a receptores (COURNIA; ALLEN; ANDRICIOAEI; ANTONNY *et al.*, 2015; TAN; TAN; CHUNG, 2008).

Em adição, os carboidratos também são estruturas importantes presentes na membrana plasmática das células. Eles são encontrados em regiões denominadas glicocálix, onde se ligam tanto a proteínas quanto a lipídeos, formando, respectivamente, as glicoproteínas e os glicolipídeos (SPROVIERI; MARTINO, 2018). Os carboidratos são conjugados a proteínas por meio não só de grupos hidroxila, mas também de grupos serina, treonina, ou ainda de grupos amida de resíduos de asparagina. Além disso, eles desempenham funções importantes de adesão e reconhecimento celular, sendo essenciais para o correto funcionamento das células

do sistema imune (NELSON; COX, 2021). Os glicolipídeos, por outro lado, são caracterizados pela presença de uma porção lipídica ligada a um carboidrato. Esses compostos são responsáveis por diversas funções, como o reconhecimento e a sinalização celular, uma vez que podem funcionar como receptores ou ligantes que permitem a ativação de rotas de sinalização voltadas ao crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (CURATOLO, 1987; NELSON; COX, 2021).

Por fim, tem-se o colesterol, que é uma molécula sintetizada dentro do retículo endoplasmático através de vários processos enzimáticos. Após a sua síntese, ele é transportado até a membrana plasmática das células, onde irá desempenhar sua função (YANG; KREUTZBERGER; LEE; KIESSLING *et al.*, 2016). De modo geral, o colesterol presente na membrana plasmática das células exerce funções essenciais, uma vez que é o principal responsável por não só regular, mas também manter a integridade da bicamada (ZHANG; LI; WU; WANG *et al.*, 2019).

A maioria das células compartilha destas mesmas estruturas, porém a proporção destes componentes varia de acordo com sua função, como o que ocorre com os neurônios, que contêm uma maior quantidade de canais iônicos devido à alta taxa de transmissão de impulsos nervosos, os quais são mediados pela entrada e saída de íons específicos (LOVINGER, 2008; SHENG; WYSZYNSKI, 1997). Em eritrócitos, a membrana plasmática precisa ser deformável para passar por estreitos capilares para realizar as trocas gasosas (MOHANDAS; GALLAGHER, 2008). Suas peculiaridades tornam os eritrócitos modelos ideais para a compreensão da estrutura e estabilidade da membrana plasmática. Portanto, estudar a integridade das membranas dos eritrócitos é fundamental, já que a descontinuidade na bicamada dessas células representa a perda de sua função.

1.1.3 Eritrócitos

Os eritrócitos são primariamente responsáveis pelo transporte de oxigênio e dióxido de carbono na circulação sanguínea (KUHN; DIEDERICH; KELLER; KRAMER *et al.*, 2017). Eles são caracterizados por sua estrutura celular anucleada bicôncava, que é importante para a manutenção da homeostase do organismo, uma vez que disponibilizam O₂ para diversos tecidos e sistemas, permitindo a produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa. Deste modo, como são estruturas essenciais para o transporte de gases, é primordial que sua integridade estrutural se mantenha constante durante todo o seu período de vida, ou seja, aproximadamente 120 dias. Ademais, para que a função de transporte de gases seja feita de maneira adequada, é necessária a presença de hemoglobina, uma proteína com quatro

subunidades, cada uma ligada ao grupo prostético heme, que apresenta no centro de sua estrutura um átomo de ferro, ao qual o oxigênio molecular se liga (KLINKEN, 2002).

1.1.3.1 Origem e desenvolvimento dos eritrócitos

Os eritrócitos possuem características que facilitam o transporte de gases para os mais diversos tecidos. Dentre elas, destacam-se a sua forma discoidal bicôncava, o citoesqueleto maleável e a presença da hemoglobina. Todas essas características são essenciais para que essa célula possa desempenhar sua função (DE OLIVEIRA; SALDANHA, 2010).

Essas particularidades são obtidas durante o seu processo de amadurecimento, que é caracterizado por várias etapas que resultam em sua enucleação (LU; FENG; PARK; VIDA *et al.*, 2008). Os eritrócitos têm sua origem e maturação na medula óssea vermelha em um processo chamado eritropoiese. Esse processo é constituído por diversas fases de desenvolvimento e diferenciação celular. Em um primeiro momento, há a presença de células precursoras denominadas progenitores eritroides, que dão origem aos eritroblastos. Esses progenitores geram colônias celulares que podem ser divididas em dois tipos: a unidade eritroide formadora de colônia e a unidade iniciadora de eritrócitos, ambas se diferenciam em pró-eritroblastos quando em contato com a eritropoietina (BORELLI, 2024; NIGRA; CASALE; SANTANDER, 2020).

A eritropoietina é um hormônio produzido pelo fígado durante os primeiros estágios de desenvolvimento humano e, posteriormente, pelos rins em indivíduos adultos. Esse peptídeo age regulando tanto o processo de eritropoiese, promovendo a produção de eritrócitos, quanto na formação da hemoglobina A (TSIFTSOGLU, 2021). Em situações de hipóxia, o rim secreta esse hormônio, resultando na diferenciação das células progenitoras eritroides em pró-eritroblastos (TSIFTSOGLU, 2021). Os pró-eritroblastos, então formados, passam por vários estágios de desenvolvimento, formando, inicialmente, eritroblastos basofílicos, que posteriormente se tornam policromatófilos e, por fim, ortocromatófilos (SHIH; WU; LIN, 2018).

Esse processo de maturação é caracterizado por mudanças importantes para os eritrócitos. Dentre essas mudanças tem-se a coloração dessas células que muda para o tom vermelho característico à medida que a hemoglobina se acumula (MORAS; LEFEVRE; OSTUNI, 2017). Além disso, esse estágio de maturação também é caracterizado pela remoção de seu núcleo através de um processo chamado de enucleação. Ao final desse processo há formação de reticulócitos, os quais serão finalmente convertidos em eritrócitos jovens, conforme demonstra a Figura 1 (NIGRA; CASALE; SANTANDER, 2020).

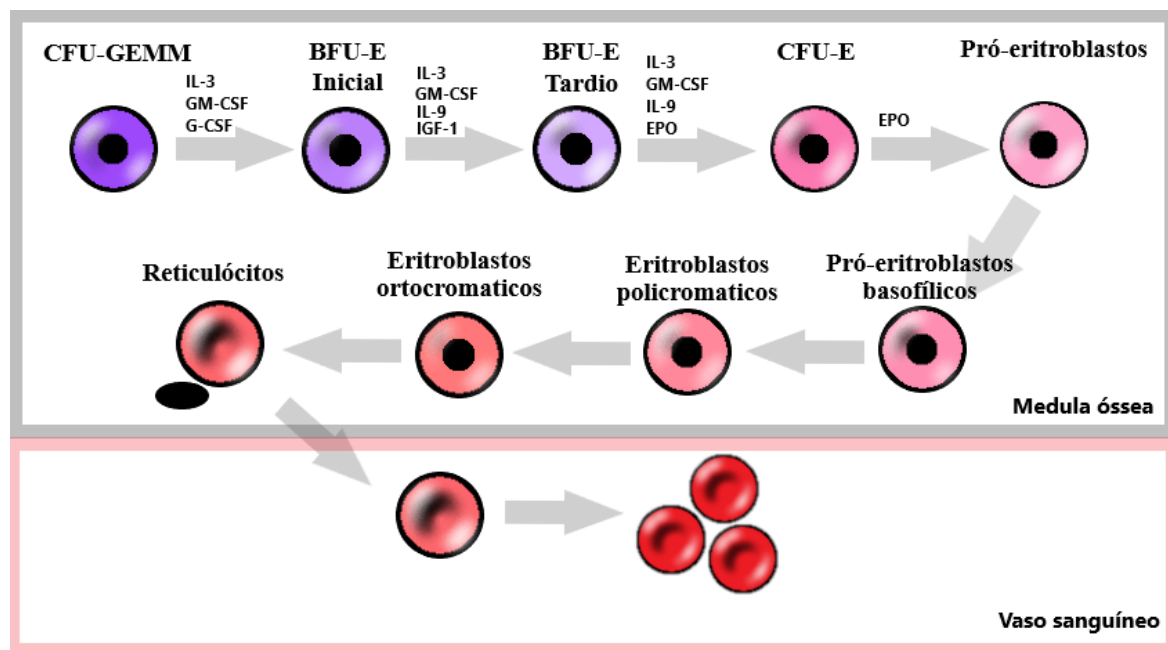


Figura 1 - Representação esquemática do processo de eritropoiese. Adaptado de Garg e Kamal (GARG; KAMAL,2025)

1.1.3.2 Membrana celular de eritrócitos

Durante a eritropoiese, a membrana plasmática também é formada, apresentando-se como uma bicamada constituída por diferentes moléculas lipídicas como os glicerofosfolipídeos, a esfingomielina e o colesterol. Moléculas como fosfatidilserina e fosfatidilcolina constituem as estruturas mais abundantes da bicamada dos eritrócitos e são responsáveis pela manutenção não só da estrutura biofísica, mas também das propriedades mecânicas dos glóbulos vermelhos (HIMBERT; RHEINSTADTER, 2022).

Em relação à sua porção proteica, a membrana plasmática dos eritrócitos apresenta algumas estruturas que desempenham funções essenciais para a manutenção de sua integridade. Inicialmente, pode-se citar a banda 3 ou a proteína de troca de íons (*Anion Exchanger 1*, AE1), a qual promove não só a troca de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, um fenômeno essencial para o transporte de CO_2 , mas também melhora nas propriedades mecânicas e elásticas dessas células, uma vez que ela interage com complexos lipídicos e proteicos, importantes para a integridade do eritrócito (CUNHA, 2024; PRISCILA MURADOR, 2007). Ademais, outra molécula proteica de grande importância para a manutenção da integridade desse tipo celular é a chamada espectrina, que promove uma maior resistência mecânica para a membrana

plasmática, além de ser essencial no processo de formação dos chamados *ghosts* eritrocitários (PRISCILA MURADOR, 2007; SARKAR; BOSE; GIRI; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2018).

1.1.3.3 Deformação e lise de eritrócitos

A manutenção da estrutura dos eritrócitos é importante para que eles desempenhem suas várias funções; se ela for alterada, ocorrerão não só a perda da capacidade de transportar O₂ e CO₂, mas também alterações em diversos processos. Um dos possíveis eventos que alteram a conformação do eritrócito e ilustram este fator é a doença conhecida como anemia falciforme. Esta é caracterizada pelo desenvolvimento de hemácias em forma de foice, as quais perdem a capacidade de circular adequadamente e, portanto, são precocemente destruídas (DAYANA V. P. DI NUZZO¹, 2004). A constante lise dos eritrócitos pode resultar em uma liberação excessiva do grupo heme que, por sua vez, promove um aumento na produção das moléculas de adesão ICAM-1, selectinas e fibronectinas, que atuam no recrutamento de neutrófilos, levando à ampliação dos processos de oclusão dos vasos (WILLIAMS; THEIN, 2018).

Ademais, a hemólise, processo caracterizado pela ruptura da membrana plasmática e liberação dos componentes presentes em seu meio intracelular, também pode ser causada pelo contato com toxinas, como peçonhas de serpentes que, dependendo de sua composição, podem levar a consequências severas à vítima, principalmente pela ativação de vias inflamatórias (HEIREMAN; VAN GEEL; MUSGER; HEYLEN *et al.*, 2017; MELENDEZ-MARTINEZ; MUNOZ; BARRAZA-GARZA; CRUZ-PEREZ *et al.*, 2017; WILLIAMS; THEIN, 2018).

Diante desse cenário, há ativação da eriptose, um mecanismo fisiológico que leva à lise controlada de eritrócitos quando estes se encontram em condições de senescência ou danos celulares. Esse processo é caracterizado por mudanças na composição da membrana plasmática dessas células, o que leva ao aparecimento de sinais que são reconhecidos por macrófagos circulantes, os quais levarão à fagocitose do eritrócito (FANG; XIA; CHEN; SHEN *et al.*, 2022).

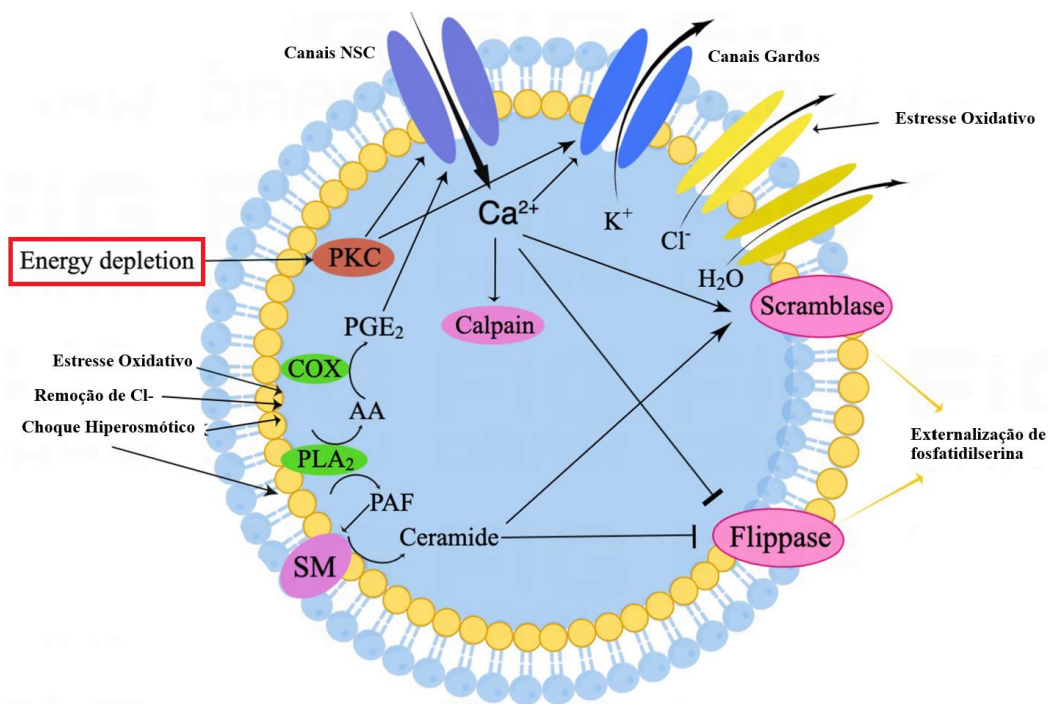


Figura 2 - Mecanismos de ativação da via de eriptose. Adaptado de Fang et al (FANG; XIA; CHEN; SHEN et al, 2022)

De modo geral, o processo de eriptose pode-se iniciar de diversas formas, conforme demonstra a Figura 2. Um dos seus mecanismos envolve um aumento da entrada de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma através de canais específicos da membrana eritrocitária. Esses canais são estimulados pela presença da prostaglandina E₂ (PGE_2), um produto da ação da ciclooxigenase sobre o ácido araquidônico, liberado pela hidrólise de fosfolípidos de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA_2). Uma vez que a concentração citossólica de cálcio (Ca^{2+}) aumenta, canais de potássio sensíveis a cálcio – os chamados canais de Gardos – são ativados, levando à perda de potássio e cloreto. Esse cenário promove uma elevação ainda maior da concentração de cálcio citoplasmático, o que resulta na externalização de fosfatidilserina, já que a presença de grandes quantidades de Ca^{++} inibe a flippase e ativa as escramblase, resultando na realocação de fosfatidilserina da lâmina interna para a lâmina externa dos eritrócitos. O excesso de fosfatidilserina na lâmina externa da membrana funciona como um sinal para que os macrófagos realizem o *clearance* dos eritrócitos antes que eles sofram hemólise (FANG; XIA; CHEN; SHEN *et al.*, 2022).

1.1.4 Peçonhas ofídicas e fragilidade de membrana de eritrócitos

As toxinas de serpentes são importantes fontes de prospecção para novos componentes, os quais podem ser utilizados na área da saúde, já que algumas proteínas e peptídeos são úteis para o tratamento não só de disfunções, mas também de quadros de câncer e infecções bacterianas (CHAN; CHEUNG; XIA; WONG *et al.*, 2016). Entretanto, apesar da aplicação medicinal desses compostos, é importante mencionar que eles são responsáveis por vários efeitos citotóxicos, miotóxicos e neurotóxicos, causando não só alterações nas membranas celulares, mas também no transporte de substâncias e na transdução de sinais entre as células (VYAS; BRAHMBHATT; BHATT; PARMAR, 2013).

Definidos em 2017 como doença tropical negligenciada (HABIB; BROWN, 2018), os acidentes com peçonhas de serpentes somam, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 1,8 a 3 milhões de ocorrências anualmente. Em países economicamente mais debilitados, esses casos são agravados, já que em muitas situações não há o amparo necessário às vítimas, o que pode levá-las ao óbito. O agravamento desses casos está associado à grande quantidade de componentes enzimáticos e não enzimáticos presentes na peçonha desses animais. Tanto as serpentes das famílias *Viperidae* quanto a *Elapidae* apresentam uma grande quantidade de distintos componentes, os quais são encontrados em diferentes porcentagens (OFFOR; MULLER; PIATER, 2022), conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Principais componentes das peçonhas das famílias *Viperidae* e *Elapidae*

Componente	<i>Viperidae</i> (%)	<i>Elapidae</i> (%)	Atividade	Referências
SVMP	41%	6%	<ul style="list-style-type: none"> Atividade hemorrágica; Inibição da agregação plaquetária; Atividade fibrinolítica. 	(OYAMA; TAKAHASHI, 2017) (OLAoba; KARINA DOS SANTOS; SELISTRE-DE-ARAUJO; FERREIRA DE SOUZA, 2020)
PLA ₂	17%	16%	<ul style="list-style-type: none"> Atividade citotóxica; Hemotoxicidade; Efeito pró-inflamatório; Atividade anticoagulante; Atividade Hemólise. 	(CASTRO-AMORIM; NOVO DE OLIVEIRA; DA SILVA; SOARES <i>et al.</i> , 2023)
SVSP	16%	6%	<ul style="list-style-type: none"> Atuam sobre a cascata de coagulação sanguínea. 	(KANG; GEORGIEVA; GENOV; MURAKAMI <i>et al.</i> , 2011)
CLT	8%	-	<ul style="list-style-type: none"> Aglutinação eritrocitária; Adesão a proteínas plasmáticas; inibição ou ativação de receptores específicos de membrana. 	(BARBOSA, 2009)

DIS	7%	-	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inibição da agregação plaquetária; ▪ Alteração de processos hemostáticos. 	(ALMEIDA; DE OLIVEIRA; ARANTES; SAMPAIO, 2023)
LAAO	3%	1%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indução de apoptose; ▪ Citotoxicidade; ▪ Agregação plaquetária e hemorragia. 	(TÁSSIA R COSTA, 2014)
3FTx	-	66%	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Causa paralisia da musculatura esquelética 	(NIRTHANAN, 2020)

Legenda: SVMP: *Snake Venom Metalloproteinases*; PLA₂: Phospholipases A₂; SVSP: *Snake Venom Serine Proteinases*; CLT: *C-Type Lectin*; DIS: Disintegrin; LAAO: *L-Amino Acid Oxidase*; 3FTx: *3-Finger Toxins*. Adaptado de (OFFOR; MULLER; PIATER, 2022).

Elapidae e *Viperidae* são as duas famílias mais importantes quando se fala em acidentes ofídicos. Enquanto a primeira apresenta componentes que afetam predominantemente o sistema nervoso, a segunda afeta a hemorreologia do sangue (OFFOR; MULLER; PIATER, 2022; QIN; ZHUO; HU; LAY *et al.*, 2023). No Brasil, as serpentes mais comumente encontradas são as pertencentes à família *Viperidae*, na qual está contido o gênero *Bothrops*, que contém as serpentes que causam o maior número de acidentes no território nacional, conforme demonstra a Tabela 2 (GUTIERREZ; CALVETE; HABIB; HARRISON *et al.*, 2017; TASOULIS; ISBISTER, 2023).

Tabela 2. Número de acidentes ofídicos referentes ao ano de 2023

Gênero	Casos
<i>Bothrops</i>	21.819
<i>Crotalus</i>	2.655
<i>Micrurus</i>	379
<i>Lachesis</i>	399
Não peçonhentos	2.971
Total	32.598

Fonte: (BRASIL, 2024)

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* apresenta muitos compostos, sejam eles enzimáticos ou não enzimáticos. Dentre os efeitos destes componentes, pode-se citar a capacidade de alterar membranas celulares, a qual está relacionada com a atividade de fosfolipases, uma das principais enzimas encontradas na peçonha bruta (GUTIERREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009). Em eritrócitos, por exemplo, esse conjunto enzimático

pode atuar na membrana eritrocitária, possivelmente aumentando a fragilidade dessas células (CAMPOS; PUCCA; RONCOLATO; BERTOLINI *et al.*, 2013; DOLTCHINKOVA; STOYLOV; ANGELOVA, 2021).

As fosfolipases A₂ são enzimas que realizam, na presença de Ca⁺⁺, a hidrólise dos fosfolipídeos de membrana. Para tal, elas catalisam a clivagem hidrolítica da região da ligação 2-acil, liberando duas moléculas distintas, um ácido-graxo livre e um lisofosfolipídeo (WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017), conforme demonstra a Figura 3. Durante essa reação, o par His48/Asp99, presente no sítio catalítico da enzima, promove o ataque nucleofílico do oxigênio da água à posição sn-2 do substrato, produzindo um intermediário catalítico tetraédrico que é estabilizado pelos íons Ca²⁺. Em seguida, este intermediário instável colapsa, o que resulta na quebra da ligação éster e, consequentemente, na liberação de dois produtos, o ácido graxo livre e o lisofosfolipídeo. Após a liberação dos produtos, o sítio catalítico da enzima é regenerado, ficando disponível para um novo ciclo de catálise (FERREIRA; RULLER; CHIOATO; WARD, 2008; SCOTT; WHITE; OTWINOWSKI; YUAN *et al.*, 1990).

De modo geral, o efeito direto dessas enzimas está relacionado à quebra dos fosfolipídeos de membrana, sobretudo a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, o que pode levar à desestabilização das membranas biológicas (XIAO; PAN; LIAO; YANG *et al.*, 2017). Por outro lado, o seu efeito indireto está relacionado aos lisofosfolipídeos liberados durante a reação, os quais também afetam a estrutura das membranas (BIERBAUM, 1979).

Além da classe enzimaticamente ativa, existe uma classe de fosfolipase A₂ que não apresenta poder catalítico, a PLA Lys49, a qual é produzida a partir de um gene botrópico mutante (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; SERGIO LIZANO, 2000). O nome PLA Lys49 foi dado devido à substituição na posição 49 de um resíduo de aspartato por lisina ou serina. Essa substituição promove uma alteração no sítio de ligação de Ca⁺⁺, que é um cofator determinante de sua atividade catalítica, levando à inativação enzimática (FERREIRA; RULLER; CHIOATO; WARD, 2008; LOMONTE; ANGULO; CALDERON, 2003; SERGIO LIZANO, 2000).

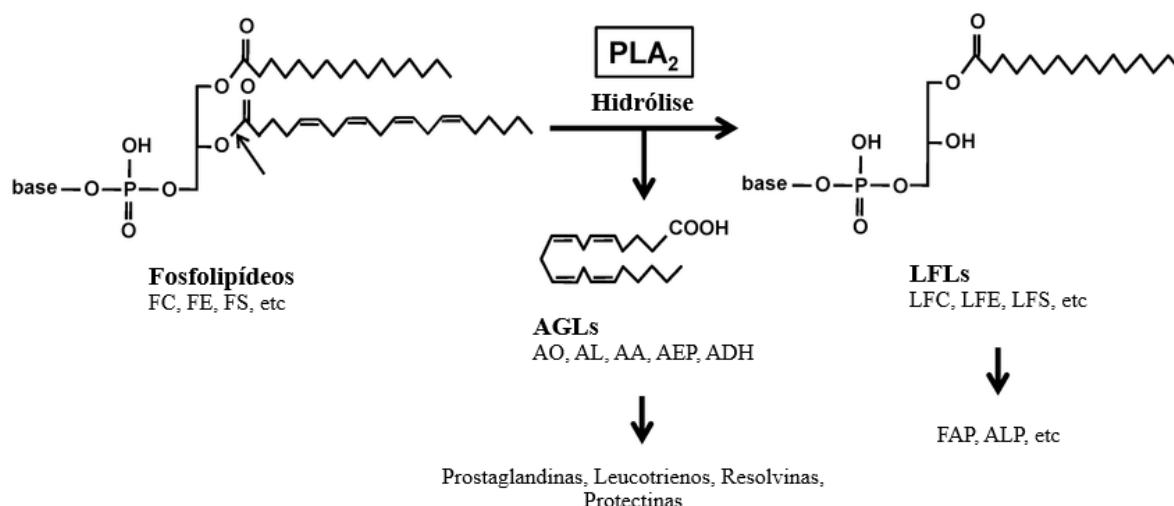


Figura 3 - Representação esquemática da ação da PLA₂. FC, fosfatidilcolina; FE, fosfatidiletanolamina; FS, fosfatidilserina; AO, ácido oleico; AL, ácido linoleico; AA, ácido araquidônico; AEP, ácido eicosapentanoico; ADH, ácido docosaheptaenoico; LFC, lisofosfatidilcolina; LFE, lisofosfatidiletanolamina; LFS, lisofosfatidilserina; FAP, fator de ativação plaquetária; ALP, ácido lisofosfatídico. Adaptado de (YAMAMOTO; HAKOI; NOMURA; MURAKAMI, 2023).

1.1.5 *Bothrops jararacussu*

A *Bothrops jararacussu*, a qual também é conhecida como surucucu-dourada, é comumente encontrada em território nacional, estando presente em regiões como o Nordeste brasileiro ou em localidades mais ao sul do país (DA SILVA AGUIAR; DA COSTA GALIZIO; SANT'ANNA; SILVEIRA *et al.*, 2020; MUSCAT, 2021). Assim como as serpentes crotálicas, a jararacussu tem uma peçonha que apresenta componentes diversificados. Em uma análise conduzida por Netto e colaboradores, foram identificados ao todo 62 proteínas de diferentes famílias, sendo elas: fosfolipases A₂, metaloproteínas, lectinas do tipo C, L-amino-oxidases e serino-proteases (DA SILVA AGUIAR; DA COSTA GALIZIO; SANT'ANNA; SILVEIRA *et al.*, 2020; CORREA-NETTO *et al.*, 2010), onde a quantidade dos componentes presentes na peçonha bruta varia de acordo com o sexo, idade e habitat (DE SOUZA *et al.*, 2023).

Dentre estes componentes, aqueles que se destacam são as fosfolipases A₂, enzimas encontradas em grande quantidade em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, essas enzimas são responsáveis por alterações estruturais na membrana plasmática de diversos tipos celulares, como os eritrócitos. Na peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, diferentes formas de fosfolipases foram isoladas; a estas foram dados os nomes de bothropstoxinas (BthTX). As bothropstoxinas se dividem em dois tipos, a BthTX-I e a BthTX-II. Enquanto a BthTX-I é uma fosfolipase cataliticamente inativa devido à presença de uma lisina na posição 49 do sítio ativo da enzima, a BthTX-II é uma

enzima cataliticamente ativa, apresentando no seu sítio ativo um resíduo de aspartato na posição 49 (PINTO et al., 2023; BEZERRA et al., 2019).

1.1.6 Teste de fragilidade osmótica

Assim, para analisar como a fosfolipase da peçonha botrópica atua sobre a estrutura da membrana eritrocitária, pode-se utilizar o teste de fragilidade osmótica. Este ensaio avalia a suscetibilidade dos eritrócitos em sofrer lise quando expostos a um gradiente de concentrações decrescentes de NaCl. Esse fenômeno leva à liberação de hemoglobina, a qual é quantificada através de espectrofotometria. Após obter os dados da hemólise, é gerada uma curva sigmoide através da equação de Boltzmann, como exposto na Figura 4.

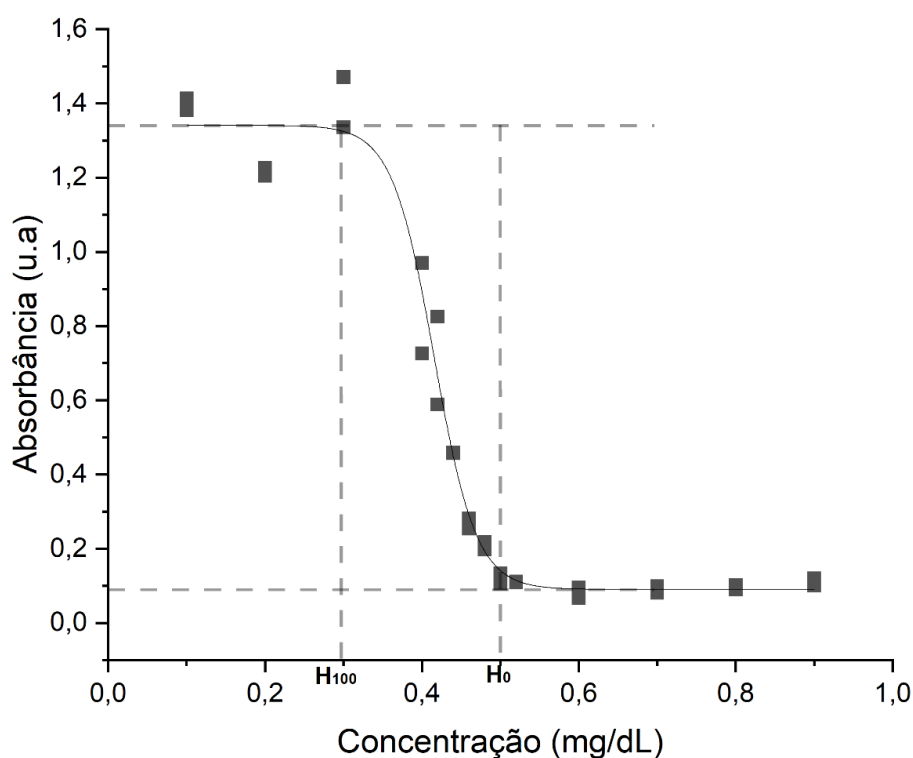


Figura 4 - Representação do gráfico obtido através da equação de Boltzmann. Autoria própria

A concentração inicial da solução, localizada à direita do gráfico (Figura 4), representa uma condição isotônica em relação ao sangue humano. Com a diminuição inicial da concentração de NaCl, nenhuma hemólise é detectada, uma vez que não há significativa liberação de hemoglobina no meio, mas à medida que as concentrações de NaCl se tornam menores, é observada uma elevação na absorbância, tendo em vista que o meio se torna mais hipotônico e, portanto, os eritrócitos se tornam mais suscetíveis a hemólise, conforme

demonstra a Figura 5. Além disso, o teste de fragilidade osmótica também permite analisar tanto a absorbância mínima quanto a máxima, as quais representam, respectivamente, a hemoglobina livre presente no sangue e a hemoglobina liberada através da lise total dos eritrócitos.

Ademais, parâmetros como o H_0 , H_{50} e H_{100} também podem ser determinados através deste teste. H_0 representa a concentração de NaCl onde a hemólise hiposmótica se inicia. H_{50} indica a concentração salina em que há 50% da liberação de hemoglobina da população de eritrócitos. Já H_{100} representa a concentração de NaCl onde há hemólise hiposmótica completa das células vermelhas. Além disso, a constante dX também pode ser obtida. Ela representa $\frac{1}{4}$ da variação da concentração de NaCl que causa lise de toda a população de eritrócitos utilizada no ensaio. Parâmetros como a absorbância mínima (A_{min}), máxima (A_{max}) e H_{50} estão contidos na equação de Boltzmann (Equação 1) e podem ser determinados a partir de análise de regressão não-linear, com base nesta equação. Além disso, os valores de H_0 e H_{100} podem ser determinados com a utilização das equações 2 e 3.

Equação 1. Equação de Boltzmann:

$$A = \frac{A_{max} - A_{min}}{\sqrt{1 + e^{(X-H_{50})/dX}}} + A_{min}$$

Equação 2. Equação para determinação de H_0 :

$$H_0 = H_{50} + 2dX$$

Equação 3. Equação para determinação de H_{100} :

$$H_{100} = H_{50} - 2dX$$

Os parâmetros H_0 , H_{100} e H_{50} apresentam relações inversamente proporcionais à estabilidade osmótica, ou seja, valores mais altos indicam maior fragilidade celular. Por essa razão, seus inversos tornam-se métricas importantes para a análise, pois se correlacionam diretamente com a estabilidade da membrana.

Por outro lado, dX está relacionado com a heterogeneidade da população de hemácias e sua relação com a suscetibilidade à hemólise. Dessa forma, valores menores de dX estão ligados não só à baixa heterogeneidade dos eritrócitos presentes na solução, mas também a

uma maior suscetibilidade à lise diante de leves alterações na concentração de NaCl. Enquanto que valores maiores estão relacionados a uma maior heterogeneidade e uma maior estabilidade do conjunto total de hemácias.

A posse destes parâmetros permite determinar de forma qualitativa e quantitativa o efeito da peçonha de serpente na estabilidade da membrana dos eritrócitos e, dessa forma, compreender se os componentes presentes nas peçonhas analisadas são capazes de alterar a estrutura das hemácias.

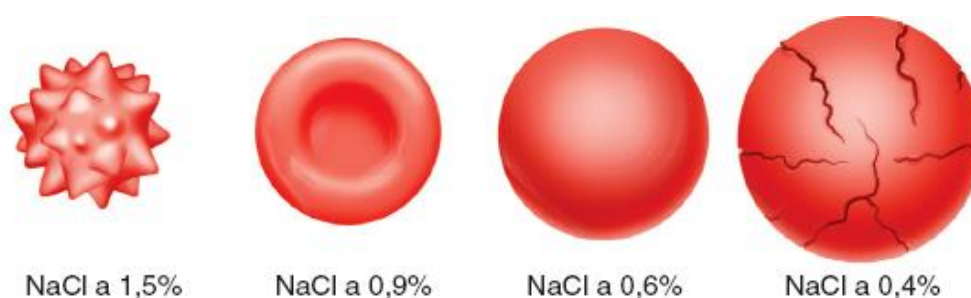


Figura 5 - Representação da estabilidade da membrana eritrocitária frente a diferentes concentrações de NaCl. Adaptado de (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023)

1.1.6 Relação eritrócito-peçonha

Embora a hemólise não seja o principal fator responsável pelos quadros de mortalidade causados pelos acidentes ofídicos, sua ocorrência pode debilitar as vítimas e promover relevantes alterações hemorreológicas (XIE; BITTENBINDER; SLAGBOOM; ARRAHMAN *et al.*, 2021). Dessa forma, as alterações estruturais que promovem o aumento da fragilidade das hemácias são importantes, já que contribuem para o agravamento do quadro. Ademais, não apenas as doenças genéticas como a anemia falciforme e inúmeras outras condições podem favorecer a hemólise, mas também várias substâncias, como as toxinas, podem levar ao aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos e acabam sendo mais comuns do que o distúrbio genético mencionado (GUO; LIU; YAO; ZHANG *et al.*, 2012).

No Brasil, um dos principais casos de contato com essas toxinas ocorre a partir de picadas de cobras peçonhentas, o que pode ser observado a partir de um estudo conduzido por Souza e colaboradores durante o período de 13 anos (2007 – 2019). Esta análise, que foi feita com dados disponibilizados no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DataSUS), demonstrou que foram notificados 364.964 casos de acidentes com cobras nesse período, sendo que a quantidade de óbitos observados foi de 163 indivíduos, a maioria por

acidentes com animais peçonhentos (BRASIL, 2024; SOUZA; FARIAS; BERNARDE; CHIARAVALOTTI NETO *et al.*, 2022).

2. JUSTIFICATIVA

Diante dos diferentes componentes presentes nas peçonhas ofídicas, é importante analisar se, além dos efeitos neurotóxicos e citotóxicos, essas peçonhas são capazes de tornar os eritrócitos mais suscetíveis à lise, ou seja, se essas toxinas podem induzir um aumento da fragilidade osmótica, e quais são os compostos que estão envolvidos nesse processo. Como a quantidade de trabalhos que realizam a análise destes dois parâmetros, fragilidade osmótica e peçonhas de serpentes, é escassa, este estudo visa verificar se existe de fato esta relação e se ela é significativa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar se a peçonha de *Bothrops jararacussu* é capaz de aumentar a instabilidade da membrana plasmática de eritrócitos

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre a fragilidade osmótica dos eritrócitos.
- Caracterizar o efeito hemolítico da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre eritrócitos, comparando a sua ação dose-dependente na ausência (direta) e na presença (indireta) de um substrato fosfolipídico (gema de ovo).
- Analisar o efeito hemolítico do substrato fosfolipídico (gema de ovo) sobre eritrócitos, comparando diferentes diluições.
- Analisar o efeito hemolítico da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre eritrócitos em diversos tempos de incubação.
- Avaliar as alterações morfológicas nos eritrócitos resultantes da exposição à peçonha (nas condições de ação direta e indireta) por meio da coloração de Wright.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue humano utilizadas nos testes foram obtidas como resíduos de descarte provindos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

4.2 Preparo das soluções de peçonha bruta

Para os testes de fragilidade osmótica com a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, uma solução de 300 µg/mL em um volume final de 500 µL foi inicialmente preparada a partir da diluição de uma solução de concentração 1 mg/mL. Essa solução foi obtida através da diluição em PBS utilizando os seguintes cálculos:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$1 \text{ mg/mL} \times V_i = 0,3 \text{ mg/mL} \times 0,5 \text{ mL}$$

$$V_i = 150 \text{ µL da solução de } 1 \text{ mg/mL}$$

A solução de uso da amostra foi, então, preparada misturando 150 µL da solução de peçonha bruta a 1 mg/mL com 350 µL de tampão fosfato de sódio pH 7.0 (PBS).

4.3 Lavagem dos eritrócitos

Para analisar o efeito direto da peçonha sobre os eritrócitos, o plasma e seus componentes foram removidos e os eritrócitos foram lavados por quatro vezes em PBS. Após cada lavagem e centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos (Hitachi Koki, modelo CFR15XRII, Hitachinaka, Japão), os sobrenadantes eram descartados e os eritrócitos eram ressuspensos em solução de PBS. As suspensões de eritrócitos obtidas após o quarto ciclo de lavagem foram utilizadas nos testes de fragilidade osmótica.

4.4 Teste de fragilidade osmótica

A avaliação da estabilidade de membrana dos eritrócitos sob ação da peçonha de serpente foi realizada através do método de fragilidade osmótica, utilizando a peçonha bruta em diferentes concentrações, de modo a analisar tanto o seu efeito direto como o indireto. Para isso, foram utilizadas concentrações variáveis de soluções salinas em intervalos de 0 a 0,9%

de concentração de NaCl. Dessa forma, para o teste de ação direta, foram adicionados 490 µL de solução salina (0,1–0,9 mg/dL) a uma série de minitubos, os quais foram, posteriormente, preincubados a 37 °C por 5 minutos (Marconi, Modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil). Em seguida, foram adicionados 5 µL de sangue e 5 µL de peçonha bruta (300 µg/mL) aos minitubos, os quais foram, então, colocados para incubação por 30 minutos a 37 °C. Nos minitubos-controle, a solução de peçonha foi substituída por PBS. Para analisar o efeito indireto, foram adicionados, em conjunto com a peçonha e o sangue, 25 µL de gema de ovo 1:4. Após a incubação de trinta minutos, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e a 25 °C (Hitachi Koki, modelo CFR15XRII, Hitachinaka, Japão). Cada sobrenadante obtido após a centrifugação foi analisado em espectrofotômetro a 540 nm (Shimadzu, Modelo UV1650TC, Japão) para leitura da absorbância e quantificação da lise dos eritrócitos.

A relação dos valores de absorbância com as respectivas concentrações salinas foi analisada por regressão não-linear com base na equação de Boltzmann para obtenção dos valores dos parâmetros de estabilidade de eritrócitos. Esse processo foi feito com a utilização de softwares estatísticos, como o Origin (MicroCal, Northampton, MA, EUA) e o SPSS (IBM, Chicago, IL, EUA), sendo que apenas os ajustes com valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Ademais, também foi construída a curva de estabilidade de membrana expressa pela percentagem de hemólise, a qual será calculada através da seguinte equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A}{A_{\text{max}}} \times 100$$

4.5 Determinação de proteínas totais pelo método de Bradford

Para determinar a quantidade de proteína presente na peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, foi utilizado o método de Bradford, seguindo o protocolo estabelecido pelo próprio autor (BRADFORD, 1976).

4.6 Influência da concentração da peçonha bruta sobre a lise de eritrócitos

Para avaliar como a variação da concentração de peçonha bruta influencia a fragilidade e a consequente lise dos eritrócitos, foi realizado um ensaio dose-dependente, ou seja, testes com diferentes concentrações da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* a partir de diferentes diluições de uma solução inicial a 1 mg/mL, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações utilizadas para avaliação da influência da concentração da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre a lise de eritrócitos

Concentração [µg/mL]	Volume de peçonha (µL)	Volume de PBS (µL)
10	5	495
20	10	490
30	15	485
40	20	480
50	25	475
60	30	470
70	35	465
80	40	460
90	45	455
100	50	450

Para cada concentração foram adicionados 100 µL da peçonha e 100 µL de sangue. Para o teste com a gema de ovo, foram adicionados 80 µL de peçonha e 20 µL de gema 1:9. Uma vez preparadas as soluções, estas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Por fim, a absorbância do sobrenadante foi lida a 540 nm.

4.7 Influência da concentração de gema de ovo sobre a lise de eritrócitos

Para analisar o efeito da gema de ovo sobre a membrana, ou seja, se ela isoladamente seria capaz de aumentar a fragilidade da membrana dos eritrócitos, foram feitos testes de fragilidade osmótica na presença de diferentes diluições de gema de ovo, com e sem a presença da peçonha de *Bothrops jararacussu*, conforme demonstra a Tabela 4. Em cada reação foram adicionados 480 µL de solução de NaCl 0,9%, 5 µL de sangue, 10 µL de cada uma das diluições de gema e 5 µL de PBS para o controle ou 5 µL de peçonha de *Bothrops jararacussu* [0,3 mg/mL].

Tabela 4. Diferentes diluições do substrato fosfolipídico (gema de ovo)

Diluição (v/v)	Volume de gema (mL)	Volume de PBS (mL)
1:0	1	0
1:2	1	1
1:3	1	2
1:4	1	3
1:5	1	4
1:6	1	5
1:7	1	6
1:8	1	7
1:9	1	8
1:10	1	9
1:15	1	14

4.8 Influência do tempo no efeito da peçonha de *Bothrops Jararacussu* sobre o sangue total e eritrócitos lavados

Para compreender como a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* influencia a instabilidade da membrana dos eritrócitos em relação ao tempo, tanto na ausência como na presença de gema de ovo, diferentes amostras foram preparadas. Para o teste sem a presença de gema de ovo, 490 µL da solução de NaCl 0,9% foram incubados com 5 µL de peçonha de *Bothrops jararacussu* [0,3 mg/mL] e 5 µL de sangue durante 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Para o controle, a peçonha bruta foi substituída por 5 µL de PBS. Para o teste com a presença de gema de ovo, 465 µL da solução de NaCl 0,9% foram incubados com 25 µL de gema 1:4, 5 µL de sangue e 5 µL de peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* [0,3 mg/mL]. Assim como na ausência de gema de ovo, nos controles a peçonha foi substituída por 5 µL de PBS. Ambos os testes, na ausência e presença do substrato fosfolipídico, foram feitos em duplicatas para todos os tempos analisados.

4.9 Coloração de eritrócitos pelo método de Wright

Para compreender como a peçonha de *Bothrops jararacussu* afeta a morfologia da membrana dos eritrócitos, realizou-se a coloração de Wright. Para tal, inicialmente foi preparado esfregaço sanguíneo a partir de quatro amostras distintas: sangue, sangue + peçonha, sangue + gema, e sangue + gema + peçonha, todos previamente incubados por 30 minutos. Uma vez preparadas as lâminas, foram feitas as colorações, com a adição do corante de Wright sobre a lâmina até cobri-la totalmente. Após três a quatro minutos, sem remover o corante de Wright, foi adicionada eosina até o surgimento de um brilho metálico na superfície da lâmina. Aguardou-se mais sete minutos para, então, realizar a análise em microscópio. Todas as imagens obtidas foram tiradas da porção intermediária/final de cada lâmina.

5. RESULTADOS

5.1 Fragilidade osmótica

As peçonhas ofídicas apresentam uma grande diversidade de componentes enzimáticos, os quais podem estar relacionados ao aumento da instabilidade de membrana dos eritrócitos. Assim, para compreender melhor esses efeitos, foram realizados testes de fragilidade osmótica com a peçonha de *Bothrops jararacussu*.

O teste de fragilidade osmótica direta demonstrou que, na ausência de gema de ovo, a peçonha não foi capaz de alterar o padrão de liberação de hemoglobina, tanto dos eritrócitos presentes no sangue total (Figura 6), como dos eritrócitos lavados (Figura 7).

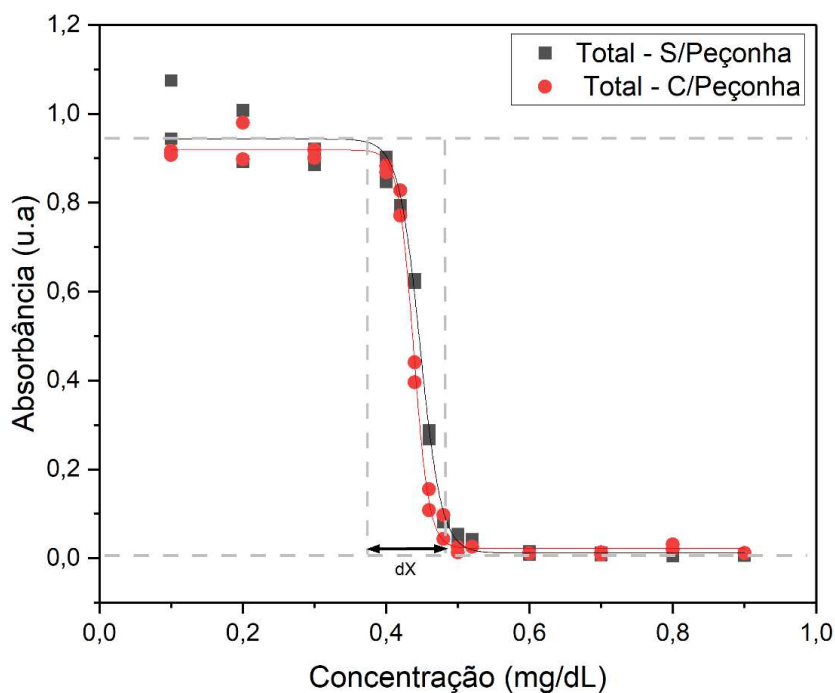


Figura 6 - Teste direto de fragilidade osmótica, ou seja, na ausência de gema de ovo, em eritrócitos presentes no sangue total. Foram utilizados 5 μ L de peçonha de *Bothrops jararacussu* a 0,3 mg/mL, 5 μ L de sangue total e 490 μ L de solução de NaCl em concentrações de 0,1 s 0,9 mg/dL

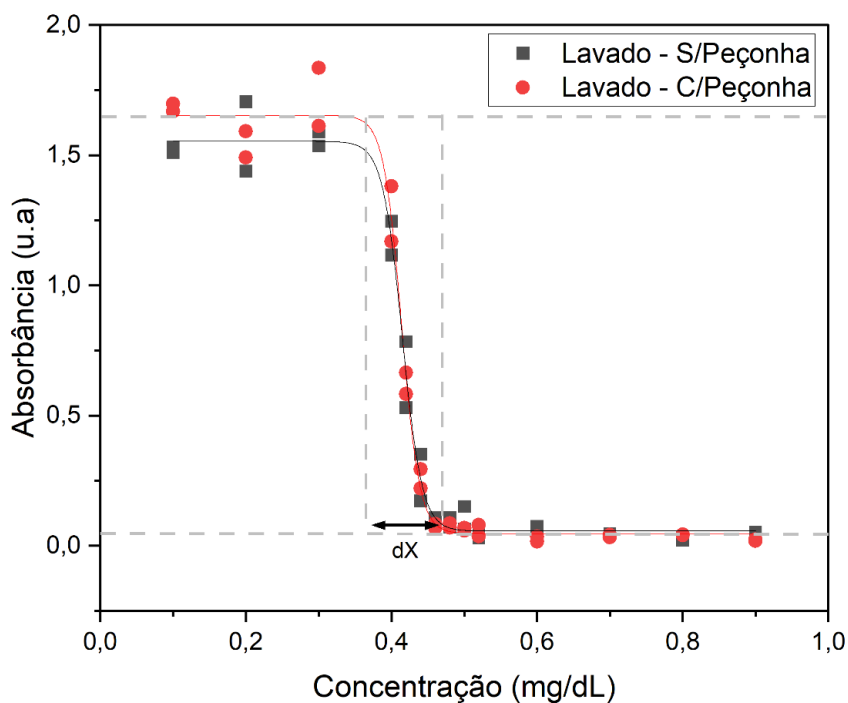


Figura 7 - Teste direto de fragilidade osmótica, ou seja, na ausência de gema de ovo, em eritrócitos isolados. Foram utilizados 5 μ L de peçonha de *Bothrops jararacussu* a 0,3 mg/mL, 5 μ L de eritrócitos lavados e 490 μ L de solução de NaCl em concentrações de 0,1 a 0,9 mg/dL

A comparação dos parâmetros de lise (dX, H₅₀, A_{max} e A_{min}) obtidos na ausência de gema de ovo permite também a investigação da influência da peçonha sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros do teste de fragilidade osmótica obtidos através dos testes diretos, ou seja, na ausência de gema de ovo

Parâmetro	Sangue Total Sem Peçonha	Sangue Total Com Peçonha	Sangue Lavado Sem Peçonha	Sangue Lavado Com Peçonha
A_{max}	0,94277 ± 0,0151	0,9186 ± 0,00925	1,55287 ± 0,02775	1,65219 ± 0,02708
A_{min}	0,01145 ± 0,0121	0,02179 ± 0,0068	0,05605 ± 0,01802	0,0469 ± 0,01724
H₅₀	0,44725 ± 0,00155	0,43817 ± 7,99005E-4	0,41481 ± 0,00154	0,41383 ± 0,00132
dX	0,01492 ± 0,00132	0,01075 ± 7,08461E-4	0,01359 ± 0,00142	0,01239 ± 0,0012
r²	0,99181	0,99674	0,98974	0,99156
p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Os valores de dX estão associados à heterogeneidade da população de eritrócitos e, portanto, representam a tendência da população de eritrócitos em se romper sob diferentes concentrações salinas. Conforme definido anteriormente, menores valores de dX estão associados a uma menor heterogeneidade na população de eritrócitos, de tal forma que a curva de lise é mais abrupta. Porém, conforme apresentado na Tabela 5, os valores de dX tanto para o sangue total, como para o lavado, assim como para os casos da presença ou ausência da peçonha, apresentaram valores próximos quando o ensaio é realizado na ausência de gema de ovo.

Outro parâmetro observado foi o H₅₀, o qual demonstra a concentração osmótica em que se teve lise em cerca de 50% da população de eritrócitos. Conforme demonstra a Tabela 5, o H₅₀ de ambos os testes, representados tanto na Figura 6 quanto na 7, demonstra valores muito próximos. Isso também evidencia que a adição de peçonha, tanto na presença (sangue

total) como na ausência de plasma (eritrócitos lavados), não apresenta ação direta, ou seja, sem adição de gema de ovo, sobre a lise de eritrócitos.

Finalmente, têm-se os valores de absorbância máximos (A_{\max}) e mínimos (A_{\min}) que, assim como os outros parâmetros, não sofreram grandes alterações entre os mesmos grupos de tratamento. Esses resultados demonstram a baixa capacidade da peçonha de *Bothrops jararacussu* de promover diretamente um aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos.

Em suma, a ausência de perturbação maior na curva de fragilidade osmótica, bem como nos parâmetros de lise (dX , H_{50} , A_{\max} e A_{\min}), demonstra que na ausência de gema de ovo, a peçonha de *Bothrops jararacussu* não afeta a fragilidade osmótica tanto de eritrócitos presentes no sangue total como de eritrócitos lavados.

Por outro lado, a adição da gema de ovo nas diferentes soluções salinas promoveu um perfil de lise distinto do observado anteriormente, conforme observado nas Figuras 8 e 9.

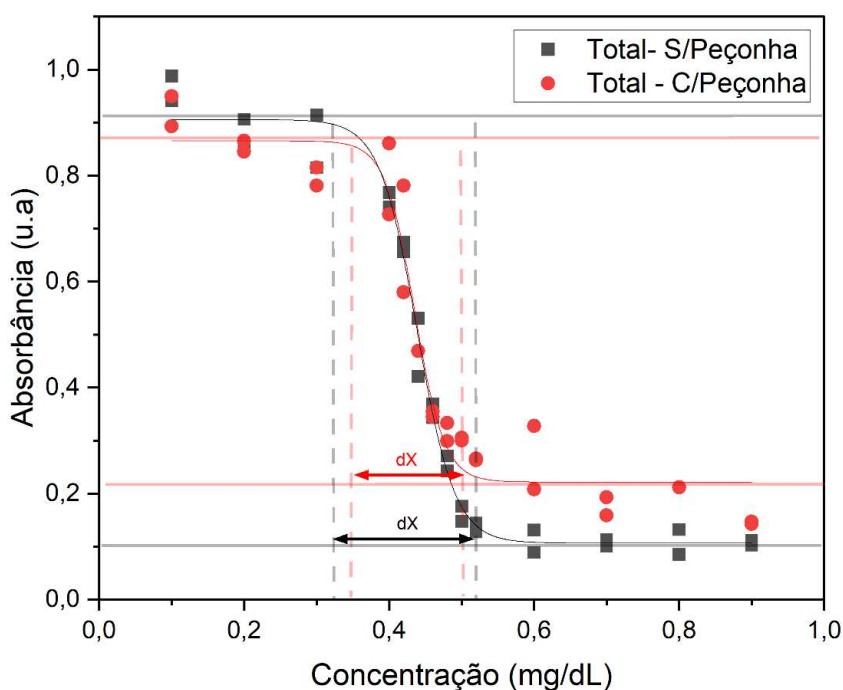


Figura 8 - Teste indireto de fragilidade osmótica, ou seja, na presença de gema de ovo, em eritrócitos presentes no sangue total. Foram utilizados 5 μ L de peçonha de *Bothrops jararacussu* a 0,3 mg/mL, 5 μ L de sangue total, 25 μ L de gema de ovo (1:4) e 465 μ L de solução de NaCl em concentrações de 0,1 a 0,9 mg/dL

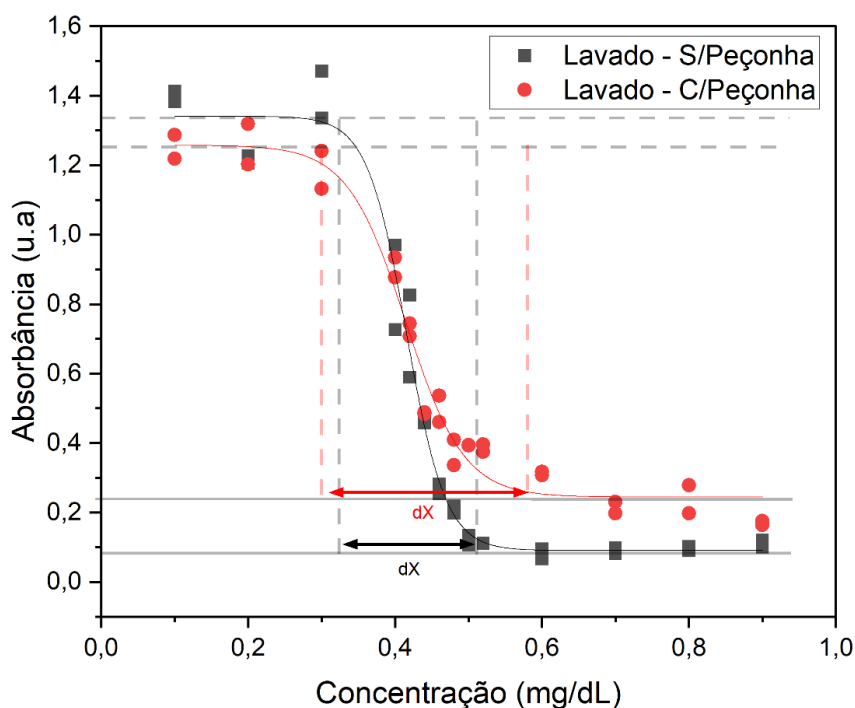


Figura 9 - Teste indireto de fragilidade osmótica, ou seja, na presença de gema de ovo, em eritrócitos isolados. Foram utilizados 5 μ L de peçonha de *Bothrops jararacussu* a 0,3 mg/mL, 5 μ L de eritrócitos lavados, 25 μ L de gema de ovo (1:4) e 465 μ L de solução de NaCl em concentrações de 0,1 a 0,9 mg/dL

Tabela 6. Parâmetros do teste de fragilidade osmótica obtidos através dos testes indiretos, ou seja, na presença de gema de ovo.

Parâmetro	Sangue Total Sem Peçonha	Sangue Total Com Peçonha	Sangue Lavado Sem Peçonha	Sangue Lavado Com Peçonha
A_{max}	0,90544 $\pm 0,01462$	0,86522 $\pm 0,02493$	1,34088 $\pm 0,0311$	1,25749 $\pm 0,02936$
A_{min}	0,10634 $\pm 0,01186$	0,22155 $\pm 0,01919$	0,08988 $\pm 0,02353$	0,24387 $\pm 0,02238$
H_{50}	0,43887 $\pm 0,00238$	0,43541 $\pm 0,00429$	0,41568 $\pm 0,00339$	0,41439 $\pm 0,00533$
dX	0,0259 $\pm 0,0021$	0,02039 $\pm 0,00372$	0,02676 $\pm 0,00351$	0,03958 $\pm 0,00533$
r^2	0,98953	0,95588	0,98091	0,97627
p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Na presença da gema de ovo, em concentrações salinas mais próximas à isotonicidade com o sangue humano (0,9%), houve uma maior liberação de hemoglobina na presença da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, resultando em maior valor de A_{min} , tanto no ensaio com sangue total (Figura 8 e Tabela 6) como no ensaio com eritrócitos lavados (Figura 9 e Tabela 6). Foi certamente por isso, também, que a liberação de hemoglobina em condições de menor isotonicidade foi menor na presença da peçonha, resultando em menor valor de A_{max} tanto no ensaio com sangue total (Figura 8 e Tabela 6) como no ensaio com eritrócitos lavados (Figura 9 e Tabela 6). Esses resultados indicam que na presença da gema, houve aumento da fragilidade de eritrócitos na presença da peçonha.

Diferentemente do que ocorreu nos testes diretos, ou seja, na ausência do substrato fosfolipídico (Figuras 6 e 7), na presença de gema de ovo (Figuras 8 e 9), houve uma pequena diferença nos valores de dX (Tabela 6). O valor de dX obtido na presença de peçonha e gema de ovo foi próximo àquele obtido somente na presença da gema de ovo e na ausência de peçonha. Isso demonstra que a adição de gema em conjunto com a peçonha de *Bothrops jararacussu* promoveu pouca alteração na heterogeneidade da população de eritrócitos. Por outro lado, no teste indireto com eritrócitos lavados, a peçonha de *Bothrops jararacussu* promoveu um maior aumento em dX, conforme demonstra a Figura 9, indicando maior heterogeneidade na população de eritrócitos.

Em relação a H_{50} , que representa a concentração salina onde se tem 50% da lise da população de eritrócitos, quando na presença da gema de ovo, a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* não afetou substancialmente os valores deste parâmetro, tanto para os eritrócitos presentes no sangue total (Figura 8 e Tabela 6) quanto para os eritrócitos lavados (Figura 9 e Tabela 6).

5.2 Influência da concentração da gema de ovo sobre a lise de eritrócitos pela peçonha de *Bothrops jararacussu*

Conforme demonstrado pela Figura 10, concentrações mais baixas de gema de ovo apresentam pouca influência sobre a estrutura da membrana dos eritrócitos, o que demonstra que estas são as concentrações mais indicadas para se utilizar nos testes de fragilidade osmótica. Dentre estas concentrações, a concentração de 1:4 de gema foi escolhida para

utilização nos ensaios, por ser uma das concentrações em que a gema não afeta isoladamente a estabilidade de membrana dos eritrócitos.

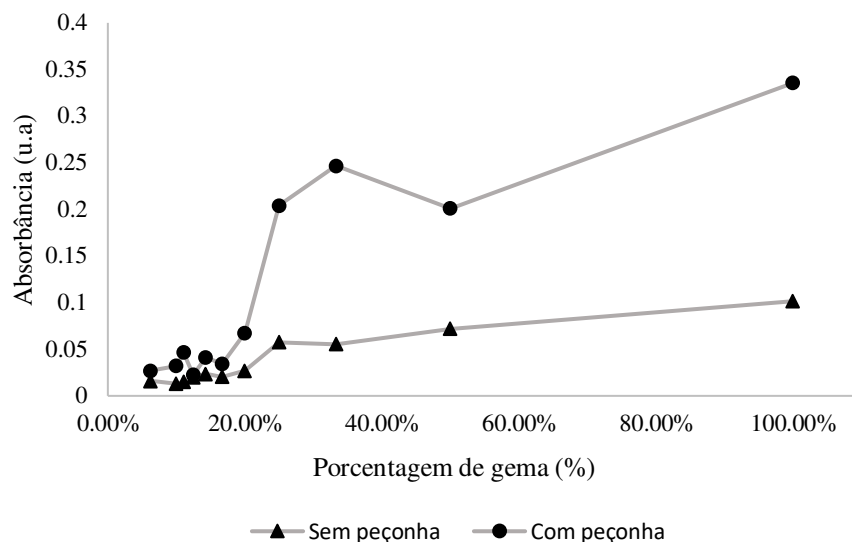


Figura 10 - Influência da concentração da gema de ovo sobre a lise de eritrócitos. Condições: 10 μ L de gema de ovo em concentrações, 480 μ L de solução de NaCl 0,9 mg/dL, 5 μ L de sangue total e 5 μ L de PBS (controle) ou 5 μ L de peçonha de *Bothrops jararacussu* a 0,3 mg/mL

5.3 Influência da concentração da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre a lise de eritrócitos

Com base nos testes de fragilidade osmótica, observou-se que a peçonha de *Bothrops jararacussu* é capaz de promover um aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos presentes nas diferentes soluções salinas; no entanto, esse processo só ocorre na presença de gema de ovo, conforme demonstrado nas figuras 8 e 9. Para verificar se esta baixa capacidade de causar hemólise na ausência de gema de ovo está atribuída a uma baixa quantidade de peçonha presente nas soluções, foi feito um teste com diferentes concentrações de peçonha, fixando a quantidade de eritrócitos utilizados, tanto na presença como na ausência de gema. Assim, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 11.

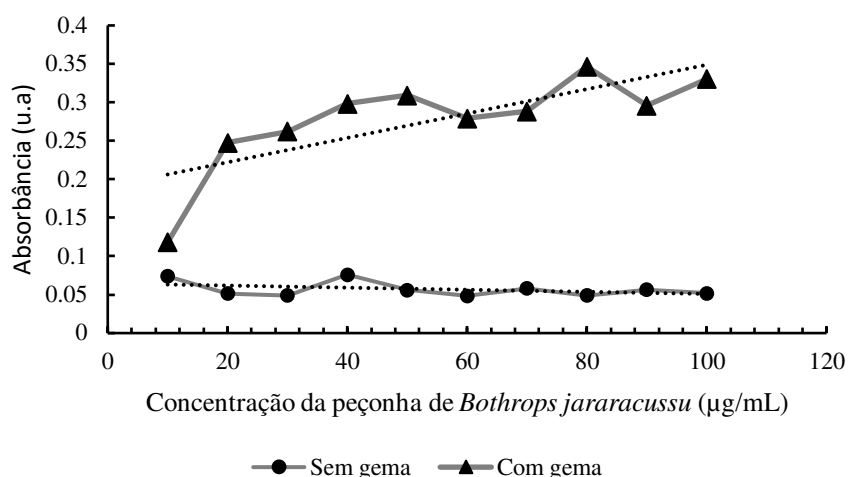


Figura 11 - Influência da concentração da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre a lise de eritrócitos em sangue total na ausência e na presença de gema de ovo. Condições: 100 µL de sangue total; 100 µL de peçonha bruta em concentrações de 10 a 100 mg/mL na ausência e na presença de 20 uL de gema de ovo a 1:9

Conforme demonstrado na figura 11, quando na ausência de gema de ovo, a peçonha bruta não foi capaz de causar um aumento significativo da liberação de hemoglobina no meio, assim como demonstrado nos testes de fragilidade osmótica. Por outro lado, quando se faz a adição da gema, a quantidade de hemoglobina liberada aumenta com o aumento na concentração da peçonha, indicando que a gema de ovo é necessária para a ação da peçonha sobre a membrana eritrocitária.

5.4 Influência do tempo no efeito da peçonha de *Bothrops Jararacussu* sobre o sangue total e eritrócitos lavados

Conforme demonstrado pela Figura 12, mesmo em diferentes tempos de incubação, a peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* não foi capaz de causar um aumento na lise dos eritrócitos quando na ausência do substrato fosfolipídico (gema de ovo). Isso indica que os resultados observados nos testes de fragilidade osmótica, quando na ausência de gema de ovo, não se deram pelo baixo tempo de incubação, mas sim pela ausência de gema na solução, já que ao adicionar esse substrato fosfolipídico, percebe-se um aumento na absorbância, a qual é proporcional ao tempo de incubação, estabilizando-se após 60 minutos.

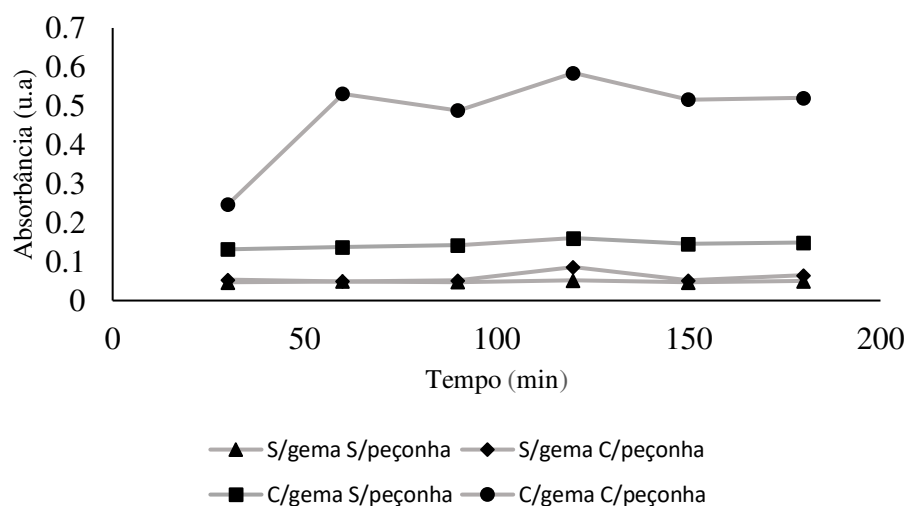


Figura 12 - Influência do tempo na ação da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* sobre sangue, tanto na ausência como na presença de gema de ovo. Condições: 490 μL de solução de NaCl (ausência de gema de ovo), 5 μL de sangue, 5 μL de peçonha bruta [0,3 mg/mL]; 465 μL de solução de NaCl (presença de gema de ovo), 25 μL de gema de ovo 1:4, 5 μL de sangue e 5 μL de peçonha bruta [0,3 mg/mL].

5.5 Coloração de eritrócitos pelo método de Wright

Conforme demonstrado pela Figura 13, na ausência de peçonha e gema, os eritrócitos apresentam a forma típica de disco bicôncavo na ausência de gema e peçonha (A). Na presença da gema de ovo, os eritrócitos preservam a sua forma discoidal (B). Porém, na presença da peçonha e ausência da gema de ovo, pode-se perceber pequena alteração em sua forma (C). Por fim, na presença de peçonha e gema de ovo, a membrana eritrocitária sofre grande alteração morfológica, perdendo sua forma de disco bicôncavo (D).

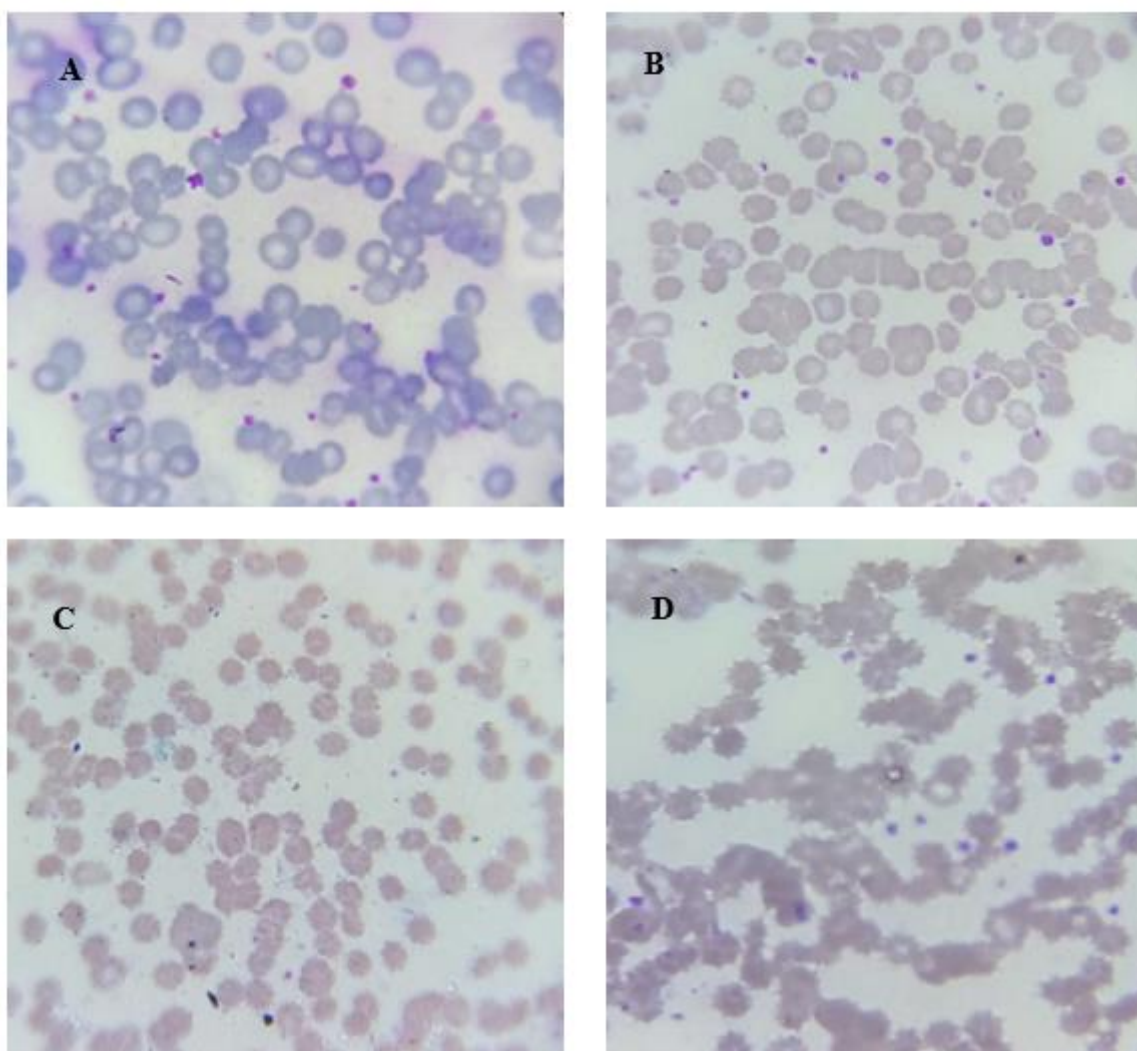


Figura 13 - Imagens de microscopia óptica obtidas após a coloração pelo método de Wright. (A) sangue total; (B) sangue total + gema de ovo (1:4); (C) sangue total + peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* a 0,3 mg/mL; (D) sangue total + gema de ovo (1:4) + peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* a 0,3 mg/mL. As imagens foram obtidas com uma objetiva de 100x

6. DISCUSSÃO

A peçonha da *Bothrops jararacussu* é caracterizada por uma grande quantidade de componentes enzimáticos (ALBUQUERQUE; PAIVA; MARTINS; MENESES *et al.*, 2020), dentre eles pode-se citar a fosfolipase A₂, uma enzima cálcio-dependente que catalisa a clivagem de lipídeos de membrana na região da ligação éster entre o glicerol e o ácido graxo de um glicerofosfolípido (BORGES; SALVADOR; CAMPANELLI; PIMENTA *et al.*, 2021). Os eritrócitos apresentam em sua membrana uma grande quantidade de fosfolípidos e, dentre eles, pode-se citar a fosfatidilcolina, também conhecida como lecitina, que é um substrato comum da fosfolipase A₂, enzima presente na peçonha de serpentes (BORGES;

SALVADOR; CAMPANELLI; PIMENTA *et al.*, 2021; VIRTANEN, 1998). Assim, poder-se-ia esperar que a ação deste importante grupo de enzimas pudesse promover a clivagem destes fosfolipídios, levando a uma desestabilização da membrana eritrocitária, o que resultaria na liberação de hemoglobina no meio.

Ao analisar os resultados da influência da peçonha bruta sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos, na ausência de gema de ovo, percebe-se que o comportamento lítico dos eritrócitos não se alterou, já que o grupo tratado somente com a peçonha de *Bothrops jararacussu* apresentou um comportamento similar ao grupo controle, conforme demonstram as Figuras 6 e 7. Esse comportamento já havia sido observado anteriormente (CAMPOS; PUCCA; RONCOLATO; BERTOLINI *et al.*, 2013) e explicado pelo fato de a ação das fosfolipases A₂ presentes na peçonha bruta, exigir sua penetração na membrana plasmática, o que não tenderia a ocorrer, uma vez que os fosfolipídeos de membrana se encontram densamente empacotados na estrutura da membrana (KINI, 2003).

Por outro lado, a adição da gema de ovo, muito rica em fosfatidilcolina, permite a ação da fosfolipase A₂, levando à formação de ácidos graxos livres e lisolecitina. Como a lisolecitina tem uma conhecida ação caotrópica sobre eritrócitos (BIERBAUM, 1979; CONDREA, 1980; MARIKOVSKY; BROWN; WEINSTEIN; WORTIS, 1976; SILVERMAN; WELLER; SHIN, 1984; WALTON, 1997), ela levaria a uma desestabilização da membrana, aumentando, assim, a capacidade de ligação da fosfolipase A₂ à fosfatidilcolina presente na membrana eritrocitária, o que resultaria na liberação de hemoglobina.

Além desse processo, é possível que esse aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos esteja envolvido com a ativação parcial da via de eriptose dos eritrócitos. Essa via, conforme demonstrado pela Figura 2, é ativada por diversos fatores e um deles está associado ao aumento de prostaglandina E₂, a qual é formada a partir da ação de ciclooxigenase sobre o ácido araquidônico, que é um produto da ação das fosfolipases sobre os fosfolipídios de membrana (FANG; XIA; CHEN; SHEN *et al.*, 2022). Ao adicionar gema de ovo, a PLA₂ presente na peçonha bruta da *Bothrops jararacussu* converte a fosfatidilcolina em lisolecitina e um ácido graxo livre, este último promove o aumento da entrada de Ca⁺⁺ nos eritrócitos, o que ativa canais de potássio que, como consequência de sua abertura, levam a uma entrada ainda maior de Ca⁺⁺, resultando na ativação de escramblases e inibição de flipases, o que levaria a uma desestabilização inicial das membranas e, possivelmente, ao aumento da ação das fosfolipases sobre a membrana dos eritrócitos (FANG; XIA; CHEN; SHEN *et al.*, 2022).

O plasma sanguíneo poderia ter um efeito próprio sobre a estabilidade da membrana dos eritrócitos, já que a presença da peçonha bruta poderia ativar o sistema complemento através

do recrutamento de proteínas como C3a/C3adesArg e C51/C5adesArg, o que poderia levar a uma desestabilização da membrana devido à formação de poros, conforme reportado por Gabrili e colaboradores (GABRILI; PIDDE; MAGNOLI; MARQUES-PORTO *et al.*, 2023). No presente estudo, entretanto, ao comparar os testes de fragilidade osmótica utilizando eritrócitos do sangue total e eritrócitos lavados, ambos sem a presença de gema de ovo, a presença do plasma sanguíneo na amostra de sangue total não afetou a fragilidade da membrana dos eritrócitos, o que somente ocorreu diante da presença de glicerofosfolipídeos exógenos presentes na gema de ovo. A ausência de influência do plasma nos resultados deste estudo pode ter sido decorrente da pequena quantidade de plasma presente na alíquota de sangue total utilizada nos ensaios.

Quando na presença de gema de ovo, a peçonha de *Bothrops jararacussu* também foi capaz de causar aumento da instabilidade de membrana de eritrócitos, o que é comprovado pela liberação de hemoglobina mesmo em concentrações salinas próximas de 0,9 mg/dL. Esse fenômeno está ligado ao fato de que a fosfolipase A₂ é capaz de clivar, quando na presença de gema de ovo, a lecitina presente na membrana dos eritrócitos, o que gera um quadro de instabilidade cada vez maior da membrana com o aumento de sua concentração (KINI, 2003). Ademais, quanto maior o tempo de incubação com a gema de ovo, maior o efeito observado, o que indica que a fosfolipase A₂ converte uma maior quantidade de lecitina em lisolecitina, que, por sua vez, aumenta a instabilidade da membrana, resultando em um aumento da quantidade de hemoglobina liberada.

Ademais, o teste de coloração pelo método de Wright demonstrou que a adição de peçonha, na presença de gema de ovo, foi capaz de causar alterações na forma de disco bicôncavo dos eritrócitos, com a geração de pequenas irregularidades, caracterizadas pela presença de espículas regularmente espaçadas. Este formato de eritrócito, denominado equinócito, é comumente visto quando se tem acidentes com animais peçonhentos, principalmente quando há a presença de fosfolipase A₂, a qual promove danos e remodelagem de membrana plasmática dessas células. Tal efeito está ligado à formação de lisofosfatidilcolina, também chamada de lisolecitina, um composto conhecido por causar não só a equinocitose, mas também a lise de eritrócitos (WALTON, 1997). O acúmulo desse componente na lâmina externa da membrana dos eritrócitos leva à mudança da forma de disco bicôncavo para equinócito e, conseqüentemente, sua conversão em esferoequinócitos, que começam a perder partes da membrana para o meio externo, com a formação de pequenas vesículas ou bolhas, resultando na maior suscetibilidade à lise osmótica (WALTON, 1997).

7. CONCLUSÃO

A *Bothrops jararacussu* é uma das serpentes mais importantes do Brasil; sua peçonha é caracterizada por um conjunto diverso de componentes tanto enzimáticos como não enzimáticos e, dentre eles, cita-se, principalmente, a fosfolipase A₂, uma enzima capaz de catalisar a quebra de fosfolipídeos de membrana. Esta atividade enzimática poderia permitir a ação da peçonha de *Bothrops jararacussu* sobre a membrana plasmática de eritrócitos, aumentando a sua fragilidade osmótica. No entanto, os resultados obtidos neste estudo revelaram que a fosfolipase contida na peçonha bruta de *Bothrops jararacussu*, embora tenha como seu substrato a fosfatidilcolina, amplamente presente na membrana de eritrócitos, não foi capaz de causar hemólise diretamente. Entretanto, ao adicionar um componente fosfolipídico exógeno (gema de ovo), o efeito da fosfolipase não só tornou maior a instabilidade da membrana plasmática de eritrócitos humanos, como também alterou sua forma. Embora esta ação tenha sido observada *in vitro*, na presença de substrato exógeno, sua ocorrência *in vivo* ainda precisa ser estudada. Ademais, uma busca por correlações dos parâmetros de fragilidade osmótica com parâmetros bioquímicos e hematológicos poderia indicar condições mais favoráveis para a ocorrência deste processo. De todo modo, os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o teste de fragilidade osmótica é uma importante ferramenta para o estudo da interação de peçonhas com eritrócitos, além de também representar uma alternativa para o estudo de possíveis inibidores de fosfolipases como estratégia de tratamento de acidentes por peçonhas ofídicas.

8. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 6th. ed. Taylor & Francis Group LLC, 2017. 9780815344322.

ALBUQUERQUE, P.; PAIVA, J.; MARTINS, A. M. C.; MENESES, G. C. *et al.* Clinical assessment and pathophysiology of Bothrops venom-related acute kidney injury: a scoping review. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 26, p. e20190076, 2020.

ALMEIDA, G. O.; DE OLIVEIRA, I. S.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V. Snake venom disintegrins update: insights about new findings. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 29, p. e20230039, 2023.

BARBOSA, A. M. e. a. Effect of Low-Level Laser Therapy in the Myonecrosis Induced by Bothrops jararacussu Snake Venom. **Photomedicine and Laser Surgery**, 27, 2009.

BEZERRA, P. H. A. *et al.* BthTX-I from Bothrops jararacussu induces apoptosis in human breast cancer cell lines and decreases cancer stem cell subpopulation. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, p. e20190010, 2019.

BIERBAUM, T. J. B., S. R.; HUESTIS, W. H. A. A MECHANISM OF ERYTHROCYTE LYSIS BY LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 555, 1979.

BORELLI, P. **Fundamentos de Hematologia**. 1st. ed. 2024. 9786555065442.

BORGES, R. J.; SALVADOR, G. H. M.; CAMPANELLI, H. B.; PIMENTA, D. C. *et al.* BthTX-II from Bothrops jararacussu venom has variants with different oligomeric assemblies: An example of snake venom phospholipases A(2) versatility. **Int J Biol Macromol**, 191, p. 255-266, Nov 30 2021.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical biochemistry**, 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Ministério da Saúde. TABNET. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Acidentes por animais peçonhentos: Casos por ano, segundo o gênero da serpente.** . Ministério da Saúde. Brasília, DF: 28 Jul 2025. 2024.

CAMPOS, L. B.; PUCCA, M. B.; RONCOLATO, E. C.; BERTOLINI, T. B. *et al.* In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian Bothrops spp. venoms. **Toxicon**, 76, p. 1-10, Dec 15 2013.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A Célula**. 4th. ed. 2019.

CASTRO-AMORIM, J.; NOVO DE OLIVEIRA, A.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. *et al.* Catalytically Active Snake Venom PLA(2) Enzymes: An Overview of Its Elusive Mechanisms of Reaction. **J Med Chem**, 66, n. 8, p. 5364-5376, Apr 27 2023.

CHAN, Y. S.; CHEUNG, R. C. F.; XIA, L.; WONG, J. H. *et al.* Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, 100, n. 14, p. 6165-6181, Jul 2016.

CONDREA, E. Solubilization of human red cell membranes by lysolecithins of various chain lengths. **Experientia**, 36, n. 5, p. 531-533, May 15 1980.

CORREA-NETTO, Carlos *et al.* Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, 2010.

COURNIA, Z.; ALLEN, T. W.; ANDRICIOAEI, I.; ANTONNY, B. *et al.* Membrane Protein Structure, Function, and Dynamics: a Perspective from Experiments and Theory. **J Membr Biol**, 248, n. 4, p. 611-640, Aug 2015.

CUNHA, L. M. Estresse oxidativo em indivíduos com diabetes mellitus e alterações provocadas na membrana celular. **E-RACE-REVISTA DA REUNIÃO ANUAL DE CIÊNCIA E EXTENSÃO**, 2024.

CURATOLO, W. The physical properties of glycolipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, 1987.

DAYANA V. P. DI NUZZO1, S. F. F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, 2004.

DE OLIVEIRA, S.; SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. **Clin Hemorheol Microcirc**, 44, n. 1, p. 63-74, 2010.

DOLTCHINKOVA, V.; STOYLOV, S.; ANGELOVA, P. R. Viper toxins affect membrane characteristics of human erythrocytes. **Biophys Chem**, 270, p. 106532, Mar 2021.

FANG, M.; XIA, F.; CHEN, Y.; SHEN, Y. *et al.* Role of Eryptosis in Hemorrhagic Stroke. **Front Mol Neurosci**, 15, p. 932931, 2022.

FERREIRA, T. L.; RULLER, R.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. Insights on calcium-independent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA2 using tryptophan scanning mutagenesis of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 90, n. 9, p. 1397-1406, Sep 2008.

GABRILI, J. J. M.; PIDDE, G.; MAGNOLI, F. C.; MARQUES-PORTO, R. *et al.* New Insights into Immunopathology Associated to *Bothrops lanceolatus* Snake Envenomation: Focus on PLA(2) Toxin. **Int J Mol Sci**, 24, n. 12, Jun 9 2023.

GARG, N.; KAMAL, C. M. Advancements on Substitution of In Vivo Method(s) with In Vitro Method(s) for Recombinant Human Erythropoietin Potency Assays. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 31, n. 2, 2025.

GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q. *et al.* Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, 60, n. 3, p. 302-311, Sep 1 2012.

GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, 1995.

GUTIERREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A. *et al.* Snakebite envenoming. **Nat Rev Dis Primers**, 3, p. 17063, Sep 14 2017.

GUTIERREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon**, 54, n. 7, p. 976-987, Dec 1 2009.

HABIB, A. G.; BROWN, N. I. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. **Toxicon**, 150, p. 115-123, Aug 2018.

HATTON, I. A.; GALBRAITH, E. D.; MERLEAU, N. S. C.; MIETTINEN, T. P. *et al.* The human cell count and size distribution. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 120, n. 39, p. e2303077120, Sep 26 2023.

HEIREMAN, L.; VAN GEEL, P.; MUSGER, L.; HEYLEN, E. *et al.* Causes, consequences and management of sample hemolysis in the clinical laboratory. **Clin Biochem**, 50, n. 18, p. 1317-1322, Dec 2017.

HIMBERT, S.; RHEINSTADTER, M. C. Structural and mechanical properties of the red blood cell's cytoplasmic membrane seen through the lens of biophysics. **Front Physiol**, 13, p. 953257, 2022.

HORN, A.; JAISWAL, J. K. Structural and signaling role of lipids in plasma membrane repair. **Curr Top Membr**, 84, p. 67-98, 2019.

JELOKHANI-NIARAKI, M. Membrane Proteins: Structure, Function and Motion. **Int J Mol Sci**, 24, n. 1, Dec 27 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 10th. ed. 2023. 416 p. 852773933X.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J**, 278, n. 23, p. 4544-4576, Dec 2011.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, 42, n. 8, p. 827-840, Dec 15 2003.

KLINKEN, S. P. Red blood cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2002.

KUHN, V.; DIEDERICH, L.; KELLER, T. C. S. t.; KRAMER, C. M. *et al.* Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. **Antioxid Redox Signal**, 26, n. 13, p. 718-742, May 1 2017.

- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 42, n. 8, p. 885-901, Dec 15 2003.
- LOVINGER, D. M. Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. **Alcohol Res Health**, 31, n. 3, p. 196-214, 2008.
- LU, S. J.; FENG, Q.; PARK, J. S.; VIDA, L. *et al.* Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. **Blood**, 112, n. 12, p. 4475-4484, Dec 1 2008.
- MARIKOVSKY, Y.; BROWN, C. S.; WEINSTEIN, R. S.; WORTIS, H. H. Effects of lysolecithin on the surface properties of human erythrocytes. **Exp Cell Res**, 98, n. 2, p. 313-324, Mar 15 1976.
- MELLENDEZ-MARTINEZ, D.; MUNOZ, J. M.; BARRAZA-GARZA, G.; CRUZ-PEREZ, M. S. *et al.* Rattlesnake *Crotalus molossus nigrescens* venom induces oxidative stress on human erythrocytes. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 23, p. 24, 2017.
- MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, 112, n. 10, p. 3939-3948, Nov 15 2008.
- MORAS, M.; LEFEVRE, S. D.; OSTUNI, M. A. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. **Front Physiol**, 8, p. 1076, 2017.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 8th. ed. 2021.
- NIGRA, A. D.; CASALE, C. H.; SANTANDER, V. S. Human erythrocytes: cytoskeleton and its origin. **Cell Mol Life Sci**, 77, n. 9, p. 1681-1694, May 2020.
- NIRTHANAN, S. Snake three-finger alpha-neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms and medicine. **Biochem Pharmacol**, 181, p. 114168, Nov 2020.
- OFFOR, B. C.; MULLER, B.; PIATER, L. A. A Review of the Proteomic Profiling of African Viperidae and Elapidae Snake Venoms and Their Antivenom Neutralisation. **Toxins (Basel)**, 14, n. 11, Oct 22 2022.
- OLAIBA, O. T.; KARINA DOS SANTOS, P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; FERREIRA DE SOUZA, D. H. Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. **Toxicon X**, 7, p. 100052, Sep 2020.
- OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Structures and Functions of Snake Venom Metalloproteinases (SVMP) from Protobothrops venom Collected in Japan. **Molecules**, 22, n. 8, Aug 4 2017.
- PINTO, E. K. R. *et al.* Caracterização funcional e estrutural de toxinas provenientes da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* e influência do varespladib. 2023

PRISCILA MURADOR, E. D. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2007.

QIN, W. G.; ZHUO, Z. P.; HU, H.; LAY, M. *et al.* Proteomic characteristics of six snake venoms from the Viperidae and Elapidae families in China and their relation to local tissue necrosis. **Toxicon**, 235, p. 107317, Nov 2023.

SARKAR, S.; BOSE, D.; GIRI, R. P.; MUKHOPADHYAY, M. K. *et al.* Status of Membrane Asymmetry in Erythrocytes: Role of Spectrin. **Adv Exp Med Biol**, 1112, p. 3-11, 2018.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W. *et al.* Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, 250, p. 1541-1546, 1990.

SERGIO LIZANO, G. L., Michel Lazdunski Cloning and cDNA sequence analysis of Lys49 and Asp49 basic phospholipase A2 myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 2000.

SHENG, M.; WYSZYNSKI, M. Ion channel targeting in neurons. **Bioessays**, 19, n. 10, p. 847-853, Oct 1997.

SHIH, H. M.; WU, C. J.; LIN, S. L. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. **J Formos Med Assoc**, 117, n. 11, p. 955-963, Nov 2018.

SILVERMAN, B. A.; WELLER, P. F.; SHIN, M. L. Effect of erythrocyte membrane modulation by lysolecithin on complement-mediated lysis. **J Immunol**, 132, n. 1, p. 386-391, Jan 1984.

SOUZA, T. C.; FARIAS, B. E. S.; BERNARDE, P. S.; CHIARAVALOTTI NETO, F. *et al.* Temporal trend and epidemiological profile of accidents involving venomous animals in Brazil, 2007-2019. **Epidemiol Serv Saude**, 31, n. 3, p. e2022025, 2022.

SPROVIERI, P.; MARTINO, G. The role of the carbohydrates in plasmatic membrane. **Physiol Res**, 67, n. 1, p. 1-11, Mar 16 2018.

TAN, S.; TAN, H. T.; CHUNG, M. C. Membrane proteins and membrane proteomics. **Proteomics**, 8, n. 19, p. 3924-3932, Oct 2008.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A current perspective on snake venom composition and constituent protein families. **Arch Toxicol**, 97, n. 1, p. 133-153, Jan 2023.

TÁSSIA R COSTA, S. M. B., Danilo L Menaldo, Fabíola A de Castro and Suely V Sampaio. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 20, 2014.

TSIFTSOGLU, A. S. Erythropoietin (EPO) as a Key Regulator of Erythropoiesis, Bone Remodeling and Endothelial Transdifferentiation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Implications in Regenerative Medicine. **Cells**, 10, n. 8, Aug 20 2021.

VIRTANEN, J. A. C., Kwan Hon; SOMERHARJU, Pentti. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1998.

VYAS, V. K.; BRAHMBHATT, K.; BHATT, H.; PARMAR, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pac J Trop Biomed**, 3, n. 2, p. 156-162, Feb 2013.

WAHEED, H.; MOIN, S. F.; CHOUDHARY, M. I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. **Curr Med Chem**, 24, n. 17, p. 1874-1891, 2017.

WALTON, R. M. e. a. Mechanisms of echinocytosis induced by *Crotalus atrox* venom. **Veterinary pathology**, 1997.

WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, 19, p. 113-147, Aug 31 2018.

XIAO, H.; PAN, H.; LIAO, K.; YANG, M. *et al.* Snake Venom PLA(2), a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. **Biomed Res Int**, 2017, p. 6592820, 2017.

XIE, C.; BITTENBINDER, M. A.; SLAGBOOM, J.; ARRAHMAN, A. *et al.* Erythrocyte haemotoxicity profiling of snake venom toxins after nanofractionation. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 1176, p. 122586, Jun 30 2021.

YAMAMOTO, K.; HAKOI, H.; NOMURA, S.; MURAKAMI, M. The Roles of sPLA(2)s in Skin Homeostasis and Disease. **Biomolecules**, 13, n. 4, Apr 12 2023.

YANG, S. T.; KREUTZBERGER, A. J. B.; LEE, J.; KIESSLING, V. *et al.* The role of cholesterol in membrane fusion. **Chem Phys Lipids**, 199, p. 136-143, Sep 2016.

ZHANG, J.; LI, Q.; WU, Y.; WANG, D. *et al.* Cholesterol content in cell membrane maintains surface levels of ErbB2 and confers a therapeutic vulnerability in ErbB2-positive breast cancer. **Cell Commun Signal**, 17, n. 1, p. 15, Feb 20 2019.