



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS DA ZOOTOXINA DE *Philodryas patagoniensis* (SERPENTE: DIPSADIDAE)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Márcio Tavares Costa**

**Uruguaiana, RS, Brasil  
2016**

**MÁRCIO TAVARES COSTA**

**AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS DA ZOOTOXINA DE *Philodryas patagoniensis* (SERPENTE: DIPSADIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr.  
Vanderlei Folmer

**Uruguiana**

**2016**

C837a Costa, Márcio Tavares  
AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS DA ZOOTOXINA DE *Philodryas*  
*patagoniensis* (SERPENTE: DIPSADIDAE) / Márcio Tavares Costa.  
62 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2016.

"Orientação: Vanderlei Folmer".

1. Colubridae. 2. Leucócitos. 3. Tripan. 4. Ensaio Cometa.  
5. TBARS. I. Título.

MÁRCIO TAVARES COSTA

**AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS DA ZOOTOXINA DE *Philodryas patagoniensis* (SERPENTE: DIPSADIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

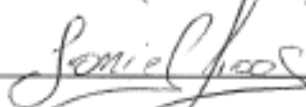
Área de concentração:  
Ciências Biológicas II.

**Dissertação defendida e aprovada em: 15 de julho de 2016.**

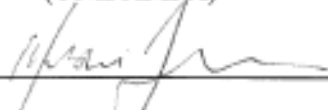
**Banca examinadora:**



Prof. Dr. Vanderlei Folmer  
Orientador  
(UNIPAMPA)



Prof. Dr. Daniel Henrique Roos  
(UNIPAMPA)



Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum  
(UNIPAMPA)

*In memoriam...*  
Amélia Maria Tavares Costa e Paulo Roberto Costa;  
Meus pais, amigos e mestres.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Paulo e Amélia, pelo amor, ensinamentos e valores passados que me guiam e me guiarão durante minha vida. Obrigado por me fazerem estudar no momento certo!

À minha eterna namorada, Luciana, pelo amor, carinho e apoio. À sua paciência, que foi pré-requisito em inúmeros momentos ao longo desses anos. À Alanis, minha enteada, pela tolerância que teve neste período, restringindo-se de muitas coisas para estar aqui. Amo vocês!

Ao meu irmão e minhas irmãs que, mesmo de longe, sempre me apoiaram. Me deram a força e incentivo que somente a família é capaz de dar. Além daquela garra que somente um membro do Quarteto Fantástico reconhece! Sem esquecer é claro da minha sobrinha Jú!

A todos colegas e amigos que tive a oportunidade de trabalhar no Programa de Pós-Graduação dentro e fora do laboratório, e que me acolheram e ajudaram de forma fantástica. Em especial a Aline da Silva, Andréia Salgueiro, Hemerson Rosa, Deividi Soares, Giselle Perazzo, Antônio Galarça, Claudia Pessano, Clarissa del Rosso, Diogo Bicca, Salette Santana e ao Matheus Bianchini; pois este trabalho tem um pouco de todos que ajudaram nas experimentações, na escrita ou, discutindo resultados e possibilidades. Obrigado!

Aos corajosos que me ajudaram nas coletas das serpentes em campo: Giancarlo Ribeiro Bilo, Edward Pessano, Danilo Araújo, Dérick Noronha e Marcus Querol; têm minha gratidão.

Não poderia esquecer os colegas do grupo GENSQ, como a Marlise Grecco, que me acolheram e incentivaram de forma única.

Agradeço a todos os professores do PPG-Bioquímica que contribuíram para que eu possa estar aqui.

À UNIPAMPA, que me acolhe profissionalmente. Além do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que também me acolhe, mas como discente.

Agradeço às equipes dos Laboratórios de Biologia e Diversidade Animal, de Bioquímica e Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos e de Virologia pelo espaço disponibilizado para a realização dos ensaios.

E, um agradecimento mais que especial ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei Folmer que, mesmo sem me conhecer, me acolheu e me proporcionou esta chance de crescer, como profissional, como discente, e como pessoa.

Como podemos ver, não realizamos nada sozinhos. A tod@s, meus mais sinceros agradecimentos!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Fundação Universidade Federal do Pampa

### **AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS DA ZOOTOXINA DE *Philodryas patagoniensis* (SERPENTE: DIPSADIDAE)**

Autor: Márcio Tavares Costa

Orientador: Vanderlei Folmer

Data e Local da Defesa: Uruguaiiana, 15 de julho de 2016

*Philodryas patagoniensis* é uma serpente opistóglifa comum no Rio Grande do Sul. Sua peçonha, produzida na glândula Duvernoy, constitui-se basicamente por metaloproteinases. Compostos biologicamente ativos que, assim como outros extratos naturais, são alvos de pesquisas na busca por agentes farmacológicos. No entanto, em conjunto, os mesmos devem passar por testes para caracterizar seus efeitos toxicológicos. Estes exames permitem definir se o composto analisado é capaz de causar danos à saúde humana, diagnosticar seus possíveis locais de ação, além de apontar tratamentos em casos de intoxicações e envenenamentos. Assim, a presente dissertação visa avaliar os potenciais toxicológicos da peçonha de *P. patagoniensis*: citotoxicologia e genotoxicologia. Para tanto, espécimes de *P. patagoniensis* foram capturados para a extração da zootoxina, a qual teve sua concentração proteica determinada por método colorimétrico de Bradford. A determinação da toxicidade aguda foi realizada em *Artemia salina*. Para avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade utilizou-se o teste de exclusão de azul de Tripán e ensaio Cometa em leucócitos mononucleares humanos, respectivamente. Ao final, testou-se a presença de atividade DNase na peçonha via difusão radial em agarose, e sua capacidade de gerar estresse oxidativo em náuplios de *A. salina*. Os resultados indicaram uma concentração proteica média de 115,7 mg/mL nos pools de veneno extraídos, os quais apresentaram uma DL<sub>50</sub> de 461 µg/mL em *A. salina*, dose que o caracteriza como tóxico para este modelo experimental. Ao testar a toxina nas concentrações de 55, 110, 220, 575 e 1150 µg/mL, sua capacidade citotoxicológica e genotoxicológica foi significativa nas duas maiores concentrações. A atividade DNase foi ausente, no entanto, o estresse oxidativo foi detectado pela presença de biomarcadores. Foi possível estabelecer uma relação direta entre a toxicidade aguda em *A. salina*, a citotoxicidade e a genotoxicidade apurada, pois as doses

letais para as artêmias causaram danos significativos, enquanto que as subletais não obtiveram diferença expressiva. Entre as possíveis razões para esta toxicidade, o estresse oxidativo desencadeado pela zootoxina demonstra estar relacionado aos danos encontrados.

*Palavras-chaves:* Colubridae; Leucócitos; Tripan; Ensaio Cometa; TBARS; Pampa



## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Biochemistry  
Federal University of Pampa

### **TOXICOLOGICAL EVALUATIONS OF THE ZOOTOXIN OF *Philodryas patagoniensis* (SNAKE: DIPSADIDAE)**

AUTHOR: Márcio Tavares Costa

ADVISOR: Vanderlei Folmer

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, July 15<sup>th</sup>, 2016.

*Philodryas patagoniensis* is a common opisthoglyphous serpent in Rio Grande do Sul State. Its venom produced in Duvernoy's gland consists mainly of metalloproteinases. Compounds biologically active which, like other natural extracts, are research targets in pursuit of pharmacological agents. However, together, should go through tests to characterize their toxicological effects. These tests allow you to define whether the analysed compound is able to cause damage to human health, diagnose its possible sites of action, in addition to point treatments in cases of intoxications and poisonings. Thus, the dissertation aims to evaluate the potential toxicity of *P. patagoniensis* venom: cytotoxicology and genotoxicology. Therefore, *P. patagoniensis* specimens were captured for the extraction of the zootoxin, which had its protein concentration determined by Bradford colorimetric method. Determination of acute toxicity was conducted in *Artemia salina*. To assess the cytotoxicity and genotoxicity used the exclusion of Trypan blue test and Comet assay in human mononuclear leukocytes, respectively. Finally, tested the presence of DNase activity in the venom via radial diffusion in agarose, and venom's ability to generate oxidative stress in nauplii of *A. salina*. The results indicated a mean protein concentration of 115.7 mg/mL in pools of venom extracted, which showed an LD<sub>50</sub> of 461 µg/mL in *A. salina*, dose that characterizes as toxic to this experimental model. When the toxin was tested at concentrations of 55, 110, 220, 575 and 1150 µg/ml, its cytotoxicology and genotoxicology capacity were significant in two largest concentrations. The DNase activity was absent, however, oxidative stress was detected by the presence of biomarkers. It was possible to establish a direct relationship between the acute toxicity in *A. salina*, cytotoxicity and genotoxicity found, because the lethal doses for brine shrimp caused significant damage, while

sublethal did not obtain significant difference. Among the possible reasons for this toxicity, oxidative stress triggered by zootoxin shown to be related to the damage found.

*Keywords:* Colubridae; Leucocytes; Trypan; Comet Assay; TBARS; Pampa

# Lista de abreviaturas

**EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio

**DL<sub>50</sub>** - Dose Letal 50%

**DNA** - Ácido Desorribonucleico

**DNase** - Desoxirribonuclease

**HO<sup>•</sup>** - Radical Hidroxila

**OS** - Estresse Oxidativo

**MDA** - Malondialdeído

**NPSH** - Grupo Tiol Não-Proteico

**PBS** - Tampão Fosfato-Salino

**PBMC** – Células Mononucleares do Sangue Periférico

**SEM** - Erro Padrão da Média

**SH** - Equivalentes de Glutathione

**SPS-PAGE** - Dodecilsulfato de Sódio-Poliacrilamida de Eletroforese em Gel

**SVMPs** - Metaloproteinases Derivados do Veneno de Serpentes

**TBARS** - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

# Lista de tabelas

<b>Table 1.</b> Classification of DNA damage in the cell comets.....	35
----------------------------------------------------------------------	----

## Lista de ilustrações

- Figura 1.** Exemplar da espécie *Philodryas patagoniensis* encontrado na Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana..... 15
- Figura 2.** Imagem com as quatro dentições típicas presentes nas serpentes: Áglifa (A); Opistóglifa (B); Proteróglifa (C) e Solenóglifa (D). Podemos analisar os desenhos das presas típicas de cada dentição (E), com a presença de sulcos e canais para a inserção da peçonha. Imagem adaptada de Martins, 1917..... 16
- Figura 3.** (A) Esquema ilustrativo da glândula supralabial (GSL) e da glândula Duvernoy (GD); (B) células dos túbulos secretores (TS) da glândula de Duvernoy em vermelho e células dos ductos excretores (DE) principal e secundários em azul (180x). Imagem adaptada de Serapicos e Merusse, 2006..... 17
- Figura 4.** Cinco tipos de leucócitos do sangue humano. Os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, além dos grânulos, apresentam o núcleo lobulado. E constituem o grupo dos leucócitos polimorfonucleares. Os linfócitos e monócitos, grupo dos leucócitos mononucleares, são agranulares e apresentam núcleo não lobulado. Imagem adaptada de Junqueira e Carneiro, 2004..... 22
- Figure 5.** The map show location of the Uruguaiana city, in RS, Brazil. Belonging to the Pampas Biome, presents in it is scenario the Uruguay River..... 32
- Figure 6.** Image illustrating the fanged of *Philodryas patagoniensis*. An opisthogyphous snake..... 33
- Figure 7.** Logarithmic curve illustrating survival rate of *A. salina* nauplii regarding concentration of venom. Setting the LD<sub>50</sub> in 461 µg/mL..... 37
- Figure 8.** Test in vitro cell viability by human mononuclear leukocytes. Note that in the higher concentrations are significant differences in relation to saline (negative control). From the concentrations less or equal to 1:500 there was no cell unviable (ANOVA, post hoc Bonferroni Test - \*p ≤ 0.01 vs saline)..... 38
- Figure 9.** Genotoxicity test using comet assay in human mononuclear leukocytes. The highest concentrations of the toxin are those with significant DNA damage (non-parametric analysis of Kruskal-Wallis with Dunn's Test - \*p ≤ 0,05). ..... 39
- Figure 10.** Oxidative stress provided by *P. patagoniensis* venom in nauplii of *A. salina* – ANOVA, post hoc Bonferroni Test (\*p ≤ 0,05). (A) Measurement of thiol group non-protein. (B) Ratio MDA found in nauplii after treatment. .... 40

# Sumário

APRESENTAÇÃO .....	12
<b>PARTE I</b>	
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Biologia da <i>P. patagoniensis</i> .....	15
2.2 Dentições das serpentes.....	16
2.3 Glândula Duvernoy .....	17
2.4 Peçonha da <i>Philodryas patagoniensis</i> .....	18
2.5 Modelo de <i>Artemia salina</i> .....	19
2.6 Toxicologia: Citotoxicidade e Genotoxicidade.....	20
2.7 Enzima DNase.....	22
2.8 Estresse Oxidativo.....	23
3 JUSTIFICATIVA.....	26
4 OBJETIVOS .....	27
4.1 Objetivo Geral.....	27
4.2 Objetivos Específicos.....	27
<b>PARTE II</b>	
5 MANUSCRITO .....	28
ABSTRACT .....	29
1. Introduction.....	30
2. Materials and methods .....	32
3. Results and Discussion.....	36
4. Conclusions.....	41
Acknowledgments.....	42
References .....	42
<b>PARTE III</b>	
DISCUSSÃO.....	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
PERSPECTIVAS .....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO I: Submissão de manuscrito a revista TOXICON .....	62

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes:

Na **PARTE I** encontram-se os tópicos **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, nos quais estão descritas informações sobre os temas abordados. Além desses, localiza-se na primeira parte a **JUSTIFICATIVA** e os **OBJETIVOS** deste trabalho.

As seções **MATERIAIS E MÉTODOS**, **RESULTADOS E DISCUSSÃO** e as respectivas **REFERÊNCIAS** estão apresentadas sob a forma de manuscrito, os quais se encontram no item **MANUSCRITO**, compondo a **PARTE II**. Este manuscrito reflete os resultados deste trabalho. O mesmo foi submetido a revista *Toxicon*, qualis B1 na área Ciências Biológicas II (ANEXO I).

As seções **DISCUSSÃO**, **CONSIDERAÇÕES FINAIS**, **PERSPECTIVAS** e **REFERÊNCIAS** encontram-se na **PARTE III**. Esta última lista de referências aponta as citações utilizadas na **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação. As **PERSPECTIVAS** correspondem aos possíveis estudos que podem ser realizados para dar continuidade a esta pesquisa.

## 1 INTRODUÇÃO

*Philodryas patagoniensis*, conhecida como paralheira ou papa-pinto, é uma espécie de serpente da família Dipsadidae, comum no Rio Grande do Sul, que também pode ser encontrada até o Rio Grande do Norte, Argentina, Uruguai e Bolívia. Estas serpentes podem atingir 1,6m de comprimento. Possuem denteção opistóglifa que, juntamente com sua saliva tóxica, está envolvida na biologia alimentar atuando como mecanismo complementar na captura de suas presas. As quais constituem-se basicamente de anfíbios, podendo também abranger peixes, lagartos, roedores, aves, marsupiais, além de outras cobras (QUINTELA; LOEBMANN, 2009; ABEGG; NETO, 2012).

Estudos demonstram que cerca de 20 a 40% dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por espécies da família Dipsadidae, maior família de serpentes no Brasil. E os principais gêneros envolvidos são *Helicops*, *Oxyrhopus*, *Thamnodynaster* e *Philodryas* (SILVEIRA; NISHOKA, 1992; CARVALHO; NOGUEIRA, 1998; SANTOS-COSTA et al., 2001; SALOMÃO, 2003; PUORTO; FRANÇA, 2003). De acordo com o Relatório Anual de Atendimento realizado pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul ocorreram em 2013 e 2014, respectivamente, 824 e 803 casos de exposição humana a ofídios no estado. Ao todo, estes anos somam três registros de óbitos devido a acidente envolvendo o gênero *Bothrops*. Os casos de acidentes ofídicos permanecem entre de maior frequência, juntamente com os acidentes envolvendo aranhas e lagartas (NICOLELLA et al., 2013; 2014).

Ao considerar os números de acidentes significativos, Talan e colaboradores (1991) enfatizam a baixa incidência de infecções bacterianas nos envenenamentos causados por serpentes. Somado a estudos que avaliam ações antibacterianas e farmacológicas das toxinas das mesmas, e constata resultados positivos, como Mosca (2008) o fez ao testar peçonhas de diversas espécies de serpentes e demonstrar que 25% dessas apresentam potencial antibacteriano, cada vez mais a ciência direciona-se para os compostos produzidos por animais. Desta forma, as peçonhas de cobras entram com grande potencialidade nesta lista, onde o maior exemplo de sucesso é o Captopril, um fármaco inibidor da enzima conversora da angiotensina I isolado da peçonha de *Bothrops jararaca* e utilizado no tratamento de hipertensão arterial (ENNA et al., 2008).

No entanto, ao avaliar o aspecto farmacológico de um composto, faz-se necessário o acréscimo do conhecimento toxicológico. De modo que seus potenciais benefícios sejam enfatizados, mas também habilite entender e bloquear suas ações tóxicas. Em ambas as áreas, farmacológica e toxicológica, sabe-se que serpentes solenóglifas são alvos comuns de muitas



investigações relacionadas às toxinas, porém pouco se conhece sobre a composição e atividades biológicas das peçonhas de opistóglifas, em especial a serpente em questão, *P. patagoniensis*.

As principais consequências do envenenamento ocasionado por cobras, como edemas, deterioração da matriz extracelular, necrose, inflamação e processos hemorrágicos - inibição da agregação plaquetária, degradação dos fatores de coagulação - são melhor estudados (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Entretanto, os processos envolvendo estas zootoxinas ainda apresentam um leque a ser examinado. Testes biológicos como de toxicidade aguda para determinação da dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) em invertebrados, genotoxicidade, viabilidade celular e estresse oxidativo (OS) ainda são pouco explorados nas pesquisas envolvendo peçonhas oriundas de ofídios. Ensaio necessários para o conhecimento sobre os efeitos específicos causados pelo veneno e que também demonstram como a saúde humana pode ser afetada.

Alguns destes ensaios apresentam determinadas peculiaridades. Botham (2004) relata que a determinação da  $DL_{50}$  foi utilizada pela primeira vez em 1927, amplamente aceita na década de 1970 e, em vertebrados, está desuso desde 2002. Técnica baseada na determinação da concentração do composto testado necessária para levar a morte 50% dos animais tratados, vai de encontro ao bem-estar animal. Contudo, permite a comparação entre extratos, além de auxiliar no estabelecimento das melhores doses a serem trabalhadas em um experimento, justificando a utilização da técnica em modelos experimentais alternativos. Já para avaliar os danos genéticos existe o método do Ensaio Cometa, uma metodologia onde o DNA é depositado em micro-gel para eletroforese para, após, ter suas imagens mensuradas de forma proporcional a razão “cauda/núcleo”. Estas imagens sugerem danos, como os ocasionados pelo OS, que pode interromper o ciclo celular e fazer com que ocorra apoptose ou necrose da célula. Esta citotoxicidade pode ser analisada pelo teste de viabilidade celular, o qual retrata o percentual de células que não conseguem realizar a sua manutenção diante do agente estressor e tornam-se inviáveis. O OS por sua vez, tem sua presença constatada nos ensaios por meio de biomarcadores de estresse, como alterações nos grupos tióis e nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Estes testes formam a base da dissertação, que visa avaliar o perfil toxicológico da peçonha de *P. patagoniensis* a nível celular e genético. Bem como, avaliar as causas que podem estar relacionadas a esta cito e genotoxicidade.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biologia da *P. patagoniensis*

O gênero *Philodryas* pertence à família Dipsadidae e é caracterizado por espécies arborícolas. No entanto, a *P. patagoniensis* (Figura 1) é uma espécie comum em áreas abertas do Bioma Pampa, fundamentalmente terrícola, abrangendo hábitos arborícolas ao forragear (LEMA, 2002). Diurna, sua coloração amarronzada confere camuflagem. Apresenta dimorfismo sexual em espécimes adultos – as fêmeas apresentam corpo mais longo e maior corpulência, enquanto que os machos se caracterizam pela presença de uma cauda maior em comparação com as fêmeas (HARTMANN; MARQUES, 2005). As fêmeas também nascem com o comprimento rostro-cloacal maior e atingem a maturidade sexual mais tardiamente do que o macho, após o segundo ano de vida; enquanto que o macho pode atingir a maturidade ainda no primeiro ano (PONTES, 2007). A reprodução é sazonal, com a época vitelogênica ocorrendo entre os meses de julho e outubro (LÓPEZ; GIRAUDO, 2008).

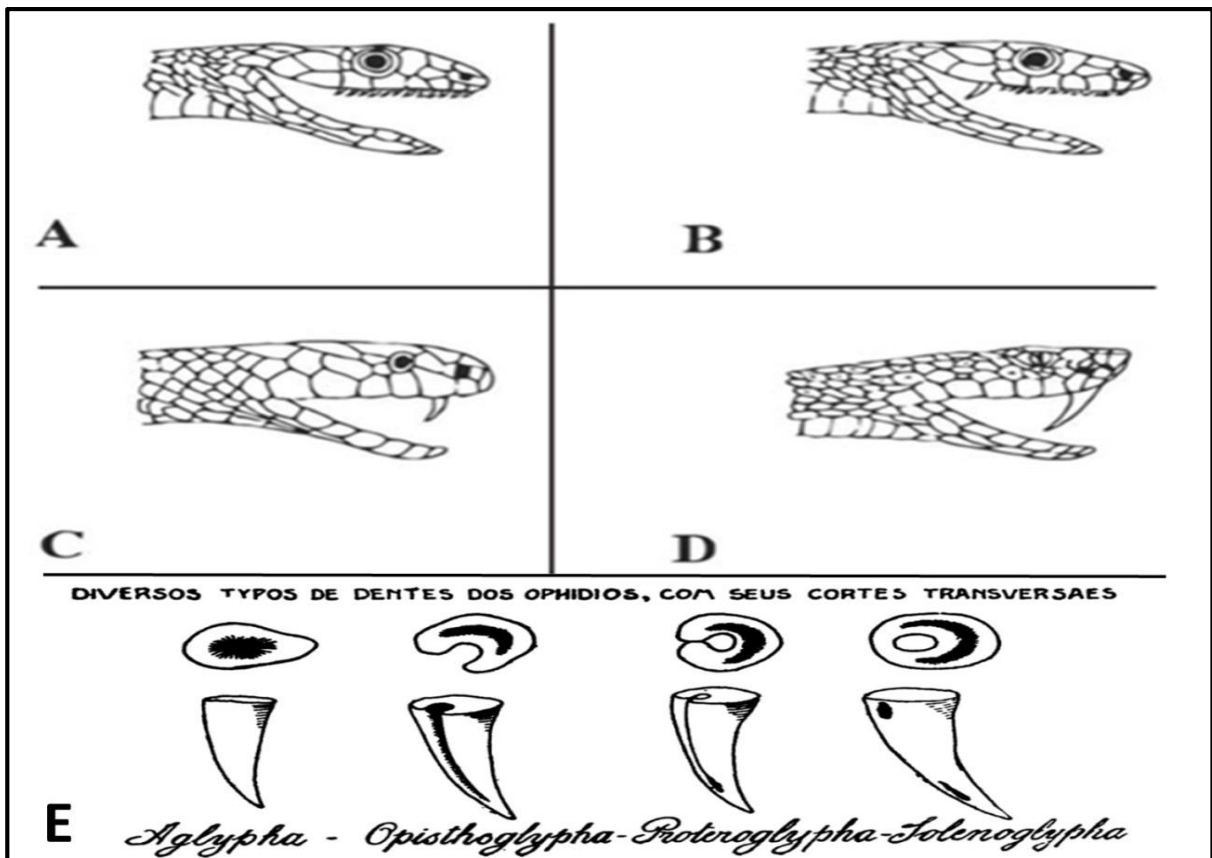


**Figura 1.** Exemplar da espécie *Philodryas patagoniensis* encontrado na Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiiana.

Seu hábito alimentar é generalista, e pode abranger outros ofídios, inclusive da própria espécie (MARQUES et al., 2012; ABEGG; NETO, 2012). No entanto, há diferenças ontogenéticas na alimentação: os jovens preferem animais ectotérmicos, e a medida que crescem incluem animais endotérmicos (HARTMANN; MARQUES, 2005; LÓPEZ; GIRAUDO, 2008). Como presa, a *P. patagoniensis* pode ser predado por aves como a seriema, *Cariama cristata*, e a coruja suindara, ou coruja-de-igreja, *Tyto alba* (CARDOSO; SANTOS, 2012); além de outras espécies de serpentes, como a *Boiruma maculata* (PINTO; LEMA, 2002).

## 2.2 Dentições das serpentes

Os ofídios apresentam quatro tipos básicos de dentição (Figura 2). A mais simples denomina-se dentição áglifa, caracterizada pela ausência de dentes inoculadores de peçonha e de glândula de veneno. Exemplos mais conhecidos no Brasil desta categoria são as jiboias (*Boa constrictor*) e as sucuris (*Eunectes sp.*). Uma segunda classificação é dada às serpentes que apresentam um par de dentes inoculares de veneno na porção posterior da maxila. Animais com este aparelho são chamados de opistóglifos, e compreende a categoria da serpente em questão: *P. patagoniensis*. Em seguida temos as proteróglifas, cujos dentes inoculares se localizam na parte anterior da maxila, típicas de corais verdadeiras (*Micrurus sp.*). E, por fim, temos as solenóglifas: serpentes com um par de dentes inoculadores articuláveis na porção anterior da maxila. Pertence a esta última categoria os membros da família Viperidae, como as jararacas (*Bothrops sp.*), cruzeiras (*Bothrops sp.*) e cascáveis (*Crotalus sp.*).

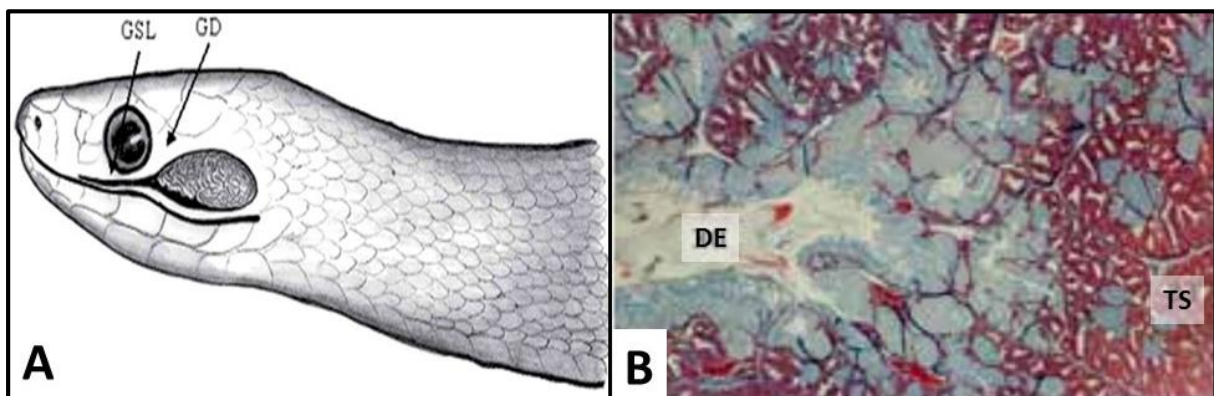


**Figura 2.** Imagem com as quatro dentações típicas presentes nas serpentes: Áglifa (A); Opistóglifa (B); Proteróglifa (C) e Solenóglifa (D). Podemos analisar os desenhos das presas típicas de cada dentição (E), com a presença de sulcos e canais para a inserção da peçonha. Imagem adaptada de Martins, 1917.

### 2.3 Glândula Duvernoy

As diversas características das peçonhas têm sido detalhadamente estudadas ao longo dos anos. No entanto, a tendência da maioria dos estudos é direcionar-se para as famílias Viperidae e Elapidae, consideradas de importância médica. Onde a toxina destes grupos é gerada pela glândula de veneno.

Por outro lado, serpentes opistóglifas, como a *P. patagoniensis*, produzem sua saliva tóxica por meio da glândula Duvernoy (Figura 3). Uma estrutura lobulada, cujos lóbulos são formados por túbulos secretores e que, nesta espécie, apresenta um tamanho maior que a glândula supralabial. Sua toxina, liberada sob estímulo mecânico, mostra-se com uma constituição de aproximadamente 90% de proteína, principalmente metaloproteínases. Somada a presença de glicogênio nos túbulos secretores, a glândula Duvernoy classifica-se como seromucosa. As atividades biológicas de sua toxina são semelhantes às peçonhas botrópicas, de modo que estudos verificaram os efeitos edematogênico, hemorrágico, nociceptivo e de necrose deste composto (ROCHA; FURTADO, 2007; SERAPICOS; MERUSSE, 2006).



**Figura 3.** (A) Esquema ilustrativo da glândula supralabial (GSL) e da glândula Duvernoy (GD); (B) células dos túbulos secretores (TS) da glândula de Duvernoy em vermelho e células dos ductos excretores (DE) principal e secundários em azul (180x). Imagem adaptada de Serapicos e Merusse, 2006.

A semelhança da peçonha gerada pela *P. patagoniensis* e pelos viperídeos também está na avaliação da toxicidade aguda, por meio da determinação da  $DL_{50}$  estabelecidas em camundongos, onde a primeira apresentou uma concentração de 58,58  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , valor próximo ao da *Bothrops jararacussu* (58,8 $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ ). Ainda com relação a  $DL_{50}$  em camundongos, a *P. patagoniensis* mostrou uma toxicidade entre a *B. alternatus* (67,5 $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ ) e a *B. jararaca* (24,7 $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ ) (FURTADO et al, 1991; ROCHA; FURTADO, 2007).

Afinidades como estas gerou uma tendência a acreditar que a glândula Duvernoy seria homóloga a glândula de veneno (KOCHVA, 1978; UNDERWOOD, 1967; KARDONG, 1982).

Embora não seja uma ideia unânime, pois há distinções anatômicas e funcionais entre ambas, é uma linha que prevalece. Contudo, para Kardong (2002), os ofídios que possuem a glândula Duvernoy não são considerados verdadeiramente peçonhentos devido ao seu aparato inoculador de veneno não ser tão especializado quanto o aparato da família Viperidae; carecer de determinadas enzimas; e não apresentar a característica de matar suas presas rapidamente; esta última com algumas exceções, entre elas a do gênero *Philodryas*.

Por fim, a glândula Duvernoy não se limita ao envenenamento da presa, ela auxilia na imobilização e captura da mesma; e, em conjunto, lubrifica o alimento para facilitar a ingestão, inicia a digestão e inibe a putrefação da caça (KOCHVA; GANS, 1970; GANS, 1978).

#### 2.4 Peçonha da *Philodryas patagoniensis*

As peçonhas de origens ofídicas apresentam uma complexa mistura de componentes proteicos e não proteicos (ZELANIS et al., 2010). Que, no caso da família Dipsadidae, pode proporcionar às vítimas de acidente dor, edema, hematomas, hemorragia, necrose muscular, além de efeitos sistêmicos, como tonturas e vômitos (ASSAKURA et al., 1992; PRADO-FRANCESCHI et al., 1996; 1998; ARAÚJO; SANTOS, 1997; RIBEIRO et al., 1999; MEDEIROS et al., 2010).

Alguns destes efeitos já são bem conhecidos, como o hemorrágico, constatado nos casos de exposição à *P. patagoniensis* (ROCHA; FURTADO, 2007). Sintoma provocado por metaloproteinases derivadas do veneno das serpentes (SVMPs), que degradam as proteínas da membrana basal dos vasos sanguíneos, resultando numa perda de integridade capilar e conduzindo ao sangramento local. Implicações agravadas pelas enzimas fibrinogenolíticas, que reduzem o fibrinogênio do plasma por hidrólise e impedem a coagulação (ACOSTA et al, 2003; PEICHOTO et al, 2005).

Sabe-se que as SVMPs constituem as principais proteínas responsáveis pelos sintomas do envenenamento por serpentes (ZELANIS et al., 2010). As quais podem ser classificadas em três domínios: classe PI - composto por enzimas contendo apenas o domínio metaloproteinase; classe PII - apresenta um domínio desintegrina seguido por domínio metaloproteinase; classe PIII – compreendem metaloproteinases com domínio desintegrina-like, seguido por um domínio rico em cisteína (FOX; SERRANO, 2005; CALVETE et al., 2005).

Até o momento, duas proteínas foram isoladas do veneno da *P. patagoniensis*. A primeira SVMP foi a  $\alpha$ -fibrinogenase patagonfibrase, pertence à classe P-III. Suas atividades são aumentadas na presença de íons de cálcio, sendo capaz de degradar fibrinogênio e azocaseína; além de gerar efeitos hemorrágicos, miotóxicos, e inibir a agregação plaquetária.

(PEICHOTO et al., 2007). A outra, denominada patagonina, é uma proteína secretora rica em cisteína que demonstra atividade miotóxica (PEICHOTO et al., 2009).

As atividades proteolíticas verificadas para o gênero *Philodryas* superam às do veneno de *Bothrops alternatus* (GAY et al., 2005) e de *B. jararaca* (ROCHA et al., 2006). E são causa provável da mionecrose (PRADO-FRANCESCHI et al., 1998). A fosfolipase A2, também é descrita para as *Philodryas*, mas seus mecanismos de atuação ainda não estão claros (ZELANIS et al., 2010).

Perfis estabelecidos por meio de SDS-PAGE ilustra que a maioria das proteínas da peçonha da *P. patagoniensis* apresentam massa molecular entre 20-80 kDa (COSTA et al., 2008), entre elas a patagonfibrase com ~53kDa (PEICHOTO et al., 2007) e a patagonina com ~24,8kDa (PEICHOTO et al., 2009). Composto com uma alta atuação proteolítica e baixa ação de esterases e fosfolipases (ACOSTA et al., 2003; COSTA et al., 2008), compatível com a ação das toxinas de outras serpentes opistóglifas (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; MACKESSY, 2002).

## 2.5 Modelo de *Artemia salina*

O uso de vertebrados nas pesquisas de toxicidade deveria ser precedido por invertebrados, como *A. salina*, a fim de se obter dados primários. Mas isto não é o padrão, e sua aplicação ainda não é representativa (KANWAR, 2007). A letalidade em organismo mais simples serve como parâmetro de avaliação e fracionamento de produtos naturais testados em trabalhos iniciais (MCLAUGHLIN; ROGERS, 1998).

Especificamente *A. salina*, empregada frequentemente como modelo de toxicidade aguda, é um crustáceo da Ordem Anostraca, Classe Branchiopoda. Filtrador, se alimenta de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos na coluna d'água. A filtração ocorre nos toracópodes, apêndices localizados na região anterior do corpo, encarregados de conduzir as partículas alimentícias em direção a boca (SOUTO, 1991). Diferem-se dos outros branquiópodos por não apresentarem carapaça e não ultrapassarem 12 mm. Estes animais cosmopolitas vivem em poças temporárias, lagos hipersalinos e lagoas marinhas. Em muitas áreas, constituem um importante item alimentar de aves aquáticas. Como poucos organismos desenvolvem-se no meio em que vivem devido à alta salinidade, não apresentam muitos predadores naturais (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Porém, é muito utilizado na aquicultura como ingrediente principal na dieta das larvas de organismos com importância comercial, como peixes e camarões (CÂMARA, 2004; SEALE, 1933). De modo que seus cistos são facilmente encontrados no comércio.

Deste modo, os laboratórios utilizam muito esta espécie como bioindicador, devido a facilidade de manipulação e seu baixo custo (CALOW, 1993). E ao buscar um bioindicador para um agente tóxico, aceita-se que, se este composto exerce uma toxicidade sobre um organismo, provavelmente será tóxico para outro. Então, a escolha da espécie para o estudo é um passo importante. Porém, deve-se levar em consideração a suscetibilidade de cada espécie, pois haverá diferenças quantitativas e, por vezes qualitativas, significativas a um determinado agente. A toxicidade de uma substância será expressa em concentrações diferentes e poderá apresentar efeitos também diferentes, em organismos distintos.

Os ensaios com *A. salina* começaram a ganhar destaque na década de 80, quando começou a ser utilizado para testar toxicidade de compostos bioativos de extratos vegetais. Considerando-se tóxicas as substâncias que apresentam valores de DL<sub>50</sub> abaixo de 1000ppm em *A. salina*. Avaliações de citotoxicidade estabeleceram uma relação entre os compostos tóxicos neste modelo e sua capacidade de agir como um potencial agente anticancerígeno, ao testá-los em diferentes linhagens celulares cancerosas (MEYER et al., 1982). Parra et al. (2001) também encontrou uma correlação entre artêmias e ratos ao testar extratos de plantas.

Assim, ao demonstrar diferentes correlações com outros organismos e modelos, este invertebrado torna-se uma boa opção para testes iniciais. Kanwar (2007) menciona a *A. salina* como um dos melhores e mais rápido modelo animal para ensaios biológicos e toxicológicos, especialmente para triagem de drogas, compostos e extratos vegetais.

Com o passar dos anos esta metodologia se popularizou como bioensaio de toxicidade aguda para extratos vegetais. E, embora poucos compostos de origem animal tenham sido testados em artêmas até o momento, é um campo que está crescendo.

## **2.6 Toxicologia: Citotoxicidade e Genotoxicidade**

De forma geral, a toxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos nocivos ocorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição. Suas práticas científicas são consideradas as mais antigas, ao utilizar-se, desde a antiguidade, de veneno na caça e como arma contra inimigos (OGA et al., 2008).

Multidisciplinar, a toxicologia investiga seus toxicantes sob diversos aspectos, tornando-a de suma importância para a saúde pública (OGA et al., 2008). Independentemente da área a ser pesquisada, seus testes toxicológicos serão *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*. Para Valadares (2006), os testes *in vivo* abordam toxicidade aguda, subcrônica e crônica, a fim de analisar mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade e indução de dependência. Todos por meio de modelos de estudos toxicológicos. Os testes *in*

*vitro* são métodos que diminuem o uso de animais em laboratórios. Estes testes utilizam-se de bactérias, fungos e algas, bem como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas (FRAZIER, 1992). Enquanto a toxicologia computacional utiliza-se de métodos *in silico*, por meio de banco de dados, fundamentados em testes toxicológicos tradicionais, fornecidos por agências internacionais. Estas análises são preditivas e racionalizam a utilização de animais (SANTOS, 2011).

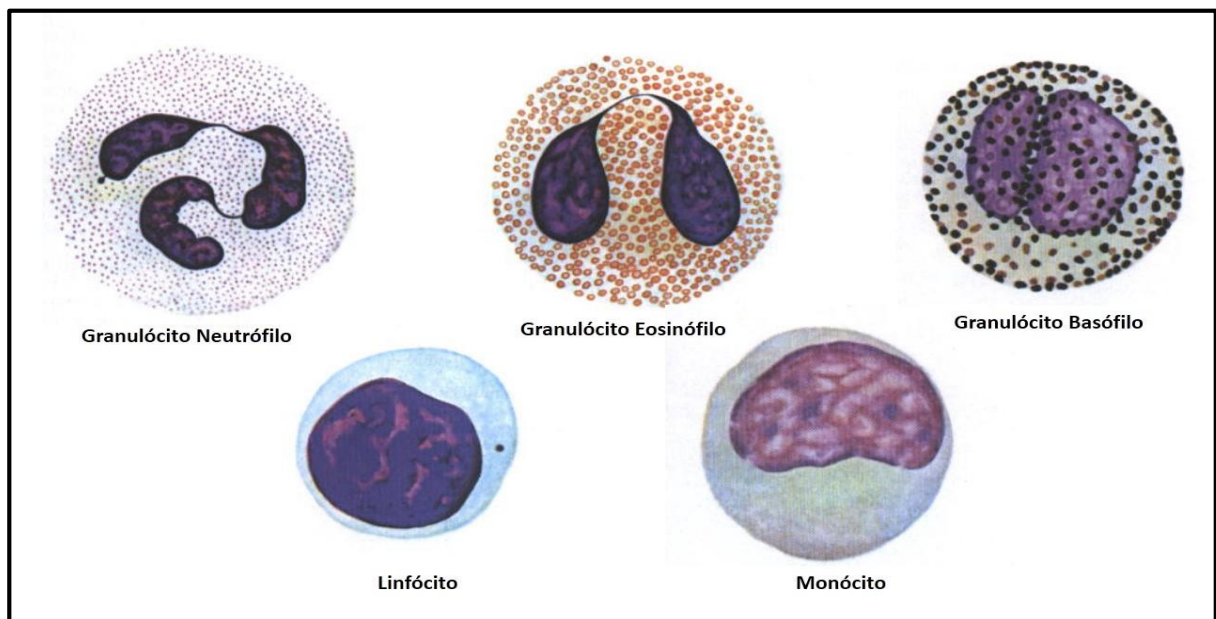
Assim, notamos que a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade, ao utilizar suspensões celulares preparados a partir de sangue, integram a categoria dos testes *in vitro*. Ambos os ensaios aplicados servem para qualquer material e servirão como base para outros estudos. Se houver interesse, marcar-se-á sua continuidade realizando-se ensaios complementares necessários em animais de laboratório.

Basicamente, a citotoxicidade consiste em expor células de mamíferos ao composto a ser testado, analisando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, como a incorporação de corantes, constatando a viabilidade celular; ou a inibição da multiplicação celular (ROGERO et al., 2000a; 2000b). Rogero et al. (2003) classificou o primeiro mecanismo de análise citotoxicológico como quantitativo, e o último como qualitativo. Mesmo assim, mostrou que ambas são equivalentes nas análises em suas respostas. E que a escolha da técnica pelo pesquisador deve estar ligada ao composto a ser testado. Um composto oleoso tenderia para a técnica de multiplicação celular, enquanto um composto aquoso para viabilidade celular.

Na genotoxicidade, mensura-se os danos presente no DNA. Uma das melhores técnicas é o Ensaio Cometa seguida pela leitura informatizada das imagens (HARTMANN et al., 2003). Os testes genotóxicos apresentam aplicações em muitos campos da toxicologia, complementando informações sobre a carcinogenicidade (AULETTA; ASHBY, 1987). Qualquer célula com núcleo pode ser submetida a esta técnica (OSTLING; JOHANSON, 1984), no entanto, células com o núcleo esférico são mais facilmente identificadas e apresentam uma imagem mais confiável para a classificação. Em amostras de sangue humano, os leucócitos mononucleares, linfócitos e monócitos (Figura 4), apresentam esta característica por não sofrerem lobulação do núcleo em sua formação.



O método do Ensaio Cometa indicará quebras na fita que dispõe em sequência os genes. Entre seus benefícios está o processamento rápido, reprodutividade e precisão, a qual teve sua sensibilidade aprimorada por meio de solução alcalina (BELPAEME et al., 1998; SINGH et al., 1988). Cabe salientar que o Ensaio Cometa é sensível à morte celular, pois a migração do DNA fragmentado destas células acentua-se na eletroforese em micro-gel, tanto em casos de necrose quanto apoptose (MEINTIERES et al., 2003). Sendo recomendável a inserção na pesquisa de um parâmetro citotóxicológico (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993).



**Figura 4.** Cinco tipos de leucócitos do sangue humano. Os neutrófilos, eosinófilos e basófilos, além dos grânulos, apresentam o núcleo lobulado. E constituem o grupo dos leucócitos polimorfonucleares. Os linfócitos e monócitos, grupo dos leucócitos mononucleares, são agranulares e apresentam núcleo não lobulado. Imagem adaptada de Junqueira e Carneiro, 2004.

## 2.7 Atividade DNase

Toda célula contém várias nucleases diferentes a fim de degradar RNA ou DNA. Exo e endonucleases são duas classes pertencentes às nucleases. As exonucleases degradam ácidos nucleicos a partir de uma extremidade da molécula, removendo apenas um nucleotídeo do ácido nucleico de cadeia dupla ou simples, liberando mononucleotídeos. Enquanto que endonucleases degradam as moléculas em sítios internos específicos em uma cadeia do ácido nucleico, reduzindo-as a oligonucleotídeos (LEHNINGER et al., 2005).

Quando estas nucleases são específicas para a degradação do DNA, denominam-se desoxirribonucleases (DNase). Presente nas zootoxinas de diversas espécies de serpentes como jararacas, cruzeiras, cascavéis, surucucus e corais-verdadeiras, é a principal responsável por realizar a hidrólise do DNA nos casos de envenenamento (SALES; SANTORO, 2008).

Mas, entre as nucleotidasas, a atividade DNase não é a única registrada em venenos de serpentes. Assim como ela ocorrem atividades 5' nucleotidasas e fosfodiesterases, por exemplo, todos hidrolisando nucleotídeos. Porém diferenciam-se em seus respectivos sítios de atuação. Segundo Mackessy (1998), as fosfodiesterases são exonucleases que hidrolisam ligações fosfodiéster de forma progressiva a partir da extremidade 3' dos ácidos nucléicos, gerando mononucleotídeos como produto final. Enquanto que as DNases são endonucleases que clivam o DNA, fragmentando-o em cadeias menores (EVANS; AGUILERA, 2003).

Considerava-se que a clivagem do DNA ocorria sem uma sequência específica. Contudo, pesquisas mostram que as DNases podem ter um sítio preferencial. Análises do meio degradado pela enzima apresentaram 72% dos nucleotídeos com terminal 3'-fosfato-purinas, nas quais as guaninas representaram 44% e adeninas 28% (EVANS; AGUILERA, 2003). Somado a isso, atividades enzimáticas de espécies como, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Bos taurus*, exibem preferência por determinados sítios para clivagem (EVANS et al., 2002).

Nas zootoxinas de determinadas espécies de serpentes, as DNases degradam os ácidos nucleicos em conjunto com a fosfodiesterases, liberando nucleotídeos livres. A partir de então as 5'-nucleotidasas atuam hidrolisando estes nucleotídeos em nucleosídeos. Produtos que podem contribuir para a captura da presa, pois a liberação de nucleosídeos formados por purinas suprime a acetilcolina dos neurônios centrais e motores; além de promover a hipotensão, choque ou até a morte; ao aumentar a permeabilidade vascular. A adenosina também exerce efeitos inotrópicos negativos no coração. E, como são compostos endógenos de regulação homeostáticos em todos os vertebrados, não há como desenvolver resistência aos mesmos (AIRD, 2002).

## 2.8 Estresse Oxidativo

Os organismos estão constantemente sofrendo ações de agentes reativos. Embora comumente chamados de radicais livres, nem todos estes agentes são realmente radicais. Diferencia-se estes grupos por meio dos elétrons na última camada orbital: os radicais apresentam um ou mais elétrons nesta camada; enquanto que nos agentes não-radicalares não há elétrons desemparelhados na sua última camada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 2001).

Por meio do metabolismo do oxigênio formam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre as principais EROs radicalares estão hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\cdot$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\cdot$ ); e entre as não-radicalares estão o oxigênio, peróxido de hidrogênio e

o ácido hipocloroso. Suas respectivas reatividades no organismo são variáveis, enquanto alguns atacam lipídios, proteínas, DNA, outros reagem apenas com lipídios (BARREIROS et al., 2006).

A HO<sup>-</sup> caracteriza-se como a ERO mais reativa e, portanto, a mais deletéria aos organismos (BARREIROS et al. 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A HO<sup>-</sup> pode inativar enzimas e proteínas de membrana celular, bem como iniciar a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas – lipoperoxidação – celulares e mitocondriais. Ácidos nucleicos podem ser afetados. Para o DNA ser inativado ou mutado, a formação da HO<sup>-</sup> deve ocorrer em suas proximidades. Neste caso o radical atua adicionando-se a bases nitrogenadas ou abstraindo átomos de hidrogênio do açúcar desoxirribose. Frequentemente ocasionando a ruptura desta estrutura (CADET et al., 1999; CHATGILIALOGLU; O'NEIL, 2001; HALLIWELL, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986; WARD, 1988).

As EROs estão diretamente ligadas a reações de oxidação, e são parte integrante dos organismos. Porém, Halliwell et al. (1992) traz exemplos de doenças - artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS; causa ou fator agravante do quadro geral - quando estes agentes reativos estão em excesso no organismo. Somado às doenças, o próprio processo de envelhecimento está relacionado ao estresse oxidativo, provavelmente devido à redução da quantidade de antioxidantes ao longo dos anos (ONDEI et al., 2014). Nestes casos, onde as EROs ocorrem em excesso, faz-se necessária a presença de antioxidantes.

Por ser amplamente utilizado e de difícil definição, Halliwell (2001) conceitua o termo antioxidantes de forma ampla:

*“...qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou impede a oxidação do referido substrato. ”*

Estes compostos, além de produzidos naturalmente nos organismos, podem ser ingeridas. Muitos estudos com diferentes infusões têm tomado destaque, dentre os quais Martins et al. (2012) ilustra o potencial efeito neuroprotetor da erva-cidreira (*Melissa officinalis*); Salgueiro et al. (2015) mostra que os danos oxidativos causados no fígado pelo diabetes em camundongos podem ser amenizados pelo chá da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) e; a tradicional erva-mate (*Ilex paraguariensis*), a qual Colpo et al. (2016) demonstra uma capacidade antioxidativa. Capacidade essa que se mantém a medida que o chimarrão, principal forma de consumo da erva-mate, é tomado em uma roda de chimarrão. Todos estes benefícios são oriundos de moléculas antioxidantes ou quelantes, contidos nestas plantas.

Contudo, isoladamente, os antioxidantes também apresentam seu efeito protetor. Como a melatonina, testada como alternativa para o envenenamento da cobra egípcia *Naja haje*, demonstrando efeito protetor (MONEIM et al., 2015). Bem como, o ácido ascórbico e um complexo vitamínico formado por ácido ascórbico, vitamina E, somados a todas vitaminas do complexo B; em ambos os casos, houve a proteção dos organismos diante do envenenamento induzido pela peçonha de espécies do gênero *Bothrops* (OLIVEIRA et al., 2016).

Mas as ações das moléculas antioxidantes não se limitam a beneficiar os organismos neutralizando EROs ou as toxinas. Porque as moléculas antioxidantes podem propiciar efeitos protetores, todavia, podem também piorar os danos dependendo do momento no qual entra em ação (KANG et al., 1998). Antioxidantes são capazes de - entre outros efeitos paradoxais - inibir a proliferação celular, ao impedir as oxidações que estimulam fatores de fosforilação e transcrição de proteínas; e, evita a adaptação ao dano oxidativo ao inibir um pré-condicionamento isquêmico do miocárdio, por exemplo (SUN et al., 1996). E, diante da necessidade de administrar estas substâncias, as mesmas devem ocorrer de forma controlada.

### 3 JUSTIFICATIVA

Atualmente há um aumento do interesse por estudos que visem o desenvolvimento de produtos farmacológicos alternativos para o tratamento das mais diversas injúrias que afetam a saúde humana e animal. Em especial, os crescentes casos de enfermidades originadas por microrganismos multirresistentes. E neste campo, zootoxinas têm se destacado como fontes de bioprospecção.

Entretanto, os conhecimentos toxicológicos sobre estes compostos complementam e se fazem necessários a este fim. Analisar a composição e os efeitos dos venenos, permite diagnosticar e apontar tratamentos para as intoxicações e envenenamentos ocorridos pelos mesmos.

Desta forma, o presente trabalho justifica-se à medida que propõe a avaliação dos efeitos gerado pela peçonha da serpente *P. patagoniensis* em diferentes concentrações sobre as células sanguíneas humanas e seu DNA *in vitro*. Bem como, ponderar a reação em invertebrados *in vivo* – DL<sub>50</sub> e marcadores de OS.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos toxicológicos gerado pela peçonha de *P. patagoniensis* sobre leucócitos humanos in vitro - citotoxicidade e genotoxicidade - e sobre *Artemia salina* in vivo.

### 4.2 Objetivos Específicos

- I. Estabelecer a concentração média de proteínas presente na peçonha;
- II. Avaliar a toxicidade aguda e estipular a  $DL_{50}$  em *Artemia salina*;
- III. Analisar a viabilidade celular e os danos genéticos ocasionados pela peçonha em leucócitos mononucleares humanos;
- IV. Constatar a presença da enzima DNase no composto analisado;
- V. Verificar a ocorrência de alterações nos biomarcadores de stress oxidativo em *Artemia salina* após o tratamento com a peçonha.

## 5 MANUSCRITO

EVALUATION OF THE CELL VIABILITY AND GENOTOXICITY IN  
HUMAN MONONUCLEAR LEUKOCYTES EXPOSED TO CRUDE VENOM OF  
*Philodryas patagoniensis* (SNAKE: DIPSADIDAE)

Márcio Tavares Costa<sup>a</sup>

E-mail address: [marciocosta@unipampa.edu.br](mailto:marciocosta@unipampa.edu.br)

Aline Flores da Silva<sup>b</sup>

E-mail address: [alinefsgoulart@gmail.com](mailto:alinefsgoulart@gmail.com)

Andréia Caroline Fernandes Salgueiro<sup>a</sup>

E-mail address: [acfsalgueiro@gmail.com](mailto:acfsalgueiro@gmail.com)

Hemerson Silva da Rosa<sup>a</sup>

E-mail address: [hemerdarosa@gmail.com](mailto:hemerdarosa@gmail.com)

Giselle Xavier Perazzo<sup>c</sup>

E-mail address: [giperazzo@gmail.com](mailto:giperazzo@gmail.com)

Vanderlei Folmer<sup>a\*</sup>

E-mail address: [vanderleifolmer@unipampa.edu.br](mailto:vanderleifolmer@unipampa.edu.br)

<sup>a</sup> Program of Post-Graduation in Biochemistry, University of Pampa, Br 472 – Km 592, P.O.Box 118, Uruguaiiana, RS, Brazil;

<sup>b</sup> Faculty of Natural Science, University of Pampa, Br 472 – Km 592, P.O.Box 118, Uruguaiiana, RS, Brazil;

<sup>c</sup> Biology of Continental Aquatic Environments Graduate Program, Federal University of Rio Grande, Itália avenue Km 8, Campus Carreiros, P.O.Box 474, Rio Grande, RS, Brazil;

\* Corresponding author.

38

39 **ABSTRACT**

40 *Philodryas patagoniensis* is an abundant snake from Brazilian Pampa Biome. Its venom,  
41 produced by Duvernoy gland, is the target of our research. Therefore, this study aims to  
42 evaluate the cell viability and genotoxicity potential of this snake venom. For this, *P.*  
43 *patagoniensis* captured on the border of Brazil with Argentina had their venom extracted for  
44 analysis. Firstly verified the mean protein concentration found in the toxin produced by  
45 snake. The extracted venom was diluted for acute toxicity tests in nauplii of *A. salina*, as  
46 well as eukaryote viability and DNA damage assays in mononuclear leukocytes. Was  
47 verified the presence of DNase activity in venom and of oxidative stress biomarkers in  
48 nauplii treated only sublethal dose. The mean of protein in venom was 115.7 mg/mL. LD<sub>50</sub>  
49 determined for *A. salina* nauplii was 461 µg/mL. According to *A. salina* protocol, the toxin  
50 present a mid-toxicity and this make it a candidate for further investigation about their  
51 possible anticancer potential. When the toxin was tested at concentrations of 55, 110, 220,  
52 575 and 1150 µg/ml, the cell death and genotoxicity increased significantly in two largest  
53 concentration. Oxidative stress was found by increased lipid peroxidation and decreased  
54 NPSH in the larger sublethal concentration and the DNase activity is absent. In conclusion,  
55 the *P. patagoniensis* venom may to cause cellular and genetic damage, likely the oxidative  
56 stress influenced to damage occurrence, whereas the DNase activity is absent. When  
57 compared to some vipers dose should be much larger in order to cause greater damage.

58

59

60

61 **Keywords:** *Artemia salina*; Colubridae; DNase; Rear-fanged; Oxidative stress

62



## 63           1.    **Introduction**

64           In Brazilian Pampa Biome (Southern Brazil), the specie that stands out by abundance  
65           is *Philodryas patagoniensis*, a rear-fanged Dipsadidae snake. May attain 1.6m long and its  
66           dorsum is greenish gray with the base and the edge of the dorsal scales in black (Quintela;  
67           Loebmann, 2009). In rear-fanged species, the Duvernoy's gland is responsible for producing  
68           the toxic compound, especially the genus *Philodryas* that contain species that have produced  
69           fatal human envenomation (Mackessy, 2002).

70           These compounds are studied for a long time. A pioneer researcher of opisthoglyphous  
71           snakes venom in Brazil was Dr. Martins (1918). This scientist described anesthetic effect of  
72           the *P. patagoniensis* venom in frogs. Moreover, he described the proteolytic nature of the  
73           venom, without detecting changes in blood. More recently, Rocha and Furtado (2007)  
74           confirm these findings, showing absence of blood disorders, changes in nociception and of  
75           myotoxic activity from *P. patagoniensis* venom in mice. Despite these surveys are important,  
76           actually, other methods of toxicity assessing have been highlighted, such as procedures that  
77           evaluate the cellular (cytotoxicity) and genetic (genotoxicity) damage involved in the  
78           process of poisoning by snake venom. (Damotharan et al., 2015; Marcussi et al., 2011; 2013;  
79           Strapazzon et al., 2015).

80           One way to check cell damage is to test directly on the cells and observe their mortality.  
81           By comparing the cells treated and the cells control, we can characterize the compound  
82           tested. A method using Trypan blue enable observe that non-viable cells exhibit permeability  
83           due to the formation of pores in the membrane, which allows penetration of the dye and thus  
84           display blue staining after treatment (Konopka et al., 1996). A second cytotoxic evaluation  
85           method uses a brine shrimp *Artemia salina* as an animal model. The use of brine shrimp to  
86           assay toxicity has been adopted mainly to test plant extracts. However, evaluation of the  
87           venoms toxicity is not widely used in this model. Regarding snakes, only Damotharan et al.

88 (2015) tested in brine shrimp the venom of sea serpent *Enhydrina schistose*, which it is  
89 median lethal dose (LD<sub>50</sub>) was determined in 2.5 µg/mL. According classification  
90 McLaughlin (1991), considered highly toxic.

91 While the DNA damage may be determined by Comet Assay, a cellular electrophoresis  
92 technique that allow to detect a single or double-strand breaks, crosslinks, excision repair  
93 sites and alkali-labile lesions (Silva, 2007). Marcussi et al. (2011; 2013) were the first to  
94 study genotoxicity caused by snake venoms in human leukocytes using this technique. These  
95 researchers observed the genotoxicity caused by venoms of *Crotalus durissus terrificus*,  
96 *Bothrops jararacussu*, *B. brazili*, *B. alternatus*, *B. moojeni* and *B. atrox*. Likewise, was  
97 observed the genotoxicity of isolated venom compounds. In all these cases, the increase in  
98 oxidative stress (OS) may be a possible mechanism involved in the genotoxic potential.

99 OS is an imbalance between free radicals generation and antioxidant defenses capacity  
100 to neutralize these free radicals. An important process that cause cellular damage and can  
101 generate various disease states, and aging (Dröge, 2002). The OS was observed in people  
102 bitten by *B. jararaca*, *B. jararacussu* and *Micrurus* sp. and may last for 30 days. These  
103 findings suggest a possible addition of natural antioxidant agents in treatment to persons  
104 poisoned (Strapazzon et al., 2015).

105 However, *Bothrops* is a genus targeted of many works and is essential emphasize that  
106 *Philodryas* and *Bothrops* presents morphological similarities in their venom glands as well  
107 as the bioactive of its toxins compounds (Fry et al., 2006). Furthermore, the symptoms after  
108 poisoning are similar between the genus, as well as LD<sub>50</sub> in mice (Rocha et al, 2006; Tanjoni  
109 et al., 2003; Rocha and Furtado, 2007). Therefore, this work aims evaluate the toxicological  
110 potential of *P. patagoniensis* zootoxin.

111

112

## 113 2. Materials and methods

### 114 2.1. Specimens

115 To obtain the venom of *P. patagoniensis* five specimens were trapped by physical  
116 restraint and identified comparing to specialized bibliographies. These captures occurred in  
117 the city of Uruguaiana - RS, Brazil (Fig. 5).

118 The specimens comprised between 79 and 103 cm in length (rostrum-cloaca), and  
119 there was no gender distinction. During the work, snakes were fed Swiss mice once every  
120 15 days in the summer and once a month for the remainder of the year.

121



122

123 **Figure 5.** The map show location of the Uruguaiana city, in RS, Brazil. Belonging to the Pampas Biome,  
124 presents in it is scenario the Uruguay River (-29° 46' 53" S, -57° 2' 16" W).

125 Authorization for this procedure it obtained from the Ethics Committee on Animal Use  
126 through the registry 031/2014. As well as authorization from the Ministry of Environment  
127 / Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation by the number 45691-1 process.

### 128 2.2. To venom extraction

129 Samplings occurred between December/2014 and October/2015. For the process of  
130 obtaining venom, the specimens were subjected to milking procedures individually with

131 capillary tubes assistance placed on the fanged (Fig. 6), according Ferlan et al. (1983), and  
132 the sample was frozen and stored until further analyses.



133

134 **Figure 6.** Image illustrating the fanged of *Philodryas patagoniensis*. An opisthoglyphous snake.

135 For tests, the toxin was centrifuged at 6.000 rpm for two minutes, and the supernatant  
136 was diluted to obtain the concentrations determinates used in assays.

### 137 **2.3. Determination of protein concentration**

138 To evaluate concentration of proteins present in the venom, was carried out a duplicate  
139 test (N = 5) according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. The  
140 reading of absorbance was done at 595 nm and results expressed as proteins. Data were  
141 expressed as mean  $\pm$  SEM.

### 142 **2.4. Cytotoxicity bioassay in *Artemia salina***

143 The cytotoxicity assay was performed as proposed by Meyer et al. (1982) with  
144 modifications. Briefly, active nauplii were collected (with micropipettes) and transferred to  
145 ELISA microplates individually to each reservoir. Exposed to different venom  
146 concentrations (55, 110, 220, 575 and 1150  $\mu$ g/ml) in solution saline and to negative control  
147 (saline). Assays were carried out in triplicate with 30 nauplii per group. The mortality was  
148 evaluated after 24 hours and the LD<sub>50</sub> was established.

149 Was considered  $LD_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$  as toxic and  $LD_{50} > 1000$  as no toxicological  
150 activity, according the original author.

### 151 **2.5. Bioassays in mononuclear leukocytes**

152 Heparinized venous blood was obtained from healthy volunteer donors from Federal  
153 University of Pampa, Uruguaiiana, RS (age  $25 \pm 5$ ). The volume was adjusted to  
154 approximately  $6 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{L}$  of total leukocytes per tube (1 mL maximum volume) with  
155 buffer solution saline (0.9%) and incubated different venom concentrations (55, 110, 220,  
156 575 and 1150  $\mu\text{g/ml}$ ) during four hours. Tests used 0.9% sterile saline as a negative control  
157 and 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a positive control.

158 Then the human mononuclear leukocytes were isolated using Histopaque 1077 (1mL)  
159 and heparinized blood (1mL). The samples were centrifuged at 500 rpm for 35 minutes at  
160  $4^\circ\text{C}$ . Thereafter, 200 $\mu\text{L}$  of the interface containing mononuclear leukocyte band was  
161 collected and buffered with saline phosphate buffer (PBS). Was performed eukaryote  
162 viability tests and genotoxicity with peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

#### 163 **a) Cell viability**

164 Cell viability test was based upon dye exclusion method with Trypan Blue (0.2%).  
165 This dye acts on dead cells.

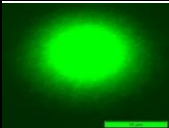
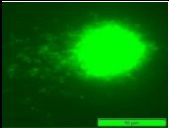
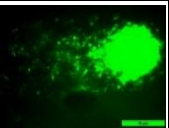
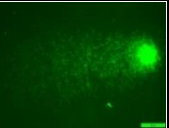
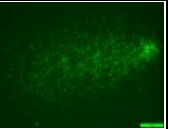
166 Expressed in percentage, the dead/live cells counts were performed in a Neubauer  
167 chamber. Registered as cells death those stained and that have undergone balloon effect.

#### 168 **b) Genotoxicity**

169 Comet assay technique used to measure DNA damage was performed as suggested by  
170 Silva (2007) with modifications. In our tests, the visualization of the length of the tails from  
171 cell comets was realized in fluorescence microscope after addition of Ethidium Bromide on  
172 histological slides. Identified 100 cells comets that were classified based on the ratio  
173 "tail/nucleus" proposed by Villela et al (2006). The analysis was based in the scores of the

174 readings established by sum of the number of cells identified in each class (Table 1)  
 175 multiplied the value of class.

176 **Table 1.** Classification of DNA damage in the cell comets.

Images observed					
Ratio tail/nucleus	Less tail	$\leq 1$	1 – 2	$\geq 2$	Without definite nucleus
Damage classes	0	1	2	3	4

177

## 178 2.6. DNase activity

179 The presence of this enzyme that act on nucleic acids, breaking and hydrolyzing DNA,  
 180 was checked in *P. patagoniensis* venom. For this, used radial diffusion in agarose gels to  
 181 DNase activity assay, as described by Sales and Santoro (2008) with modifications. Briefly,  
 182 in Petri dish (35 x 10mm) was added 2.9 mL of agarose melted (2%) in buffer solution (50  
 183 mM Tris–HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0) containing 0.1 mg/mL calf thymus  
 184 DNA and 1 µg/mL ethidium bromide. Crude venom samples were diluted (1:1) in same  
 185 buffer solution of agarose and loaded (20 µL) into 3mm diameter wells punched in agarose  
 186 gels. Dishes were incubated for 48 h at 37 °C and analyzed on a UV transilluminator.

## 187 Oxidative damage assays

188 Oxidative parameters were assessed by lipid peroxidation and non-protein thiol  
 189 (NPSH) levels, according described by Ohkawa et al. (1979) and Ellman (1959),  
 190 respectively. Both tests were done with *A. salina* nauplii. Firstly, the nauplii (0.5g) were  
 191 incubated with sublethal concentrations (55, 110 and 220 µg/ml) of *P. patagoniensis* venom  
 192 in 5 mL of saline water (3%). After four hours of incubation, nauplii were washed to remove  
 193 the venom residues. Homogenized (1:10) in saline solution (0.9%), which was centrifuged  
 194 (5000 rpm / 8 min.) and supernatants collected for tests.

195 The results were expressed as nanomoles of malondialdehyde (MDA) for lipid  
196 peroxidation assay, and in nanomoles of glutathione equivalent (SH) for NPSH assay.

### 197 **2.7. Statistical Analysis**

198 Data were expressed as mean  $\pm$  SEM for three independent replicates. For cell viability  
199 and oxidative damage assays was performed by one-way ANOVA, with *post hoc* Bonferroni  
200 Test. Moreover, score of genotoxicity assay were interpreted by Kruskal-Wallis  
201 nonparametric,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

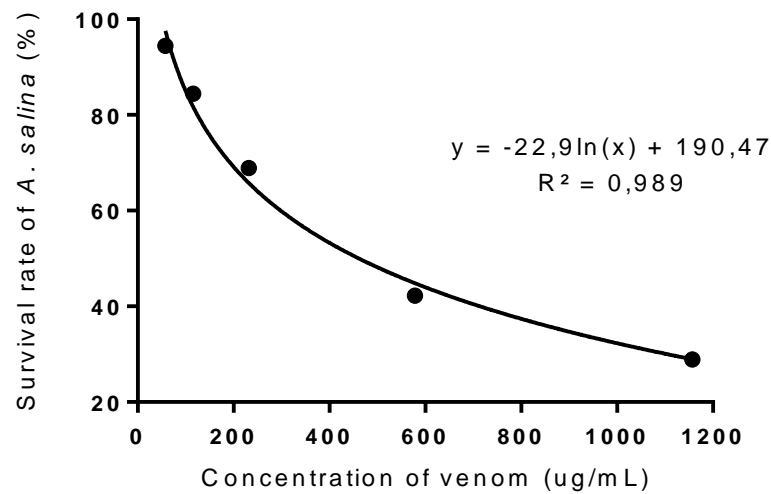
202

## 203 **3. Results and Discussion**

### 204 **3.1. Venom protein content and cytotoxicity by *A. salina***

205 Extractions carried out obtained a mean of 22.5  $\mu$ L of venom per snake, which had an  
206 mean composition of  $115.7 \pm 13.2$  mg/mL of proteins. Noted that amount of protein found  
207 was larger than Zelanis (2010). Many are the factors that can influence the composition of  
208 zootoxins - between species, geographic location, seasonal variation, diet, age and sex of the  
209 animal (Chippaux et al., 1991). Moreover, this difference may be due to the different  
210 techniques used to account for protein. Alternatively, Zelanis (2010) used captive-  
211 maintained snakes and this study made use of newly captured specimens of nature. Finally,  
212 the stimulus provided by Zelanis (2010) with pilocarpine to milking the snakes might have  
213 influence in protein production. Do not disregard that these effects may act synergistically.

214 To conduct an initial screening we used cytotoxic tests in *A. salina* model to establish  
215 LD<sub>50</sub>. Data showed a LD<sub>50</sub> of 461  $\mu$ g/mL of venom. For this analysis, the coefficient of  
216 determination was 98.9% (Fig. 7).



217

218 **Figure 7.** Logarithmic curve illustrating survival rate of *A. salina* nauplii regarding concentration of venom.  
219 Setting the LD50 in 461 µg/mL.

220

221 This method is worked popularly with compounds of plant origin, there are few studies  
222 covering venoms of animal origin. Therefore, the comparison between venoms of snakes  
223 and others animals becomes limited. However we realized that the toxin sea serpent  
224 *Enhydrina schistosa* is the most toxic among the raised (Damotharan et al, 2015.); then  
225 gastropod *Conus betulinus* (Sadhasivam et al., 2014). Other animals found were anemone  
226 *Stichodactyla mertensii* (Veeruraj et al., 2007), scorpion dugong *Centruroides gracilis*  
227 (Nuñez, 2011), anemone *Stichodactyla haddoni* (Veeruraj et al., 2007), catfish *Arius*  
228 *maculatus* (Abirami et al., 2014); and now green racer, *P. patagoniensis*. The diversity of  
229 toxins and poisons are the consequence of biodiversity and existing specificity. Accordingly,  
230 various compounds have different toxicities. However, note that compounds with  
231 neurotoxins as the sea serpent exhibit a prominent toxicity.

232

233

234

235

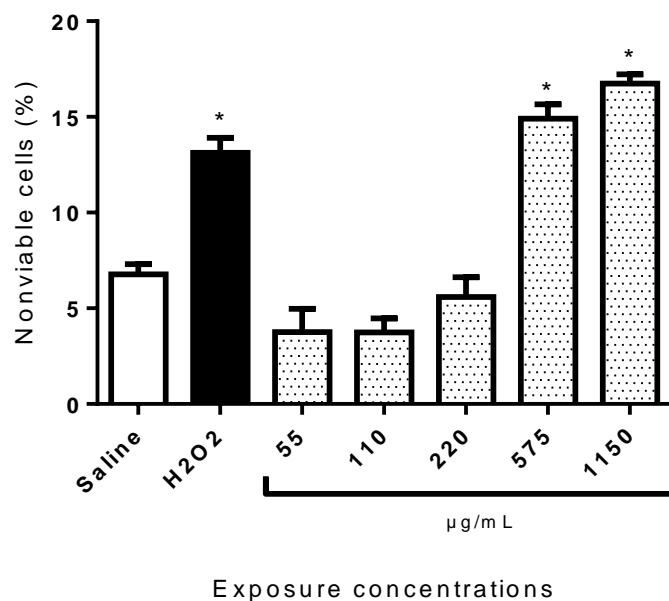
The acute toxicity in *A. salina* is not limited to determination of the LD<sub>50</sub>, this method enables classification of the toxin into non-toxic or toxic and the degree of toxicity of the compound. Thus, the toxin of *P. patagoniensis* is toxic, with medium degree of toxicity, and demonstrate the possibility of containing anticancer properties (McLaughlin, 1982; Meyer



236 et al., 1982). More specific studies should be conducted to investigate this possibility,  
237 because research has shown that venoms derived from snakes and other animals, have anti-  
238 cancer characteristics in vitro (Lee et al., 2015; Sharkawi et al., 2015; Swenson et al., 2004).  
239 Nevertheless, there is still much to explore - how not to reach healthy cells, e. g.

### 240 3.2. Cell viability assay

241 Cell viability tests illustrate damage caused by venom in the PBMC. Results showed  
242 that venom in the two highest dilutions - 575 and 1150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  - demonstrated a significant  
243 increase in non-viable cells compared to the negative control. From the third concentration  
244 – 220  $\mu\text{g}/\text{mL}$  – was not detected cell damage (Fig. 8).



245

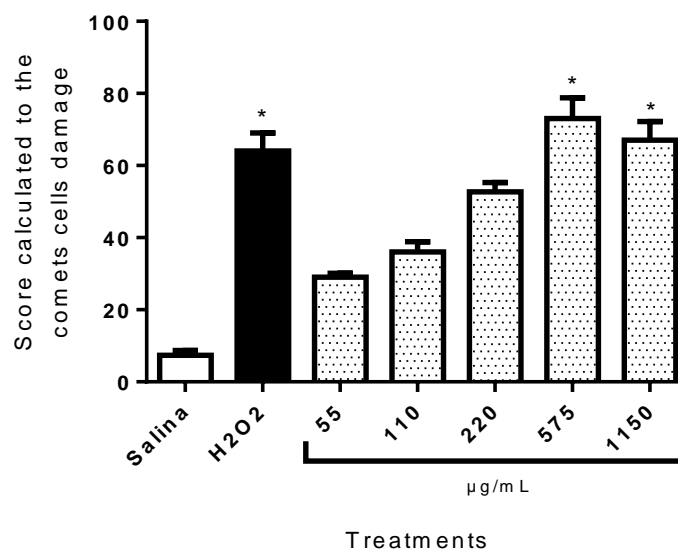
246 **Figure 8.** Test in vitro cell viability by human mononuclear leukocytes. Note that in the higher concentrations  
247 are significant differences in relation to saline (negative control). From the concentrations less or equal to 220  
248  $\mu\text{g}/\text{mL}$  there was no cell unviable (ANOVA, post hoc Bonferroni test -  $*p \leq 0.01$  vs saline).

249 As this method indicates non-viable cells, there is no way to distinguish between  
250 necrosis and apoptosis. According to the literature, both are possible. When considering  
251 production of a large amount of free radicals, it may cause cell damage and death (Anderson,  
252 1996). On the other hand, DNA damage caused by OS may result in apoptosis, the  
253 programmed cell death (Valko et al., 2007).

### 3.3. Genotoxicity (Comet assay)

The lesions are not limited to cell viability; the injuries attain the cell nucleus. Our genotoxicity tests by Comet assay technique allowed us to analyze different degrees of DNA damages, which demonstrated a possible induction capacity of DNA damage by venom *P. patagoniensis* in PBMC (Fig. 9) when the cells are exposed to higher concentrations. Thus, incubation of human leukocytes with the venom at concentrations of 575 and 1150  $\mu\text{g/mL}$  showed a significant increase in DNA damage compared to the negative control. However, from 220  $\mu\text{g/mL}$  presented no significance and was gradually decreased the injury until lower concentration.

The cell viability assay showed that more than 80% of PBMC remained viable in the all venom concentrations. Therefore unlikely that migration of fragmented DNA from dead cells by necrosis or apoptosis is influencing the results (Meintieres et al., 2003).



**Figure 9.** Genotoxicity test using comet assay in PBMC. The two highest concentrations of the toxin are those with significant DNA damage (non-parametric analysis of Kruskal-Wallis with Dunn's Test -  $*p \leq 0.05$ ).

Marcussi et al. (2013), as quoted, verified the venom capacity of other species of snakes to cause genetic damage. When analyzing the works we have seen, for venom *P. patagoniensis* to be more toxic in the genetic level than *B. atrox* and *B. moojeni*, its venom must be approximately 77 times more concentrated than of the vipers.

### 273 3.4. DNase activity

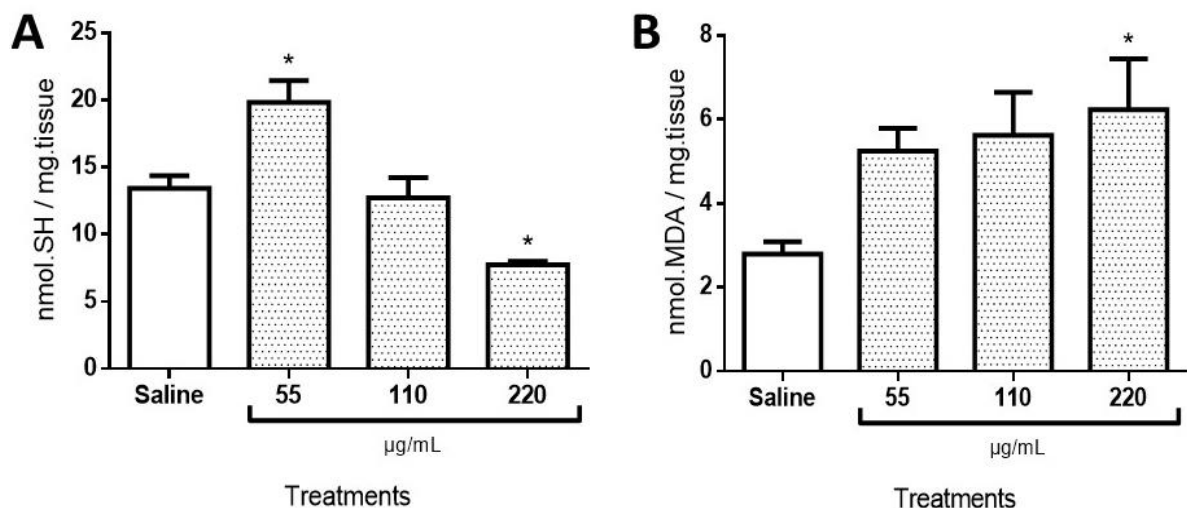
274 The absence of halo surrounding the wells loaded with the dilution of toxin suggested  
275 that the venom of the species in question is devoid of DNase activity.

276 Other species of the same genus *P. olfersii* is devoid of this activity too. But the DNase  
277 activity is common among *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* (Sales; Santoro, 2008).

278 Without enzymatic activity, is possible that the free radicals production is causing  
279 genetic damage and an apoptotic induction (Marcussi et al., 2013; 2011). To indeed, the  
280 formation of electrophilic derivatives in the lipid peroxidation process can be highly  
281 genotoxic (Marnett et al., 2003).

### 282 3.5. Oxidative damage

283 In this context, we evaluated the oxidative damage in nauplii of *A. salina* with sublethal  
284 concentrations of *P. patagoniensis* venom (Fig.10). Exposure of *A. salina* to higher  
285 concentration of toxin (220  $\mu\text{g/mL}$ ) caused a significant decrease NPSH levels. In contrast,  
286 the concentration of 55  $\mu\text{g/mL}$  presented an increase in NPSH systems (Fig. 10A).



**Figure 10.** Oxidative stress provided by *P. patagoniensis* venom in nauplii of *A. salina* – ANOVA, post hoc Bonferroni Test (\* $p \leq 0,05$ ). (A) Measurement of thiol group non-protein. (B) Ratio MDA found in nauplii after treatment.

287 The occurrence of OS in organisms exposed to snakes venom is known, even when  
288 antiophidic serum is administered. Moreover, snakebites victims show an OS increase up to

289 a month after poisoning (Strapazzon et al., 2015). Here, an increase in lipid peroxidation and  
290 a decrease in NPSH levels were observed in nauplii of *A. salina* exposed to 1:500 sublethal  
291 dose of venom (Fig. 10A and 10B). Aware that an increase in TBARS levels are an indirect  
292 evidence of high free radical production (Salgueiro et al., 2016), these findings suggest that  
293 OS increase may be one of the possible mechanisms to toxicity of *P. patagoniensis* venom.  
294 Because free radicals attack and can break the DNA (Barreiros et al., 2006). Furthermore, in  
295 several pathological situations where there an increase in free radicals production also have  
296 an increase in lipid peroxidation (Salgueiro et al., 2013; Salgueiro et al., 2016). For situations  
297 similar to these that studies involving antioxidants as a complement to conventional  
298 treatment in poisoning cases are on the rise, and have showed the success of melatonin,  
299 ascorbic acid and vitamin complexes to protect the victims (Oliveira et al, 2016; Moneim et  
300 al., 2015).

301 The depletion of thiols levels is expected in a situation of high free radicals production  
302 (Kassab; Piwowar, 2012). However, at low venom concentration (55 µg/mL) was observed  
303 an increase in thiols levels (Fig. 10A). We believe that this is an antioxidant physiological  
304 compensatory response to a moderate OS determined by low venom concentration. Similar  
305 compensatory response is already observed in other organisms subjected to many  
306 endogenous and exogenous stressors (Tromm et al., 2012; Loro et al.; 2015).

#### 307 4. Conclusions

308 The results characterize in experimental models the toxicity of venom *P.*  
309 *patagoniensis*. We verified capacity of toxin to cause cell and genetic damage, as well to  
310 generate oxidative stress. However, the amount of venom must be much larger compared to  
311 vipers, e.g.

312 The cell and genetic damage, despite we do not have a complete understanding if  
313 occurs necrosis or apoptosis and how the venom assault DNA, both appears to be linked to

314 oxidative stress. Specially genotoxicity, because was not detected DNase activity, enzymes  
315 specifics to deoxyribonucleic acid.

316 Results derived from cell and DNA damage were compatible with standard LD<sub>50</sub>  
317 curve. In addition, allow for a direct correlation between brine shrimp and toxicology  
318 damage in human mononuclear leukocytes on different levels.

319 Finally, the studies will continue characterizing the venom of this snake, analyzing  
320 their mutagenic and anticancer capacity, besides antibacterial potential. Thus, we hope to  
321 have contributed a little about the snake venom rear-fanged, especially *P. patagoniensis*.

## 322 **Acknowledgments**

323 The authors express their gratitude to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de  
324 Pessoal de Nível Superior) for financial support. As well, to Professor Robson Luiz Puntel  
325 (Laboratory of Biochemistry and Toxicology of Natural and Synthetic Products), Professor  
326 Mário Celso Sperotto Brum (Virology Laboratory) and Professor Edward Frederico Castro  
327 Pessano (Biology Laboratory) for the support and assistance provided.

## 328 **References**

329 Abirami, P., Arumugam, M., Giji, S., Nagarajan, S., 2014. Bio-prospecting of catfish sting  
330 venom *Arius maculatus* available along south east coast of India. International Journal of  
331 Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6, 110-115.

332 Anderson, D., 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and  
333 other damage. Mutation Research 350, 103-108.

334 Barreiros, A.L.B.S, David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo relação entre geração de  
335 espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, 29, 113-123.

- 336 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
337 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72,  
338 248-254.
- 339 Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study,  
340 results and interpretation. *Toxicon* 29, 1279-1303.
- 341 Damotharan, P., Veeruraj, A., Arumugam, M., Balasubramanian, T., 2015. Isolation and  
342 characterization of biologically active venom protein from sea snake *Enhydrina schistosa*.  
343 *Journal of biochemical and molecular toxicology* 29, 140-147.
- 344 Dröge, W., 2002 Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological*  
345 *Reviews* 82, 47–95.
- 346 Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82,  
347 70–77.
- 348 Ferlan, I., Ferlan, A., King, T., Russell, F.E., 1983. Preliminary studies on the venom of the  
349 colubrid snake *Rhabdophis subminatus* (red-necked keelback). *Toxicon : official journal of the*  
350 *International Society on Toxinology* 21, 570-574.
- 351 Fry, B.G., Vidal, N., Norman, J.A., Vonk, F.J., Scheib, H., Ramjan, S.F.R., Kuruppu, S., Fung,  
352 K., Hedges, S.B., Richardson, M.K., Hodgson, W.C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R.,  
353 Kochva, E., 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439, 584-  
354 588.
- 355 Kassab, A., Piwowar, A., 2012. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type  
356 2 diabetes. *Biochimie* 94, 1837–1848.

- 357 Konopka, K., Pretzer, E., Felgner, P.L., Düzqunes, N., 1996. Human immunodeficiency virus  
358 type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to  
359 cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1312, 186-196.
- 360 Lee, H.L., Park, M.H., Son, D.J., Song, H.S., Kim, J.H., Ko, S.C., Song, M.J., Lee, W.H., Yoon,  
361 J.H., Ham, Y.W., Han, S.B., Hong, J.T., 2015. Anti-cancer effect of snake venom toxin through  
362 down regulation of AP-1 mediated PRDX6 expression. *Oncotarget* 6, 22139-22151.
- 363 Loro, V.L., Murussi, C., Menezes, C., Leitemperger, J., Severo, E., Guerra, L., Costa, M.,  
364 Perazzo, G.X., Zanella, R., 2015. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax*  
365 *jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil.  
366 *Neotropical Ichthyology* 13, 569-578.
- 367 Mackessy, S.P., 2002. Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. *Journal*  
368 *Toxicology-Toxins Reviews* 21, 43-83.
- 369 Marcussi, S., Santos, P.R., Menaldo, D.L., Silveira, L.B., Santos-Filho, N.A., Mazzi, M.V., da  
370 Silva, S.L., Stabeli, R.G., Antunes, L.M., Soares, A.M., 2011. Evaluation of the genotoxicity  
371 of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes.  
372 *Mutation research* 724, 59-63.
- 373 Marcussi, S., Stabeli, R.G., Santos-Filho, N.A., Menaldo, D.L., Silva Pereira, L.L., Zuliani,  
374 J.P., Calderon, L.A., da Silva, S.L., Antunes, L.M., Soares, A.M., 2013. Genotoxic effect of  
375 *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. *Toxicon* : official  
376 journal of the International Society on Toxinology 65, 9-14.
- 377 Marnett, L.J., Riggins, J.N., West, J.D., 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and  
378 electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111, 583-593.

- 379 Martins, N., 1918. Das Opisthogluphas brasileiras e seu veneno, Coletânea de trabalhos de  
380 Butantan 1901 - 1917. Cornell University, São Paulo, pp. 428-496.
- 381 McLaughlin, J.L., 1991. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: two  
382 simple bioassays for higher plant screening and fractions, in: DEY, P.M., HARBONE, J.B.  
383 (Eds.), Methods in Plant Biochemistry. Academic Press, New York, pp. 1-32.
- 384 Meintieres, S., Nessler, F., Pallardy, M., Marzin, D., 2003. Detection of ghost cells in the  
385 standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. Environmental and Molecular  
386 Mutagenesis, 41, 260-269.
- 387 Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L.,  
388 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica  
389 45, 31-34.
- 390 Moneim, A.E.A., Ortiz, F., Leonardo-Mendonça, R.C., Vergano-Villodres, R., Guerrero-  
391 Martínez, J.A., López, L.C., Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., 2015. Protective effects of  
392 melatonin against oxidative damage induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) crude venom in  
393 rats. Acta Tropica 143, 58-65.
- 394 Nuñez, J.G., 2011. Efecto del veneno entero de *Centruroides gracilis* (Scorpionida: Buthidae)  
395 sobre la proliferación celular in vitro, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad  
396 del Valle, Santiago de Cali, p. 59.
- 397 Ohkawa, H., Ohishi N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by  
398 thiobarbituric acid reaction. Annals of Biochemistry 95, 351–358.
- 399 Oliveira, C.H.M., Simão, A.A., Marcussi., 2016. S. Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin  
400 E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by Bothrops venom.  
401 Pharmaceutical Biology 58.



- 402 Quintela, F.M., Loebmann, D. Guia ilustrado: os répteis da região costeira do extremo sul do  
403 Brasil. Pelotas: USEB, 2009. p. 65.
- 404 Rocha, M.M.T.d., Furtado, M.d.F.D., 2007. Análise das atividades biológicas dos venenos de  
405 *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). Revista  
406 Brasileira de Zoologia 24, 8.
- 407 Rocha, M.M.T.d., Paixao-Cavalcante, D., Tambourgi, D.V., Furtado Mde, F., 2006. Duvernoy's  
408 gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): neutralization  
409 of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). *Toxicon* :  
410 official journal of the International Society on Toxinology 47, 95-103.
- 411 Sales, P.B.V., Santoro, M.L., 2008. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake  
412 venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147,  
413 85-95.
- 414 Salgueiro, A.C.F., Leal, C.Q., Bianchini, M.C., Prado, I.O, Mendez, A.S.L., Puntel, R.L.,  
415 Folmer, V., Soares, F.A., Ávila, D.S., Puntel, G.O., 2016. The influence of *Bauhinia forficata*  
416 Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human  
417 erythrocytes exposed to high glucose concentrations. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 81–  
418 87.
- 419 Salgueiro, A.C.F., Leal, C.Q., Bianchini, M.C., Prado, I.O., Mendez, A.S.L., Puntel, R.L.,  
420 Folmer, V., Soares, F.A., Ávila, D.S., Puntel, G.C., 2013. The influence of *Bauhinia forficata*  
421 Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human  
422 erythrocytes exposed to high glucose concentrations. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 81-  
423 87.

- 424 Sadhasivam, G., Muthuvel, A., Rajasekaran, R., Pachaiyappan, A., Thangavel, B., 2014.  
425 Studies on biochemical and biomedical properties of *Conus betulinus* venom. *Asian Pacific*  
426 *Journal of Tropical Disease* 4, 8.
- 427 Sharkawi, F.Z.E., Sale, S.S., Sayed, A.F.M.E., 2015. Potencial anti cancer activity of snake  
428 venom, bee venom and their components in liver and breast carcinoma. *International Journal*  
429 *of Pharmaceutical Sciences and Research* 6, 11.
- 430 Silva, J., 2007. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. *Genética na*  
431 *Escola* 02, 30-33.
- 432 Strapazzon, J.D., Parisotto, E.B., Moratelli, A.M., Garlet, T.R., Bastos, J., Zimmermann, I.R.,  
433 Zanin, M., Fagundez, R., Lino, M.R.D., Frode, T.S., Wilhelm, D., 2015. Systemic oxidative  
434 stress in victims of *Bothrops* snakebites. *Journal of Applied Biomedicine* 13, 161-167.
- 435 Swenson, S., Costa, F., Minea, R., Sherwin, R.P., Ernst, W., Fujii, G., Yang, D.Y., Markland,  
436 F.S., 2004. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits  
437 breast cancer progression. *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 499-511.
- 438 Tanjoni, I., Butera, D., Spencer, P.J., Takehara, H.A., Fernandes, I., Moura-da-Silva, A.M.,  
439 2003. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a  
440 monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. *Toxicon : official journal of the*  
441 *International Society on Toxinology* 42, 809-816.
- 442 Tromm, C.B., Rosa, G.L.d., Bom, K., Mariano, I., Pozzi, B., Tuon, T., Silva, L.A.d., Pinho,  
443 R.A.d., 1012. Efeito de diferentes frequências semanais de treinamento sobre parâmetros de  
444 estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Cineantropometria Desempenho Humano* 14, 8.

- 
- 445 Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals  
446 and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International*  
447 *Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- 448 Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T., Balasubramanian, T., 2007. Isolation And  
449 Biological Properties Of Neurotoxin From Sea Anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*).  
450 *The Internet Journal of Toxicology* 5, 5.
- 451 Villela, I. V., Oliveira, I.M., Silva, J., Henriques, J.A., 2006. DNA damage and repair in  
452 haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental  
453 contaminants. *Mutation Research*, 605, 78-86.
- 454 Zelanis, A., Rocha, M.M.T; Furtado, M.F.D., 2010. Preliminary biochemical characterization  
455 of the venoms of five Colubridae species from Brazil. *Toxicon*, 55, 666-669.

## DISCUSSÃO

O Ministério da Saúde (2016) relata para o ano de 2015, 24.467 acidentes envolvendo serpentes no Brasil. Uma prevalência de 13,3 casos a cada 100 mil habitantes, totalizando 107 mortos. Diante de tanta exposição humana a ofídios, trabalhos voltados ao aprimoramento das técnicas utilizadas no tratamento decorrido em situações de envenenamento fazem-se necessários. Para tanto, devemos conhecer os efeitos gerados pelas toxinas.

Nos tratamentos utilizados em casos de envenenamento, o antiveneno específico é o único remédio. O Brasil produz basicamente quatro classes de antivenenos: antibotrópico, anticrotálico, antielapídico e antilaquético; os quais são padronizados para cada região ou país. Pois a composição da peçonha pode variar entre diferentes populações de uma mesma espécie (THEAKSTON et al., 2003).

Então, percebe-se que a família Dipsadidae não apresenta um soro antiofídico específico, embora esta família represente até 40% dos acidentes ofídicos no país (SILVEIRA; NISHOKA, 1992; CARVALHO; NOGUEIRA, 1998; SANTOS-COSTA et al., 2001; SALOMÃO, 2003). Embora não exista registros do número de acidentes ocasionados pela *P. patagoniensis*, as atividades proteolíticas do veneno das espécies de seu gênero *Philodryas* pode superar às do gênero *Bothrops* (GAY et al., 2005; ROCHA et al., 2006). Além de apresentar uma DL<sub>50</sub> próxima às da *Bothrops* em camundongos (FURTADO et al., 1991; ROCHA; FURTADO, 2007).

Somado ao fato de que os constituintes do veneno de *P. patagoniensis* demonstram ser compatíveis com as de outras serpentes opistóglifas regionais (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; MACKESSY, 2002), os estudos desta dissertação podem refletir a realidade de outras serpentes ao mostrar que, sob determinadas concentrações, a peçonha da espécie em questão é cito e genotóxica. E que, na ausência de atividade DNase, principal responsável pela hidrólise do DNA em casos de envenenamento (SALES; SANTORO, 2008), tal toxicidade está provavelmente ligada ao OS gerado pela peçonha nos modelos adotados. Sugestão apoiado por Fang et al. (2015) ao sugerir que, se todos os fatores que levam a danos no DNA forem mantidos constantes, o teste cometa surge como um bom parâmetro indireto de OS.

Os danos gerados pelo OS exigem métodos alternativos de tratamento para beneficiar a população. Já que Strapazzon et al. (2015) demonstrou que o tratamento convencional não interfere no estresse desencadeado. Um dos métodos que está sendo estudado para casos de envenenamento por serpentes é a administração de moléculas antioxidantes como a melatonina, ácido ascórbico, além de complexos vitamínicos (MONEIM et al., 2015; OLIVEIRA et al.,

2016). Pois sabe-se que o OS ocorre e é duradouro em humanos acidentados (STRAPAZZON et al., 2015). De modo que todos revelaram-se promissores na defesa dos organismos.

A  $DL_{50}$  encontrada para a *P. patagoniensis* permitiu classifica-la como uma toxina de grau médio (MCLAUGHLIN, 1991). Para Meyer et al. (1982), esta dose encontrada utilizando *A. salina* como modelo experimental, sugere que o composto apresenta propriedades bioativas com potenciais antitumorais. Pesquisas, na busca por esta propriedade, têm demonstrado que esta sugestão pode ser cabível. Entre as espécies de serpentes nacionais estudadas, Furtado e Nepomuceno (2012) verificaram o potencial antitumoral da serpente jararaca-pintada *Bothrops pauloensis* em *Drosophila melanogaster*. Em outros países, Zouari-Kessentini et al. (2009) mostra que a peçonha da víbora-chifruda *Cerastes cerastes*, age sobre células tumorais ao inibir sua adesão e migração. Ainda na linha farmacológica, Mosca (2008) destaca o potencial antibacteriano da peçonha de algumas espécies de serpentes. E Nery et al. (2015) mostra que o veneno de *Philodryas nattereri* é capaz de inibir significativamente o crescimento *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis spp. choleraesuis*. Ambos autores promovem, assim, a possibilidade de se criar antibióticos a base das SVMs.

Nestes estudos, assim como sugerido por McLaughlin e Rogers (1998), as artêmias proporcionaram parâmetros de fracionamento da peçonha testada no princípio do trabalho, os quais mostraram-se diretamente relacionados com os danos celulares e genéticos relatados. Estes invertebrados, inicialmente modelo de citotoxicidade em linhagens de células cancerígenas (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN, 1991), mostram-se também relacionadas a células saudáveis. Fato que alicerça um dos principais desafios da atualidade: ao testar num composto sua propriedade anticancerígena, como isolá-la a fim de não danificar células sadias.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo da realização da presente dissertação notamos uma série de obstáculos que teríamos. Limitações como o aprendizado do processo de ordenha dos animais, a escassa quantidade de peçonha produzida pelas serpentes, bem como a padronização das concentrações a serem trabalhadas, foram superadas com sucesso. No entanto, uma dificuldade relatada ao trabalhar com serpentes opistóglifas, é a impossibilidade de separar sua peçonha da saliva, que é coletada juntamente no momento da ordenha.

Inicialmente, este trabalho procurou caracterizar o perfil toxicológico da zootoxina de *P. patagoniensis* em leucócitos mononucleares humanos. Onde, após o tratamento com diferentes concentrações, constatou-se sua capacidade em danificar as células. Sugere-se que o estresse oxidativo desencadeado pela peçonha esteja relacionado com os danos celulares constatados, bem como aludido para as víboras.

Esta citotoxicidade e genotoxicidade averiguada manteve uma relação direta com a toxicidade aguda em *A. salina*. As doses letais para o modelo animal foram aquelas que obtiveram uma toxicidade significativa, enquanto que nas subletais não houve o mesmo impacto. Assim, embora deva haver mais testes, é possível que a *A. salina* possa ser utilizada como modelo de citotoxicidade e genotoxicidade no campo da toxinologia. Este modelo animal também permitiu enquadrar a peçonha de *P. patagoniensis* como uma toxina de grau médio. Caracterizando-a como um composto contendo moléculas bioativas, e com potencial farmacológico.

### PERSPECTIVAS

O presente trabalho trouxe novos dados a respeito de uma serpente que está entre as mais conhecidas do Bioma Pampa. Mas sabemos que ao responder determinadas perguntas, abrimos caminho para que novas indagações sejam levantadas. Essas, por sua vez, serão nossas perspectivas de trabalho futuro:

- Examinar se há diferença significativa na concentração de proteínas da peçonha quando a extração ocorre com e sem pilocarpina;
- Verificar se ocorre diferença na concentração proteica do veneno quando testado por outro método de dosagem de proteínas;
- Verificar se a saliva da *P. patagoniensis* pode ser tão tóxica quanto sua toxina;
- Constatar a presença de efeitos mutagênicos da toxina por meio de análise de micronúcleos;
- Estudar os processos de necrose e apoptose celular quando submetidas a zootoxina;
- Verificar a presença das enzimas Acetilcolinesterase, ATPase e ADPase;
- Verificar os efeitos da toxina sobre o crescimento bacteriano de *E. coli* e *S. aureus*;
- Confirmar se a toxina apresenta propriedades anticancerígenas como sugerido nas análises toxicológicas em *A. salina*;
- Analisar a influência das baixas concentrações de peçonha em modelo de diabetes in vitro;
- Analisar a influência do soro antiofídico botrópico sobre o estresse oxidativo gerado em eritrócitos;
- Investigar possíveis efeitos protetores dos extratos vegetais utilizados pela população, como o ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha*) e a guanxuma (*Sida tuberculata*), em acidentes ofídicos;
- Caracterizar o veneno por meio de análises de eletroforese e cromatográfica, comparando com dados de outras regiões do país.

## REFERÊNCIAS

- ABEGG, AD.; NETO, O. M. E. Serpentes do Rio Grande do Sul. Tapera: LEW, 2012. p. 102.
- ACOSTA, O.; LEIVA, L.C.; PEICHOTO M. E.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; REY, L. Hemorrhagic activity of the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the northeast region of Argentina. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1007-1012, 2003.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, p. 335-393, 2002.
- ARAÚJO, M. E.; SANTOS, A. C. M. C. A. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 517-519, 1997.
- ASSAKURA, M. T.; SALOMÃO, M. G.; PUERTO, G.; MANDELBAUMI, F. R. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edemaforming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon**, v. 30, n. 4, p. 427-438, 1992.
- AULETTA, A.; ASHBY, J. Workshop on the relationship between short-term information and carcinogenicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 11, p. 135-145, 1988.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BELPAEME, K; COOREMAN, K; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 3, p. 167-184, 1998.
- BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 2, p. 227-230, 2004.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates 2ª ed.** Sunderland: Sinauer Associate, 2007. p. 938.
- CÂMARA, M. R. Biomassa de Artêmia na carcinicultura: repercussões ambientais, econômicas e sociais. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, n. 82, p. 40-45, 2004.
- CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET J. P.; RAVANAT, J. L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutation Research**, v. 424, n. 1-2, p. 9-21, 1999.
- CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: HOFFMAN, D. et al. **Handbook in cytotoxicology**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1993. v. 1. p. 1-5



- CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEON, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUAREZ, P., SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, p. 1063–1074, 2005.
- CARDOSO, S. R. T.; SANTOS, S. M. A. Observações sobre predação da serpente *Philodryas patagoniensis* por aves. **Biologia Geral e Experimental**, v. 12, n. 2, p. 7-9, 2012.
- CARVALHO, M. A.; NOGUEIRA, F. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, p. 753-763, 1998.
- CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1459-71, 2001.
- COLPO, A. C.; ROSA, H.; LIMA, M. E.; PAZZINI, C. E. F.; CAMARGO, V. B.; BASSANTE, F. E. M.; PUNTEL, R.; ÁVILA, D. S.; MENDEZ, A.; FOLMER, V. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 209, n. 15, p. 185–195, 2016.
- COSTA, R. S. C.; PRUDENCIO, L.; FERRARI, E. F.; SOUZA, G. H. M. F.; DE MELLO, S. M.; PRIANTI, A. C. G.; RIBEIRO, W.; ZAMUNER, S. R.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Neuromuscular action of venom from the South American colubrid snake *Philodryas patagoniensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 1, p. 31-38, 2008.
- ENNA, S. J.; FEURSTEIN, G. Z.; PIETTE, J.; WILLIAMS, M. Fifty years of biochemical pharmacology: the discipline and the journal. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 1-10, 2008.
- EVANS, C. J.; AGUILERA, R. J. DNase II: genes, enzymes and function. **Gene**, v. 322, n. 11, p. 1–15, 2003.
- EVANS, C. J.; MERRIAM, J. R.; AGUILERA, R. J. *Drosophila* acid DNase is a homolog of mammalian DNase II. **Gene**, v. 295, p. 61–70, 2002.
- FANG, L.; NEUTZNER, A.; TURTSCHI, S.; FLAMMER, J.; MOZAFFARIEH, M. Comet Assay as an Indirect Measure of Systemic Oxidative Stress. **Journal of Visualized Experiments**, v. 99, 2015.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, 1997.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969–985, 2005.

FURTADO, S. G.; NEPOMUCENO, J. C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio de teste wts (warts). **Perquirere**, v. 9, n. 1, p. 224-240, 2012.

FRAZIER, J. M. **In vitro Toxicity testing. Applications to safety evaluation**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. p.300.

FURTADO, M. F. D.; COLLETO, G. M. D. D.; DA SILVA, W. D. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991.

GANS, C. **Reptilian venoms: some evolutionary consideration**. In: GANS, C.; GANS, K. A. *Biology of the Reptilia*. New York: Academic Press, p. 1-42, 1978.

GAY, C. C.; LEIVA, L. C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; PÉREZ, O. A. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 546-554, 2005.

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

HALLIWELL, B. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences – Nature*, 2001. Disponível em: <[http://web.sls.hw.ac.uk/teaching/level4/bcm1\\_2/reading/oxidative\\_stress/files/Oxidative\\_stress.pdf](http://web.sls.hw.ac.uk/teaching/level4/bcm1_2/reading/oxidative_stress/files/Oxidative_stress.pdf)>. Acessado em: 28/06/2016.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research**, v. 443, n. 1-2, p. 37-52, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, v. 246, p. 501-14, 1986.

HARTMANN, P.; MARQUES, O. A. V. Diet and habitat use of two sympatric species of *Philodryas* (Colubridae), in south Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, p 25-31, 2005.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica 10<sup>a</sup> ed.** Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 2004, p. 488.

KANG, S. A.; GANG, Y. J.; PARK, M. In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. **Free Radical Research**, v. 28, p. 93–107, 1998.

KARDONG, K.V. Colubrid Snakes and Duvernoy's "Venom" Glands. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 21, p. 1-19, 2002.

KARDONG, K.V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids to elapids. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 46, p. 105-118, 1982.

KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 236-240, 2007.

KOCHVA, E. **Oral glands of the reptilia.** In: GANS, C.; GANS, K. A., Biology of the Reptilia. New York: Academic Press, p. 43-161, 1978.

KOCHVA, E.; GANS, C. Salivary glands of snakes. **Clinical Toxicology**, v. 3, n.3, p. 363-387, 1970.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry 4<sup>th</sup> Ed.** W. H. Freeman: Portland, 2005.

LEMA, T. **Os répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis, biogeografia, ofidismo.** EDIPUCRS: Porto Alegre, 2002. 166 p.

LÓPEZ, M. S.; GIRAUDO, A. R. Ecology of the snake *Philodryas patagoniensis* (Serpentes, Colubridae) from northeast Argentina. **Journal of Herpetology**, v. 42, n. 3, p. 474-480, 2008.

MACKESSY, S.P. Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 21, p. 43–83, 2002.

MACKESSY, S.P. Phosphodiesterases, ribonucleases and deoxyribonucleases. BAILEY, G.S. (Ed.), **Enzymes from Snake Venom.** Fort Collins: Alaken, 1998. p. 361–404

MARQUES, R.; TINÔCO, M. S.; BROWNE-RIBEIRO, H. C.; COELHO, H. E. A.; TRAVASSOS, M. L. O. *Philodryas olfersii* predation by *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae) in restinga ecosystem, north coast of Bahia, Brazil. **Herpetology Notes**, v. 5, p. 315-317, 2012.

MARTINS, E. N.; PESSANO, N. T. C.; LEAL, L.; ROOS, D. H.; FOLMER, V.; PUNTEL, G. O.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M.; ÁVILA, D. S.; PUNTEL, R. L. Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn induced oxidative stress in chronically exposed mice. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 1, p. 74–79, 2012.

MARTINS, N. Das Opisthophagas brasileiras e seu veneno. **Coletânea de trabalhos de Butantan**, p.429-96, 1901-1917.

MCKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B. H.; DE MÉO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review. **Mutation Research**, v. 288, p. 47-63, 1993.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, p. 513-24, 1998.

MCLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumors on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions, in: DEY, P.M., HARBONE, J.B. (Eds.), **Methods in plant biochemistry**. Academic Press, New York, pp. 1 – 32, 1991.

MEDEIROS, C. R.; HESS, P.L.; NICOLETI, A.F.; SUEIRO, L.R.; DUARTE, M.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; FRANÇA, F.O.S. Bites by the colubrid snake *Philodryas patagoniensis*: A clinical and epidemiological study of 297 cases. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 1018-1024, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MEINTIERES, S.; NESSLANY, F.; PALLARDY, M.; MARZIN, D. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, p. 260-269, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica – Dados. 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1025-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/animais-peconhentos-serpentes/12-animais-peconhentos-serpentes/13712-situacao-epidemiologica-dados> >. Acessado em: 30/07/2016.

MONEIM, A. E. A.; ORTIZ, F.; LEONARDO-MENDONC, R. C.; VERGANO-VILLODRES, R.; GUERRERO-MARTÍNEZ, J. A.; LÓPEZ, L. C.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G. Protective effects of melatonin against oxidative damage induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) crude venom in rats. **Acta Tropica**, v. 143, p. 58-65, 2015.

MOSCA, R. C. **Inibição do crescimento da microflora oral por venenos de serpentes**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-16102009-150801/publico/RodrigoCrespoMosca.pdf> >. Acessado em: 17/07/2014.

NERY, M. D. A.; RIBEIRO, R. T. M.; NEGREIROS, A. P.; AQUINO, H. D.; AQUINO, M. D.; NERY, E. A.; AQUINO, A. D.; NOGUEIRA, N. A. P.; MONTEIRO, H. S. A. Antibacterial activity of venom from *Philodryas nattereri* Steindachner, 1870. **Scientia Amazonia**, v.4, n.1, p. 101-104, 2015.

NICOLELLA, A.; FERREIRA, E. M.; LESSA, C. A. S. **Relatório Anual 2014. Dados de Atendimento**. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual

de Produção e Pesquisa em Saúde, Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014. Disponível em: < <http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/2014.pdf> >. Acessado em: Jul/2016.

NICOLELLA, A.; FERREIRA, E. M.; LESSA, C. A. S. **Relatório Anual 2013. Dados de Atendimento**. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013. Disponível em: < <http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/201302.pdf> >. Acessado em: Jul/2016.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia 3ª ed.** São Paulo: ATHENEU, 2008, p. 79.

OLIVEIRA, C. H. M.; SIMÃO, A. A.; MARCUSSI, S. Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by *Bothrops* venom. **Pharmaceutical Biology**, v. 58, n. 5, 2016.

ONDEI, L. S.; TERESA, F. B.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Avaliação de fatores preditivos de estresse oxidativo em pessoas saudáveis. **Biotemas**, v. 27, n. 3, p. 167-173, 2014.

OSTLING, O; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PEICHOTO, M. E.; MACKESSY, S. P.; TEIBLER, P.; TAVARES, F. L.; BURCKHARDT, P. L.; BRENO, M. C.; ACOSTA, O.; SANTORO, M. L. Purification and characterization of a cystein-rich secretory protein from *Philodryas patagoniensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 79-84, 2009.

PEICHOTO, M. E.; TEIBLER, P.; MACKESSY, S. P.; LEIVA, L.; ACOSTA, O.; GONÇALVES, L. R. C.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; SANTORO, M. L. Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing  $\alpha$ -fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1770, p. 810-819, 2007.

PEICHOTO, M. E.; LEIVA, L. C.; MOYA, L. E. G.; REY, L.; ACOSTA, O. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: its effects on blood coagulation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 527-534, 2005.

PINTO, C. C.; LEMA, T. Comportamento alimentar e dieta de serpentes, gêneros *Boiruna* e *Clelia* (Serpentes, Colubridae). **Iheringia, Sér. Zool.**, v. 92, n. 2, p. 9-19, 2002.

PONTES, G. M. F. História Natural de *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae) no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil. **Tese de doutorado**: Programa de Pós-Graduação em Biociências – Zoologia, 2007. Disponível em: <

<http://repositorio.pucrs.br/dspace/bitstream/10923/5327/1/000389985-Texto%2bCompleto-0.pdf> >. Acessado em: Jan/2015.

PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S.; COGO, J. C.; ANDRADE, A. L.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A. P.; CRUZ-HOÈFLING, M. A.; RODRIGUESSIMIONI, L. Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1407- 1421, 1998.

PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S.; COGO, J. C.; ANDRADE, A. L.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; CRUZ-HOÈFLING, M. A.; RODRIGUESSIMIONI, L. The effects of duvernoy's gland secretion from the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* on striated muscle and the neuromuscular junction: Partial characterization of a neuromuscular fraction. **Toxicon**, v. 34, n. 4, p. 459-466, 1996.

PUORTO, G.; FRANÇA, F. O. S. Serpentes não peçonhentas e aspectos clínicos dos acidentes. p 108-114. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. FAPESP: São Paulo, 468p, 2003.

QUINTELA, F. M.; LOEBMANN, D. **Guia ilustrado: os répteis da região costeira do extremo sul do Brasil**. Pelotas: USEB, 2009. 65 p.

RIBEIRO, L.A.; PUORTO, G.; JORGE, M.T. Bites by the colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. **Toxicon**. v. 6, n. 37, p. 943-948, 1999.

ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 2, p. 410-418, 2007.

ROCHA, M. M. T.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; TAMBOURGI, D. V.; FURTADO, M. F. D. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (Bothrops genus). **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 95-103, 2006.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROGERO, S. O.; SOUZA-BAZZI, A.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S.; FERNANDES, K. C.; HIGA, O. Z. In vitro cytotoxicity of hydrogel membranes reticulate by ionizing radiations **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1/2, p. 1-5, 2000a.

ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000b.

- SALES, P. B. V.; SANTORO, M. L. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** v. 147, p. 85-95, 2008.
- SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; SILVA, M. P.; MENDEZ, A. S. L.; ZEMOLIN, A. P. P.; POSSER, T.; FRANCO, J. L.; PUNTEL, R. L.; PUNTEL, G. O. Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- SALOMÃO, M. G.; ALBOLEA, A. B. P.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpetological Review**, v. 34, n. 4, p 307-312, 2003.
- SANTOS, C. E. M. Toxicologia in silico: uma nova abordagem para análise do risco químico. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 1, p. 47-63, 2011.
- SANTOS-COSTA, M. C.; OUTEIRAL, A. B.; D'AGOSTTINI, F.; CAPPELARI, L. Frequência de acidentes ofídicos na região da grande Porto Alegre e cidades próximas, RS, Brasil. **Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, v. 14, n. 1, p 89-93, 2001.
- SEALE, A. Brine shrimp (*Artemia*) as satisfactory live food for fishes. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 63, p. 129-130, 1933.
- SERAPICOS, E. O.; MERUSSE, J. L. B. Morfologia e histoquímica das glândulas de Duvernoy e supralabial de seis espécies de colubrídeos opistoglifodontes (serpentes, Colubridae). **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v.46, n. 15, p. 187-195, 2006.
- SILVEIRA, P. V. P.; NISHIOKA, S. A. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in brazilian teaching Hospital – analysis of 91 cases. **Revista do Intituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 499-503, 1992.
- SINGH, NP; MCCOY, MT; TICE, RR; Schneider, EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 148-191, 1988.
- SOUTO, F. J. B. Influencias de parâmetros ambientais sobre *Artemia* sp (Branchiopoda: Artemiidae) em uma salina artesanal do estado do Rio Grande do Norte. **Curso de Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia, Universidade Federal da Paraíba**, 19 p. Notas de aula. 1991.
- STRAPAZZON, J. D.; PARISOTTO, E. B.; MORATELLI, A. M.; GARLET, T. R.; BASTOS, J.; ZIMERMANN, I. R.; ZANIN, M.; FAGUNDEZ, R.; LINO, M. R. D.; FRODE, T. S.; WILHELM, D. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. **J Appl Biomed**, v. 13, p. 161-167, 2015.
- SUN, J. Z.; TANG, X. L.; PARK, S. W.; QIU, Y.; TURRENS, J. F.; BOLLI, R. Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against

myocardial stunning in conscious pigs. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, p. 562–576, 1996.

TALAN, D. A.; CITRON, D. M.; OVERTURF, G. D.; SINGER, B.; FROMAN, P.; GOLDSTEIN, E. J. Antibacterial activity of crotalid venoms against oral snake flora and other clinical bacteria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, p. 195-198, 1991.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Relatório de um workshop da OMS sobre a padronização e controle de antivenenos. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 541-557, 2003.

UNDERWOOD, G. **A contribution to the classification of snakes**. London: The British Museum Natural History, 1967. p. 179.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol. 3, N.2, p.93-98, 2006.

WARD, J. F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 35, p. 95-125, 1988.

WEINSTEIN, S.A.; KARDONG, K.V. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. **Toxicon**, v. 32, p. 121–126, 1994.

ZELANIS, A.; ROCHA, M. M. T; FURTADO, M. F. D. Preliminary biochemical characterization of the venoms of five Colubridae species from Brazil. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 666–669, 2010.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; LUIS, J.; KARRAY, A.; KALLECH-ZIRI, O.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; LORET, E.; BEZZINE, S.; AYEB M. E.; MARRAKCHI, N. Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 444-453, 2009.



ANEXO I:

Submissão de manuscrito a revista TOXICON (e-mail recebido e processamento na revista)

Your recent submission to TOXICON

Entrada x



Toxicon <toxicon@elsevier.com>  
para marciocosta

09:17 (Há 17 minutos)



inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Dr. Márcio Costa,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Toxicon  
Corresponding Author: Vanderlei Folmer  
Co-Authors: Márcio T Costa; Aline F Silva; Andréia F Salgueiro, MSc; Hemerson S da Rosa, MSc; Giselle X Perazzo, MSc;  
Title: Evaluation of the cell viability and genotoxicity in human mononuclear leukocytes exposed to crude venom of Philodryas patagoniensis(Snake: Dipsadidae)

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at [vandfolmer@gmail.com](mailto:vandfolmer@gmail.com); do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/tox.con/l.asp?i=59551&l=4GTV8F6G>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Toxicon

**Toxicon** Contact us Help ? My EES Hub available for consolidated users ... more  
 home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out  
 Username: vandfolmer@gmail.com Switch To: Author Go to: My EES Hub  
 Version: EES 2016.4

Submissions Being Processed for Author Vanderlei Folmer, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		Evaluation of the cell viability and genotoxicity in human mononuclear leukocytes exposed to crude venom of Philodryas patagoniensis(Snake: Dipsadidae)	Jul 06, 2016	Jul 06, 2016	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu