



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**JULIANA DE ORNELLAS STRAPAZZON**

**ANÁLISE DO DANO OXIDATIVO E MONITORAMENTO  
DO STATUS ANTIOXIDANTE DE PACIENTES DE  
ACIDENTE BOTRÓPICO**

**Florianópolis  
2011**



**Juliana de Ornellas Strapazzon**

**Análise do Dano Oxidativo e Monitoramento do Status Antioxidante de  
Pacientes de Acidente Botrópico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade federal de Santa Catarina, como requisito Parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Área de concentração em Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Florianópolis  
2011

S897a

Strapazzon, Juliana de Ornellas .

Análise do Dano Oxidativo e Monitoramento do Status Antioxidante de Pacientes de Acidente Botrópico / Juliana de Ornellas Strapazzon ; Orientador Danilo Wilhelm Filho. – Florianópolis: UFSC, 2011.  
77f.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

1. Acidente ofídico. 2. Bothrops.3. Estresse oxidativo. 4. Antioxidante. I. Título.

Ficha elaborada pela Bibliotecária: Juliana Frainer CRB

14/1172.

À Esther, pelo seu sorriso onde todos os problemas se acabam.

Aos meus filhos, que ainda não vieram, desejando que cheguem a um mundo de harmonia entre homens e animais.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Danilo Wilhelm Filho, por toda paciência, conhecimento e lição de vida divididos comigo nesta orientação. Minha eterna gratidão.

A todos os pacientes, que, num momento de dor, aceitaram nos ajudar.

À minha família, por todo o suporte.

Ao CIT/SC e seus estagiários, por seu enorme e indispensável apoio. Ao Hospital Universitário UFSC (HU/UFSC), que proporcionou a realização desta pesquisa. Ao Ivan, por toda organização e ajuda indispensáveis e, ao Rodrigo, pela parceria e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

À Thaís e Ana, por toda ajuda no laboratório, pelas tardes passadas juntas e pela amizade que construímos. E, ao Bene, pela ajuda enorme em tudo! E por toda a risada que me proporcionou nas tardes laboratoriais. À Patrícia Budni, por estar sempre na retaguarda. À Joseane pelas viagens até as aulas, por dividir as alegrias, angústias e congestionamentos do mestrado. E por ter se transformado em amiga. Ao Leonardo Farias, amigo, tradutor e parceiro de todas as horas.

Aos meus amigos, que sempre tiveram paciência em me ouvir, entender ausências e a toda força nos momentos de cansaço.

À Juliana Bastos da FURB, e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Tania Fröde e, ao Gustavo O. dos Reis, por abrirem seus laboratórios a este trabalho. Ao prof Dr. Manuel Lino, pela gentileza e ajuda estatística

À UFSC pela oportunidade de ensino/pesquisa de qualidade e gratuito. Ao CNPq, PIBIC e FAPESC pelo apoio financeiro.

A todos os professores que me ajudaram a chegar até aqui. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Neusa F. de Moura, principal incentivadora e responsável pelo meu contato inicial com o mundo da pesquisa e a este mestrado e, ao Prof. Msc. Ilo O. Dias, outro responsável. Meu carinho e admiração.

Aos professores membros da banca de avaliação deste trabalho.

Ao grande pai celestial e amigos espirituais, por toda a proteção nos muitos quilômetros rodados nestes 2 anos na estrada.

**Muito obrigada!**

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena  
Acreditar no sonho que se tem  
Ou que seus planos nunca vão dar certo  
Ou que você nunca vai ser alguém ...  
... Confie em si mesmo  
Quem acredita sempre alcança.

Renato Russo

## RESUMO

Atualmente ocorrem aproximadamente 22000 acidentes ofídicos por ano no Brasil, sendo no estado de Santa Catarina registrados pelo Centro de Informações Toxicológicas localizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, 618 ocorrências no ano de 2009. O gênero *Bothrops* é responsável por aproximadamente 90% destes acidentes. Nenhum caso de ofidismo por *Bothrops* tem registro na literatura relativamente ao estabelecimento do chamado estresse oxidativo, somente em outros ofídios peçonhentos não pertencentes ao gênero, onde ocorrem igualmente processos inflamatórios relacionados. O presente trabalho consiste na análise do estresse oxidativo e monitoramento do status antioxidante nos processos de dano presente no sangue de pacientes vítimas de picadas com espécies do gênero *Bothrops*. O monitoramento dos pacientes ocorreu a partir da entrada na emergência do Hospital Universitário até 30 dias após, sendo os grupos divididos em relação ao tempo de seguinte forma: tempo 0 (t0), tempo 24 horas (t24h), tempo 7 dias (t7d) e tempo 30 dias (t30d). Foram examinadas as atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST), e as defesas antioxidantes não-enzimáticas, como os conteúdos de glutathione reduzida (GSH) e vitamina E. Foram dosados também os marcadores de dano, como a lipoperoxidação (níveis de TBARS), proteína carbonilada (PC) e ainda a atividade da mieloperoxidase (MPO) como marcador inflamatório. Nas determinações iniciais em relação ao grupo controle (indivíduos saudáveis) observou-se aumento da atividade das enzimas CAT, GR e GPx e a diminuição de outras como SOD e GST, e também foi verificada a depleção da concentração de GSH, enquanto nos marcadores de dano houve aumento na concentração de TBARS e diminuição da proteína carbonilada em relação ao grupo controle. Em relação aos grupos em função do tempo, não houve diferença estatística nos distintos parâmetros examinados. O conjunto de respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo permite afirmar que o acidente ofídico promoveu um acentuado estresse oxidativo sistêmico em suas vítimas.

Palavras-chaves: Acidente ofídico. *Bothrops*. Estresse oxidativo. Antioxidante.

## ABSTRACT

### **Systemic oxidative stress in patients victims of snakebites by *Bothrops***

During 2009 approximately 22,000 victims of snakebites occurred in Brazil, and in 2009 the state of Santa Catarina recorded 681 visits at the Centro de Informações Toxicológicas at the Hospital Universitário in Universidade Federal de Santa Catarina. The genus *Bothrops* is responsible for approximately 90% of such accidents. No case of snakebite by *Bothrops* has been recorded in the literature regarding the establishment of oxidative stress, only in other snakes not belonging to this genus, where there also induced inflammation. The present work consists of the analyses of oxidative stress and monitoring of the antioxidant status in the blood of patients victims of snakebites from *Bothrops* species. Patient monitoring started from the emergency entrance at the Hospital Universitário and up to 30 days, with groups divided as follows: time 0 (t0), time 24 hours (t24h), time 7 days (t7d) and time 30 days (t30d). The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST), and contents of non-enzymatic antioxidant defenses, such as reduced glutathione (GSH) and vitamin E were examined. Markers of oxidative damage such as lipid peroxidation (TBARS), protein carbonyl (PC) and also the activity of myeloperoxidase (MPO) as an inflammatory marker were also measured. Initial determinations compared to the control group (healthy subjects) revealed increased activity of CAT, GR and GPx and decrease activities of SOD and GST together with the depletion of GSH contents, while markers of oxidative damage showed increased concentrations of TBARS and decrease concentrations of protein carbonyl compared to the control group. Regarding the temporal effect there was no statistical differences among the groups in the distinct parameters analysed. The responses obtained in the biomarkers of oxidative stress indicate that the *Bothrops* bites promoted a pronounced systemic oxidative stress in the patients.

**Keywords:** Snakebites. *Bothrops*. Oxidative stress. Antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gênero <i>Bothrops</i> ( <i>B. jararaca</i> , <i>B. jaraca</i> e <i>B. jararacussu</i> )..	17
Figura 2: Reações locais ao veneno botrópico.....	19
Figura 3: Redução tetravalente do oxigênio até água e formação das EROs durante este processo.....	20

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	41
Gráfico 2: Atividade da Catalase (CAT) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	42
Gráfico 3: Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	43
Gráfico 4: Atividade da Glutaciona redutase (GR) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	44
Gráfico 5: Atividade da Glutaciona S-transferase (GST) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	45
Gráfico 6: Concentração de Glutaciona reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	46
Gráfico 7: Concentração de vitamina E no plasma sanguíneo de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	47
Gráfico 8: Concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico TBARS no no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	48
Gráfico 9: Concentração de proteína no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	49
Gráfico 10: Concentração de mieloperoxidase (MPO) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias). .....	50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Número de atendimentos registrados no Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina no ano de 2009.....	16
Quadro 2: Caracterização das principais EROs formadas <i>in vivo</i> .....	22
Quadro 3: Caracterização da amostra.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca <sup>++</sup>	Cálcio
CAT	Catalase
Cu <sup>++</sup>	Cobre
DSB	Quebra dupla de cadeia
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe <sup>++</sup>	Ferro
GCL	Glutamato cisteína ligase
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferase
GR	Glutathione redutase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
GT	Glutathione total
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HO <sup>•</sup>	Radical hidroxil
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HClO <sup>-</sup>	Ácido hipocloroso
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
•NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PC	Proteína Carbonilada
MS	Ministério da Saúde
CIT	Centro de Informações Toxicológicas
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RO <sup>•</sup>	Radical alcóxil
ROO <sup>•</sup>	Radical peróxil
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
SOD	Superóxido dismutase

SSB	Quebra simples de cadeia
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCR	Receptores de células T
SVMP	Snake Venom Metalloproteinase
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 ACIDENTE OFÍDICO.....	14
1.1.1 Gênero <i>Bothrops</i> .....	16
1.1.2 Veneno botrópico.....	17
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	19
1.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	22
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO .....	24
1.4.1 Dano ao DNA .....	25
1.4.2 Peroxidação Lipídica.....	25
1.4.3 Dano às proteínas .....	26
1.5 O ACIDENTE BOTRÓPICO E O ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	29
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES .....	30
3.1.1 Critérios de inclusão.....	30
3.1.2 Critérios de exclusão .....	30
3.1.3 Dados obtidos.....	31
3.1.4 Definições .....	31
3.1.4.1 Protocolo clínico para tratamento de acidente ofídico .....	32
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	32
3.3 EQUIPAMENTOS.....	32
3.4 REAGENTES .....	33
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	33
3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	33
3.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO .....	34
3.7.1 Defesas antioxidantes enzimáticas .....	34
3.7.1.1 Superóxido Dismutase (SOD) .....	34
3.7.1.2 Catalase (CAT).....	35
3.7.1.3 Glutationa Peroxidase (GP <sub>X</sub> ).....	35
3.7.1.4 Glutationa Redutase (GR).....	36
3.7.1.5 Glutationa S-transferase (GST).....	36
3.7.2 Análise das Defesas Antioxidantes não Enzimáticas .....	37
3.7.2.1 Glutationa Reduzida (GSH) .....	37
3.7.2.2 Vitamina E.....	37
3.7.3 Determinação dos Marcadores de Dano.....	38
3.7.3.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS .....	38

3.7.3.2 Proteína Carbonilada.....	38
<b>3.7.4 Determinação da Mieloperoxidase .....</b>	<b>39</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	40
4.2 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS .....	40
4.2.1 Atividade da SOD .....	40
4.2.2 Atividade da CAT .....	41
4.2.3 Atividade da GPx .....	42
4.2.4 Atividade da GR.....	43
4.2.5 Atividade da GST.....	44
4.3 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS .....	46
4.3.1 Glutaciona Reduzida (GSH).....	46
4.3.2 Vitamina E.....	46
4.4 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO .....	48
4.4.1 TBARS .....	48
4.4.2 Proteína Carbonilada .....	49
4.5 MPO.....	50
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO A; PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA COM SERES HUMANOS .....</b>	<b>74</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ACIDENTE OFÍDICO

Os envenenamentos causados pelas picadas de serpentes (acidente ofídico) constituem um grave problema nos países tropicais, devido à sua alta incidência, gravidade e seqüelas, que mesmo com a neutralização do veneno através do soro antitotrópico, os danos causados aos tecidos locais geralmente não são evitados, e exigem a notificação obrigatória ao Ministério da Saúde e suas secretarias estaduais (OLIVEIRA et al., 2008). No Brasil tais envenenamentos têm os primeiros registros datados da época dos jesuítas (CARDOSO et. al, 2003) sendo que o primeiro estudo epidemiológico acerca de acidente ofídico tem data de 1901 e foi realizado por Vital Brazil, culminando este estudo na produção do soro antiveneno. Junto com as ampolas era distribuída uma espécie de ficha de notificação usada para relatar dados sobre o acidente em que tal soro fora usado. Esta ficha foi chamada de Boletim para Observação de Accidente Ophidico (BOCHNER, STRUCHINER, 2003).

Atualmente ocorrem aproximadamente 22000 acidentes ofídicos por ano no Brasil (OLIVEIRA et al., 2008), sendo no estado de Santa Catarina registrados pelo CIT/SC, 618 ocorrências no ano de 2009, constituindo, 549 casos em humanos não havendo nenhum óbito registrado (Quadro 1). O gênero *Bothrops* é responsável por aproximadamente 90% destes acidentes (OLIVEIRA et al., 2008). Até o presente momento nenhum caso de acidente ofídico por *Bothrops* tem registro na literatura relativamente ao estabelecimento do chamado estresse oxidativo, causado pelas chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), somente os poucos relatados em outros ofídios peçonhentos não pertencentes ao gênero (YAMAZAKI et al., 2008), em que ocorrem igualmente processos inflamatórios relacionados.

Como o veneno botrópico é uma mistura complexa enzimática e de proteínas tóxicas, o processo inflamatório

frequentemente resulta em uma resposta crônica, em que as metaloproteinases têm demonstrado importante papel nesta ação local do veneno (MOURA-DA-SILVA et al., 1996; CLISSA et al., 2001). Esta reação inflamatória aguda resulta de um grande influxo de leucócitos, liberação de citocinas, de metabólitos nitrogenados e também de EROs (PETRECEVICH et al., 2000; ZAMUNER et al., 2001).

No Brasil cerca de 321 espécies compõem a fauna de serpentes, sendo classificadas em torno de 75 gêneros, em 9 famílias (CARDOSO et. al, 2003). Destas, as famílias *Elapidae* e *Viperidae* são as que reúnem espécies denominadas peçonhentas. Esta determinação se refere à produção de toxinas em glândulas especializadas e com capacidade de inoculação do veneno, causando graves intoxicações em homens e animais. Os gêneros destacados na família *Viperidae*, são o *Bothrops*, inclusas todas as jararacas, jararacussu, cruzeira ou urutu e cotiare, o gênero *Crotalus*, sendo a cascavel em destaque, e o gênero *Lachesis*, sendo a surucucu a mais popular. Na família *Elapidae* as serpentes com interesse clínico são as corais, principalmente o gênero *Micrurus* sp. No estado de Santa Catarina, as serpentes causadoras de acidentes são as jararacas (*Bothrops jararaca*), jararacussu (*Bothrops jararacussu*), cascavel (*Crotalus durissus*) e a coral verdadeira (*Micrurus spp.*) (CIT\SC).

Quadro 1: Número de atendimentos registrados no Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina no ano de 2009.

Classe	Intoxicações		Informação	Total
	Humana	Animal		
Animais Peçonhentos	2593	20	272	2885
Aranhas	1195	1	89	1225
Lagartas	569	1	114	684
<b>Serpentes</b>	<b>549</b>	<b>15</b>	<b>54</b>	<b>618</b>
Outros	187	2	11	200
Escorpiões	91	1	36	128

Fonte CIT/SC

### 1.1.1 Gênero *Bothrops*

Este gênero representa o grupo que mais causa acidentes ofídicos das serpentes peçonhentas, compreendendo cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. As principais espécies são: *Bothrops atrox*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. alternatus*. São conhecidas popularmente por: jararaca, ouricana, jararacussu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, combóia, caiçara, e outras denominações. Estas serpentes habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de pequenos roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares (antes do nascer do sol e após o por-do-sol). Podem apresentar comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, desferindo botes sem produzir ruídos (CARDOSO et. al, 2003).

Popularmente conhecida como jararaca, esta espécie tem colorido muito variável desde tons castanho claros até coloração quase que completamente preta, mas são característicos os desenhos semelhantes a “V” invertido ou gancho de telefone

(Figura 1). Têm corpo delgado medindo aproximadamente 1 metro. Ágil, sobe com facilidade em arbustos e telhados baixos. Têm grande capacidade adaptativa, ocupando e colonizando áreas silvestres, agrícolas, suburbanas e até urbanas (CIT/SC).



Figura 1: Gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jaraca* e *B. jararacussu*)

### 1.1.2 Veneno botrópico

De acordo com o Ministério da Saúde, o veneno botrópico é classificado através de sua atividade como sendo inflamatório agudo, proteolítico, coagulante e hemorrágico.

Sua atividade inflamatória é decorrente de frações bioquímicas variadas como, por exemplo, fosfolipase A2, proteases, bradicinina, leucotrienos, prostaglandinas, etc. Este quadro se dá provavelmente em função da interação destas frações, mas também apresenta uma grande variabilidade (FRANÇA, MÁLAQUE, 2003; ZYCHAR et al., 2010). Com variedade complexa de componentes o veneno também atua sobre o sistema hemostático (OLIVEIRA et al., 2008), interferindo nos processos de coagulação através de substâncias que podem inativar o fator X, protrombina e fibrinogênio (FRANÇA, MÁLAQUE, 2003). No caso da atividade hemorrágica as metaloproteinases ofídicas (SVMP) são responsáveis por esta atividade. Estas enzimas degradam fibrinogênio e hidrolizam as proteínas da matriz (FOX, SERRANO, 2005; KAMIGUTI, HAY, ZUZEL, 1996; MARUYAMA et al.; 1992). A principal SVMP componente do veneno botrópico é a jararagina, uma

metalo-proteinase com característica PIII (formada por domínio catalítico, domínio desintegrina e domínio rico em cisteína). Além da potente ação hemorrágica esta enzima também pode ser responsável por processar o precursor do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), citocina esta correlacionada à dermonecrose (MOURA-DA-SILVA et al., 1996; CLISSA et al., 2001).

Os efeitos de todas as atividades citadas anteriormente podem ser observados sistemicamente ou no local da picada. Sendo que, nas primeiras horas após a picada já são evidenciadas manifestações locais como edema, dor intensa e equimose que evoluem para toda a extensão do membro afetado. Estes sintomas podem permanecer por até 6 horas após a picada. Bolhas com conteúdo seroso ou sero hemorrágico também podem surgir, de acordo com a evolução e levar à necrose (Figura 2). As complicações locais quando surgem, são decorrentes da necrose ou de infecção secundária acarretando em déficit funcional do membro ou amputação (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL, 2001; LOUREIRO, 2002). Uma série de outros sintomas também podem se instalar no paciente, tais como: náuseas, vômito, sudorese, cefaléia, gengivorragia, hematêse, hematuria, hipotensão arterial, taquicardia, oligúria, anúria, hipotensão arterial, hipovolemia e hemorragia cerebral podendo levar à morte (LOUREIRO, 2002; YAMASAKI et al., 2008).

De acordo com o alto grau inflamatório e dano aos tecidos que o veneno botrópico induz no paciente, podem estar associados a uma elevada geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), geralmente provocando um estresse oxidativo nos sítios afetados (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006). As EROS são formadas principalmente através da redução parcial do oxigênio até a água, que ocorre através de sucessivas reações na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial em consequência do próprio metabolismo oxidativo celular, e também nas vias da xantina oxidase, da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático e no sistema citocromo P-450 redutase microssomal, entre outros (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006; BERRA, MENCK, 2006). Outra fonte formadora são os fagócitos, que destroem células infectadas por bactérias ou vírus,

pela via da NADPH oxidase em células fagocíticas (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006).

Em decorrência disso, as defesas antioxidantes em pacientes de acidente ofídico estão aparentemente comprometidas por um acentuado estresse oxidativo, mostrando depleção de antioxidantes e com formação de EROs (YAMAZAKI et al., 2008).



Figura 2: Reações locais ao veneno botrópico

## 1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As EROs são geradas principalmente através de produtos intermediários do metabolismo celular oxidativo, pela redução incompleta do oxigênio a água. Esta terminologia é usada para incluir não só as espécies radicalares, mas também as espécies que não possuem elétrons desemparelhados, mas que são reativas por causa de sua instabilidade, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006).

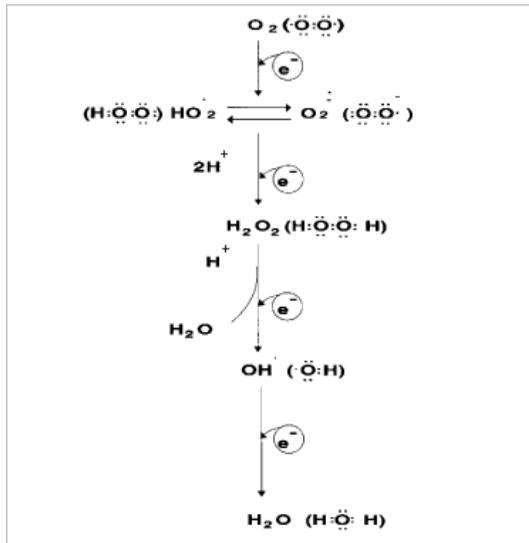


Figura 3: Redução tetravalente do oxigênio até água e formação das EROs durante este processo

Fonte: Ferreira, Matsubara (1997).

Em função da configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez (Figura 3, sendo que nestas reações de transferência alguns elétrons escapam (aproximadamente 2%) e acabam reagindo com o oxigênio molecular resultando na formação de compostos intermediários altamente reativos (BOVERIS, CADENAS, 1997; CHANCE, SIES, BOVERIS, 1979; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006). A transferência de um elétron para o  $O_2$  produz o primeiro intermediário reativo, o anion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ); o qual sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O peróxido de hidrogênio sofre uma reação de quebra das ligações entre os átomos de  $O_2$  formando o radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), catalisada por metais de transição (reação de Fenton) ou pela combinação do  $O_2^{\bullet-}$  com o  $H_2O_2$  (reação de Haber-Weiss) (BOVERIS, CADENAS, 1997; CHANCE, SIES, BOVERIS,

1979; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006). O radical hidroxil é um radical livre de oxigênio altamente reativo e apresenta uma alta atividade de reação com os constituintes celulares, oxidando resíduos de aminoácidos, alterando forma e funcionalidade de proteínas e enzimas, podendo também levar a uma alteração química das bases púricas e pirimídicas, quebrando a fita de DNA (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006). A reação das EROs com macromoléculas celulares resulta em peroxidação lipídica e lesões de membrana, inativação enzimática, mutagênese e carcinogênese (MORENO et al., 1980). A peroxidação lipídica é um conjunto de reações de EROs em cadeia que causam degeneração das membranas celulares (KAPPUS, 1987).

Existem outras formas de EROs envolvidas no dano celular formadas nas reações de propagação, como os radicais peroxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcóxil ( $\text{RO}^\bullet$ ), além de espécies reativas derivadas do nitrogênio, também chamadas de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que é derivado da rápida reação entre o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e o óxido nítrico ( $^\bullet\text{NO}$ ), e igualmente caracterizado por sua ação deletéria (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006; NAVILIAT et al., 2005).

Assim sendo, a formação das EROs e ERNs podem originar-se tanto pela via exógena quanto endógena. Como fontes exógenas incluem-se principalmente a luz ultravioleta, nos comprimentos de onda maiores que 280 nm – UVA e UVB, radiação ionizante e agentes químicos xenobióticos como fármacos, tabagismo, entre outros. Entretanto, devido ao processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias para gerar ATP, a formação destas espécies reativas também acontece de modo endógeno, sendo também produzidos pelos macrófagos e neutrófilos atuando na defesa do organismo contra bactérias e fungos, entre outros processos analógicos (CECARINI et al., 2007).

Contudo, para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das EROs, os organismos aeróbicos foram dotados de distintas e diversas defesas

antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (BOVERIS, CADENAS, 1997).

Quadro 2: Caracterização das principais EROs formadas *in vivo*

Intermediário	Comentário	Meia-vida	Sítios de formação
Radical superóxido	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron.	Decomposição enzimática na velocidade aproximada de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ em pH 7,0.	Reações de autooxidação envolvendo flavoproteínas e ciclos redox.
Peróxido de hidrogênio	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 2 elétrons.	Decomposição enzimática.	Vias catalisadas por oxidases, e pela superóxido dismutase.
Radical hidroxil	Formado a partir da redução do oxigênio molecular, por 3 elétrons nas reações de Fenton e Haber-Weiss, catalisada por metais.	$10^{-9}$ segundos	Locais adjacentes à formação de ânion superóxido/peróxido de hidrogênio na presença de metais, principalmente ferro; produto de reação do óxido nítrico com o radical superóxido.
Radical alcóxil	Radical orgânico centrado no oxigênio.	$10^{-6}$ segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Radical peróxil	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos	7 segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Oxigênio molecular Simpleto. ( $^1\Delta_g\text{O}_2$ )	Primeiro estado excitado do Oxigênio Molecular com nível de energia de 22 kcal/mol. acima do estado fundamental ou oxigênio tripleto ( $^1\text{O}_2$ ).	$10^{-5}$ segundos	Sem sítios metabólicos definidos.

Fonte: (SIES, 1985; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006).

### 1.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As substâncias para serem consideradas antioxidantes devem ser capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, mesmo em concentrações relativamente baixas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006).

Como proteção, as células são dotadas de um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas básicas, sendo uma detoxificadora do agente oxidante, antes que ele cause a lesão, constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e vitamina E; e a outra linha, atuando de forma a reparar as

moléculas modificadas por EROs, constituída principalmente pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutathione redutase (GR) e pela glutathione peroxidase (GPx) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Entre as principais defesas antioxidantes enzimáticas celulares estão incluídas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathione peroxidase (GPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das EROs. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil, que embora de vida curta e reduzida concentração, é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS, CADENAS, 1997).

Além destas defesas, as células apresentam ainda enzimas coadjuvantes e importantes na ação antioxidante como a glutathione redutase (GR) e o conjunto das glutathione S-transferases. A GR é a enzima responsável pelo mecanismo de redução da glutathione oxidada (GSSG) a glutathione reduzida (GSH), mantendo elevada a razão GSH/GSSG nas células (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006). As glutathione S-transferases (GSTs), embora não atuem diretamente contra as EROs, constituem outra importante defesa celular, pois estão associadas à biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e outros agentes carcinogênicos, isto é, fontes potenciais de EROs. Conjugando o tripeptídeo glutathione na forma reduzida (GSH) a xenobióticos através da ação das enzimas catalizadoras, tais compostos têm sua solubilidade aumentada facilitando assim a excreção (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006). As células possuem moléculas de baixo peso molecular que também são chamados de antioxidantes não-enzimáticos, classe esta onde estão incluídos compostos endógenos como a glutathione reduzida (GSH), o ácido úrico, bilirrubina, hormônios sexuais, coenzima Q; e outros antioxidantes chamados de exógenos ou nutricionais, como a vitamina E, C e A (e também carotenóides como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno), flavonóides e outras pequenas moléculas derivadas de fontes vegetais (SCANDALIOS, 1997; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006).

O tripeptídeo GSH, o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos e demais organismos aeróbios, possui a capacidade de captar EROs via auto-oxidação e pode ser encontrado em concentrações elevadas em todos os tecidos que usam o metabolismo oxidativo, compartimentos celulares e sub-celulares (WILHELM FILHO, TORRES, MARCON, 2000). É o principal substrato de enzimas como a GPx e a GST.

O desequilíbrio entre estas defesas antioxidantes e os mecanismos que causam condições oxidativas nos organismos vivos, provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (CROFT, 1998; SIES, 1985).

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes, sendo o rompimento deste equilíbrio denominado de estresse oxidativo (SIES, 1985), tendo como consequência danos às moléculas como DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (SIES, 1985, 1993; CROFT, 1998). O estresse oxidativo pode resultar não apenas de uma maior concentração de EROs, sem um aumento paralelo das defesas antioxidantes, mas também pode ocorrer devido a uma diminuição das defesas antioxidantes sem o aumento das EROs, ou ainda, pelo aumento das EROs concomitantemente a uma diminuição das defesas antioxidantes (SIES, 1985).

Em geral, a geração de EROs em níveis fisiológicos atua na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BOVERIS, CADENAS, 1997; BARZILAI, YAMAMOTO, 2004). Entretanto, mesmo em condições fisiológicas as EROs causam danos às biomoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios e DNA (EVANS, COOKE, 2004) e acentua-se em condições de estresse oxidativo (SIES, 1985). No entanto, enquanto lipídios, proteínas e carboidratos podem ser removidos via degradação, o mesmo não deve ocorrer com o DNA, em função das informações genéticas das células. O acúmulo de

lesões no DNA pode levar a conseqüências sérias para a célula, relacionadas à mutagênese e carcinogênese (MOREL et al., 2001).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças degenerativas como a aterosclerose, Alzheimer; inflamações crônicas, *diabetes mellitus*, cardiopatias entre outras (SIES, STAHL, 1997; SORG, 2004; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006; NORDBERGER, ARNÈR, 2001; GRIENGLING, FITZGERALD, 2003).

#### **1.4.1 Dano ao DNA**

A reação entre as bases do DNA e as EROS pode levar à indução de danos oxidativos, eventualmente ocasionando defeitos no processo de replicação que podem resultar em mutações ou erros de transcrição (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2006). Isto pode ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos ou na formação de quebras em uma ou nas duas cadeias de DNA.

São inúmeras as alterações que podem ser causadas pelas EROS, especialmente pelo radical hidroxil, que é conhecido por reagir prontamente com todos os componentes da molécula de DNA. Um bom exemplo desta interação é a reação entre o  $\cdot\text{OH}$  com a guanina, formando a 8-hidroxi guanina, que é usada como um indicador de dano oxidativo ao DNA e carcinogênese (VALKO et al., 2006). No caso de o dano exceder a capacidade de reparo ao DNA, às lesões podem culminar na morte celular ou em mutações no genoma (COSTA et al., 2003; EVANS, COOKE, 2004).

#### **1.4.2 Peroxidação Lipídica**

A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia nos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, alterando a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (BOWLES et al., 1991; GOODE et al., 1995).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) caracterizam-se por possuírem múltiplas ligações duplas entre os átomos de carbonos, tornando-se excelentes alvos ao ataque dos radicais livres, principalmente o  $\cdot\text{OH}$ . A interação lipídio-radical gera peróxidos, iniciando a redução de outro ácido graxo, caracterizando assim, a reação em cadeia (GUTTERIDGE, HALLIWELL, 1990).

Estas reações em cadeia quando não terminadas, ocorrem continuamente, destruindo fases lipídicas, alterando especialmente membranas e modificando partículas de lipoproteínas (SIES, 1985), e possuem 3 etapas: iniciação, propagação e terminação (THOMAS, 2003).

A degradação dos produtos compreende os derivados da decomposição de hidroperóxidos como álcoois, cetonas e aldeídos sendo, o malondialdeído (MDA) componente majoritário, cuja dosagem é realizada através do teste do ácido tiobarbitúrico (TBA). Trata-se de uma técnica amplamente utilizada, sendo o MDA o indicador específico da ocorrência de lipoperoxidação (BIRD, DRAPER, 1984).

### **1.4.3 Dano às proteínas**

A oxidação de proteínas é definida como a modificação covalente de uma proteína, induzida diretamente pelas EROs, ou indiretamente pela reação de produtos secundários do estresse oxidativo (ULRICH, CERAMI, 2001). Deve-se ressaltar que níveis elevados de carbonilação protéica são indicadores não somente de estresse oxidativo, mas também de doenças derivadas do metabolismo protéico (DONNE et al., 2003).

A exposição das proteínas ao ataque de EROs resulta em múltiplas modificações que incluem a oxidação dos grupos das cadeias laterais de aminoácidos, fragmentação, modificações na hidrofobicidade e na conformação e formação de novos grupos reativos, como os grupos carbonil. Além disso, este processo pode resultar na perda da estrutura ou inatividade enzimática das proteínas (HAWKINS, DAVIES, 2001).

Como um marcador estável de oxidação protéica a quantificação de proteínas carboniladas pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (DONNE et al., 2003), por ser a principal consequência da oxidação protéica. As cadeias laterais de todos os resíduos de aminoácidos são suscetíveis à ação das EROs, principalmente a prolina (Pro), arginina (Arg), lisina (Lis) e treonina (Tre). Os grupamentos carbonil (C=O) (presentes em aldeídos e cetonas) são produzidos pela oxidação destas cadeias laterais de aminoácidos e também podem ser gerados através da clivagem oxidativa das proteínas, tanto por oxidação das cadeias laterais de glutamato, quanto por  $\alpha$  amidação, levando à formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado por um derivado  $\alpha$  cetoacil. Do mesmo modo, derivados carbonil reativos (cetoaminas e cetoaldeídos), gerados como consequência da reação de açúcares redutores, podem levar à formação de grupos carbonil (DONNE et al., 2003).

## 1.5 O ACIDENTE BOTRÓPICO E O ESTRESSE OXIDATIVO

Até o presente momento, nenhum caso de acidente botrópico tem registro na literatura relativamente ao estabelecimento do chamado estresse oxidativo, somente em outros ofídios peçonhentos não pertencentes ao gênero ou à família (YAMAZAKI *et al.*, 2008), onde ocorrem igualmente processos inflamatórios e estresse oxidativo relacionados. Em decorrência disso, as defesas antioxidantes em pacientes de ofidismo estão aparentemente comprometidas por um acentuado estresse oxidativo, mostrando depleção de antioxidantes (YAMAZAKI *et al.*, 2008).

Nos processos inflamatórios crônicos como ocorre em determinadas doenças, como a Doença de Chagas, ficou evidenciado pelo nosso grupo de pesquisa, que o *status* antioxidante e o estresse oxidativo no sangue de pacientes chagásicos crônicos são diretamente proporcionais ao comprometimento da doença (OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Destarte, é de se esperar que pacientes de acidente

botrópico exibam um quadro semelhante em termos de processo inflamatório agudo, pelo aumento de determinados biomarcadores de estresse oxidativo, como os níveis elevados de lipoperoxidação, único biomarcador já mencionado na literatura neste particular (YAMAZAKI *et al.*, 2008).

Monitorando os pacientes internados no HU, pode-se fazer uma avaliação da extensão e profundidade do possível quadro de estresse oxidativo e inflamatório, com intuito de melhor entendimento destes processos. Numa etapa subsequente do presente estudo, pretende-se analisar a eficácia de uma suplementação antioxidante com vitaminas E e C durante o período de internação e após 4-6 meses do acidente ofídico. Com isto, intenciona-se atenuar tanto o processo oxidativo como inflamatório, uma vez que estas vitaminas antioxidantes aumentam o poder redutor sistêmico, melhorando as defesas antioxidantes dos pacientes.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o *status* antioxidante e o dano oxidativo no sangue de vítimas de acidente ofídico hospitalizadas, durante os dias de internamento e até 30 dias após a entrada na emergência do HU.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar as diferenças nos níveis intraeritrocitários das defesas antioxidantes enzimáticas (CAT, SOD, GPx, GR e GST) presentes no sangue dos pacientes durante o período de internação e até 30 dias após o dia do acidente ofídico.

b) verificar as diferenças das defesas antioxidantes não enzimáticas de GSH, de vitamina E, durante o período de internação e até 30 dias após o dia do acidente ofídico.

c) verificar o comportamento dos indicadores de dano oxidativo, níveis plasmáticos de TBARS e proteína carbonilada nestes pacientes durante o período de internação e até 30 dias após o dia do acidente ofídico.

d) avaliar a atividade da mieloperoxidase, um marcador do processo inflamatório, presente no sangue dos pacientes vítimas de ofidismo durante o período de internação e até 30 dias após o dia do acidente ofídico. Sendo em todos os casos acima citados, comparativamente aos controles e igualmente em termos temporais.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES**

Os pacientes selecionados para este estudo tiveram atendimento junto ao Centro de Informações de Toxicológicas (CIT) do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago/UFSC, após internação causada por acidente ofídico envolvendo tanto a espécie *Bothrops jararaca* como a *Bothrops jararacussu*. Após a confirmação do diagnóstico realizada pela equipe médica do HU/UFSC (história e exame físico), foram realizados exames clínicos complementares fundamentais para a classificação dos pacientes, e coletadas amostras de sangue dos mesmos nos seguintes períodos: 1) durante a internação; 2) após a primeira semana do acidente; 3) depois de decorrido um mês do acidente ofídico.

##### **3.1.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídas no estudo as vítimas de acidentes por *Bothrops spp.*, atendidas no período das 7:00 às 23:00 h, dentro de 24 horas após o acidente, seguidos da confirmação do diagnóstico por avaliação clínica (história e exame físico) e/ou identificação do agente e/ou exames laboratoriais (TP e TTPA) com indicação do Soro Antibotrópico e que concordaram em participar da pesquisa.

##### **3.1.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo os pacientes que pretendiam mudar-se para outro estado no período de acompanhamento; pacientes com déficit cognitivo ou com consequências clínicas que impossibilitaram o fornecimento de dados, tais como: sangramento e dor intensos, sono induzido por medicação, etc.

A inclusão ou não do paciente no projeto foi de espontânea vontade do paciente, quando este assinava o termo de consentimento livre e esclarecido apresentado.

### **3.1.3 Dados obtidos**

Foram colhidas amostras de 20 pacientes vítimas de acidente ofídico sendo 19 amostras em tempo 0 (t0) ou seja, após receber o soro antiofídico, com tempo médio de 2 horas pós-acidente ofídico, na admissão do paciente no HU. No tempo de 24 h (t24) foram 16 pessoas, em 7 dias (t7) 14 amostras colhidas, e em tempo de 30 dias (t30) foram 10 amostras colhidas. Nenhuma amostra foi excluída, e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Como grupo controle, foram coletadas amostras de 22 pacientes randomicamente recrutados do Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, sob responsabilidade do Dr. Jovino Ferreira dos Santos.

### **3.1.4 Definições**

A confirmação do diagnóstico ocorreu por avaliação clínica (história, exame físico e/ou identificação do agente) realizada pelos médicos que atendem na emergência do CIT/HU. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas para realização de exames clínicos complementares fundamentais para acompanhamento e avaliação dos pacientes.

#### 3.1.4.1 Protocolo clínico para tratamento de acidente ofídico

Administração, o mais rápido possível, do soro antibotrópico (SAB) por via intravenosa. Na falta deste, pode ser administrado ainda associações antibotrópico-crotálica (SABC) ou antibotrópicolaquética (SABL).

A posologia pode variar entre 2 e 12 ampolas do antiveneno. No caso do teste de coagulabilidade manter-se alterado, é indicado dose adicional de 2 ampolas do soro. Medidas gerais são tomadas como: manter elevado e estendido o membro picado; prescrição de analgésicos para alívio da dor; manter o paciente hidratado e há indicação de uso de antibióticos no caso de evidência de infecção (FUNASA; 2001).

### 3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização deste ensaio clínico longitudinal de coorte, o presente protocolo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, em abril de 2009, protocolo N°. 099/09 CEP (Anexo A). O protocolo experimental atendeu ao que determina a Resolução n° 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas clínicas bem como princípios éticos, científicos e técnicos consoantes com os padrões de aceitação internacional para ensaios clínicos (normas de *Good Clinical Practice*). Cada paciente preencheu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

### 3.3 EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas em balança analítica marca Ohaus® modelo AR2140. Os valores de pH foram medidos com pH-metro marca Digimed®, modelo DM20. A avaliação das defesas antioxidantes enzimáticas, conteúdos de GSH e outros marcadores de estresse oxidativo foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível, duplo feixe, marca/modelo GBCUV 916 acoplado a um software apropriado e

a um termostatizador eletrônico (sistema Peltier). A avaliação da vitamina E foi realizada em aparelho HPLC SCL 10 AVP Shimadzu®, Detector SPD-M10AVP Shimadzu – *Diode Array Detector*. A MPO foi determinada em leitor de Elisa (*Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA*).

### 3.4 REAGENTES

A enzima GR, os reagentes ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido ascórbico, albumina, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), D- $\alpha$ -tocoferol, epinefrina, nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH), GSH, GSSG, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e *tert*-butil hidroperóxido foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). O kit utilizado para dosagem de proteínas totais foi da marca Analiza (Brasil). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

### 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística empregada nos marcadores foi análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey–Kramer admitindo um nível de significância mínimo de  $p < 0,05$ . O emprego do teste *t* de Student será realizado entre a determinação inicial e após os intervalos (dias) dentro de cada grupo em pauta. E também admitiu um nível mínimo de significância de  $p < 0,05$ .

### 3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Imediatamente após a coleta de amostra sanguínea de cada indivíduo (via venosa, em tubos com anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante), alíquotas de sangue foram precipitadas em ácido tricloroacético 12% (1:4, v:v) e estocadas imediatamente em nitrogênio líquido (-170°C), até a realização da análise de GSH. Os tubos foram centrifugados a 5000 g durante 3 min. Após este processo do tubo sem anticoagulante foi

separado o soro, e descartado os eritrócitos. Do tubo com EDTA foi separado o plasma e os eritrócitos foram transferidos para outro tubo, onde foi adicionado água destilada (1:4, v:v) para promover hemólise. As amostras foram imediatamente estocadas em nitrogênio líquido até sua posterior análise. Esta etapa de preparação das amostras foi realizada no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Posteriormente, este material foi enviado para o laboratório de Ecofisiologia Respiratória, da Universidade Federal de Santa Catarina, acondicionado em botijão de transporte contendo nitrogênio líquido, o que confere integridade às amostras, já que estudos mostram que tióis não protéicos e enzimas antioxidantes permanecem estáveis em nitrogênio líquido por 6 meses (PALACE et al., 1990).

### 3.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

#### **3.7.1 Defesas antioxidantes enzimáticas**

##### 3.7.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida em 480 nm, de acordo com o método de Misra & Fridovich (1972), modificado por Boveris e colaboradores (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo. Quando a amostra era colocada na cubeta a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Numa cubeta contendo 1,95 ml de tampão glicina 50 mM, pH 10,2, foram adicionados 50 µl de adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação). A velocidade inicial de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100 s do início da reação, com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15 s em torno de 0,013-0,015 unidades, para então adicionar diferentes alíquotas da amostra, geralmente em torno de 50 a 100 µl, dependendo da concentração e atividade da enzima presente

nesta alíquota. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD, medidas em duplicata. Os valores da SOD ( $U\ SOD\ ml^{-1}$ ) foram expressos em termos de atividade da enzima, em que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo (MISRA, FRIDOVICH, 1972). As amostras foram tratadas por uma mistura de clorofórmio: etanol (3:5 v:v), e em seguida por adição de água destilada; após as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas (5000 g durante 4 min) para retirar a hemoglobina presente nos lisados e impedir a geração e interferência do ânion superóxido artefactual no ensaio (MISRA, FRIDOVICH, 1972).

#### 3.7.1.2 Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi analisada segundo Aebi (1984), que se baseia na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio, solução fresca de 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada no dia da análise. Posteriormente em 2 mL desta solução em cubeta foram adicionados 20  $\mu$ L do lisado e procedeu-se a leitura em 240 nm, durante os primeiros 5-10 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em  $mmol\ min^{-1}\ ml^{-1}$ . Diluições finais mínimas de 500 vezes impediram a ação peroxidativa das hemoglobinas presentes nos lisados (AEBI, 1984).

#### 3.7.1.3 Glutathione Peroxidase ( $GP_X$ )

Para a determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método de Flohé, Gunzler (1984) em que 10  $\mu$ l de amostra e 10  $\mu$ l de *tert*-butilhidroperóxido (t-BuOOH) são colocados em 1 ml de um meio de reação. Este meio de reação (50 ml) é composto de 25 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 8,6 mg de NADPH, 10 ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5 mM pH 7,0, 15 ml de água destilada, 24 mg de GSH,

3,8 µl de GR 5U e 100 µl de KCN 50 mM. O KCN é adicionado momentos antes do ensaio. O método baseia-se em dismutar o tBuOOH pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx. Sendo que a medida consiste na oxidação (diminuição da absorbância) do NADPH medido em 340 nm, uma vez que o NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela GR. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH catalisada pela GPx presente na amostra. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ . O KCN adicionado ao ensaio evita a interferência do ânion superóxido no ensaio e a superavaliação da enzima devido à oxidação da hemoglobina (FLOHÉ, GUNZLER, 1984).

#### 3.7.1.4 Glutathione Redutase (GR)

O método utilizado foi o de Calberg & Mannervick (1985), que verifica, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH, devido à formação de glutathione reduzida, a partir da GSSG, pela ação da GR, enzima presente na amostra. O ensaio é realizado em um meio de reação (50 ml) contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 32,7 mg de glutathione oxidada, 10 ml de DPTA 5 mM pH 7,0 e 15 ml de água destilada. A atividade da enzima foi analisada em duplicata e os valores foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ .

#### 3.7.1.5 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida em 340 nm, de acordo com Habig e colaboradores (1976). A amostra foi adicionada a um meio contendo 10 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), 10 µl de GSH 0,1 M e 970 µl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, sendo que na cubeta de referência utilizou-se 980 µl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, 10 µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB) e 10 µl de GSH 0,1 M. Esta técnica tem como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, para que a enzima presente na amostra conjugue a GSH ao CDNB e forme um

cromóforo detectável em 340 nm, atividade esta monitorada durante 60 s. As análises foram feitas em duplicatas e os valores expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ . Lisados concentrados foram diluídos para evitar densidades ópticas elevadas na cubeta, o que poderia interferir na avaliação da cinética enzimática, medidas em duplicata.

### **3.7.2 Análise das Defesas Antioxidantes não Enzimáticas**

#### **3.7.2.1 Glutathiona Reduzida (GSH)**

A concentração de GSH no sangue total foi determinada através dos tióis não protéicos, já que a GSH representa aproximadamente 95% destes tióis (BEUTLER et al., 1963). Para avaliar a concentração eritrocitária de pequenos tióis em precipitado ácido (TCA 12%, 1:4, v:v), foi empregado o método de Beutler e colaboradores (1963). A adição de 0,2 ml de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo 1,9 ml de tampão Tris-HCL 0,2 M pH 8,0 e 0,1 ml da amostra, permitia, após cerca de 3 min e agitação intermitente da cubeta, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em  $A_{412}$ . Os valores medidos em duplicata foram expressos em  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ .

#### **3.7.2.2 Vitamina E**

A determinação quantitativa da vitamina E foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), através de detecção UV, em 292 nm, segundo o método de Nicoletti e colaboradores (2001). Etanol (100  $\mu\text{l}$ ) foi adicionado em um tubo com tampa, seguido de 100  $\mu\text{l}$  de plasma, agitou-se em vortex por 10 s e adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de hexano. Agitou-se em vortex por mais 45 s e centrifugou-se a 800 g por 5 min. O sobrenadante (aproximadamente 75  $\mu\text{l}$ ) foi transferido para um tubo e o hexano foi evaporado em nitrogênio. Foram adicionados então, o dietileter (25  $\mu\text{l}$ ) e metanol (75  $\mu\text{l}$ ) e injetou-se 50  $\mu\text{l}$  deste extrato no sistema cromatográfico. As

colunas foram eluídas isocraticamente com metanol e o fluxo foi de 1 ml min<sup>-1</sup>. A concentração plasmática de  $\alpha$ -tocoferol foi determinada através de uma curva-padrão.

### 3.7.3 Determinação dos Marcadores de Dano

#### 3.7.3.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicata, através da detecção em A<sub>535</sub> nm dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se como produto majoritário ( $\geq 90\%$ ) o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD & DRAPER, 1984). As frações do plasma foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitadas vigorosamente. Em seguida, incubadas em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min a 100 °C. Após, o material foi resfriado durante 30 min a 5 °C e centrifugado (5 min a 10000 g) e a absorvância do cromóforo de cor rósea medida em 535 nm, sendo os valores expressos em nmol ml<sup>-1</sup>.

#### 3.7.3.2 Proteína Carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método proposto por Abraham, Reznick & Packer (1994). Foram adicionados 200  $\mu$ L do plasma em 600  $\mu$ L de DPNH (2,4-dinitro fenil hidrazina). Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente no escuro, com agitação a cada 15 min. Adicionou-se 600  $\mu$ L de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo por 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 5000 g) descartando o sobrenadante. Os *pellets* foram lavados por três vezes consecutivas com etanol-acetato de etila (1:1, v:v) 800  $\mu$ L, seguida de centrifugação por (5 min a 5000 g). Ao final, os *pellets* foram secos com auxílio de um cotonete. Adicionou-se ainda, 600  $\mu$ L de guanidina incubando-se em banho-maria a 37

°C por 1 hora. A leitura foi feita em 360 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo a técnica do biureto, através de kit proteínas totais Analiza, expressa em g/dL. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol mg<sup>-1</sup>.

### **3.7.4 Determinação da Mieloperoxidase**

As amostras de soro foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Nos dias dos experimentos, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Volumes de 20 µL da amostra foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 150 µL de meio tampão (165µL de o-dianisidina 2HCl, 50µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, H<sub>2</sub>O destilada e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 15 µL de azida sódica 1% (RAO *et al*, 1993). Incubou-se por mais 10 minutos à temperatura ambiente para posterior leitura das densidades óticas a 450 nm em leitor de Elisa (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da MPO (0,7-140 mU mL<sup>-1</sup>) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU mL<sup>-1</sup>, com o auxílio da equação de reta.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Quadro 3. Características da amostra

Características	%		Média ± DP	
	Controle	Pacientes	Controle	Pacientes
Sexo				
Masculino	58,33	70		
Feminino	41,67	25		
Criança	-	5		
Idade (anos)			39,91±11,76	41,3 ± 16,73
Coleta antes SAB		30	-	69,8 ± 13,82

Resultados expressos em percentual e média ± DP

### 4.2 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

#### 4.2.1 Atividade da SOD

No momento de entrada na emergência do HU (tempo 0), bem como após 1, 7 e 30 dias do acidente ofídico, os valores da atividade da SOD nos pacientes vítimas do acidente botrópico se mostraram com baixa atividade, ficando abaixo de 100 USOD/ml e com isso, apresentaram uma variação com alta significância \*\*\* ( $p < 0,001$ ), em comparação com que os níveis da superóxido dismutase em indivíduos saudáveis que ficaram acima de 200 USOD/ml. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico1).

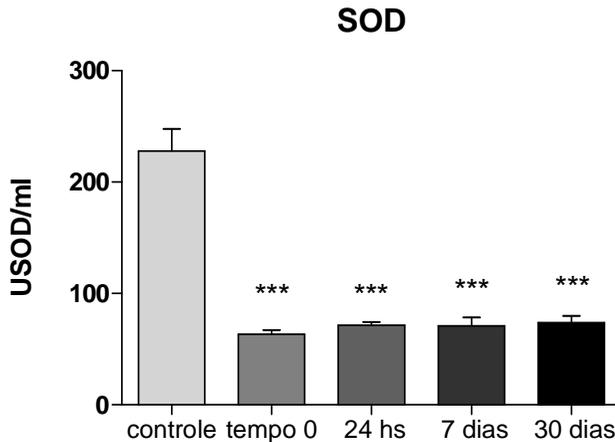


Gráfico 1: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

#### 4.2.2 Atividade da CAT

No ato do internamento (tempo 0), a CAT apresentou atividade em torno de  $14 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ , no qual ficou em torno deste valor nesta mesma faixa durante as 24 horas de internamento, bem como após 7 e 30 dias. Não houve diferença estatística significativa entre os períodos analisados. Em relação ao grupo controle, os aumentos apresentaram significância de \*\* ( $p < 0,01$ ) para os tempos de chegada (t0) e 24 horas e de \* ( $p < 0,05$ ) para 7 dias após o acidente ofídico. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico 2).

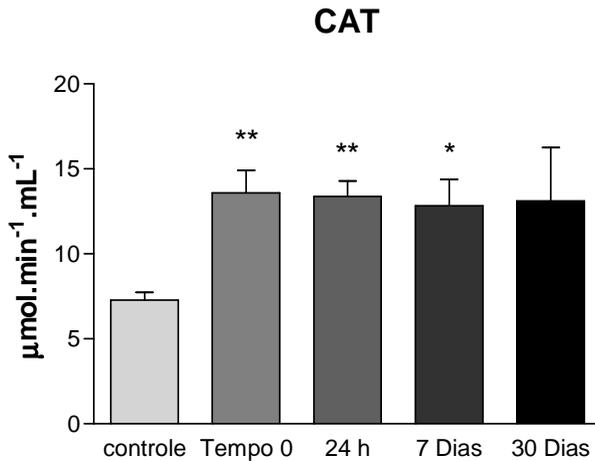


Gráfico 2: Atividade da Catalase (CAT) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

#### 4.2.3 Atividade da GPx

A atividade da GPx obteve uma alta com índice significativo de \*\* ( $p < 0,01$ ), no ato do internamento (tempo 0) em relação ao grupo controle (banco de sangue) e de \* ( $p < 0,05$ ) para 7 dias após o acidente ofídico. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico3).

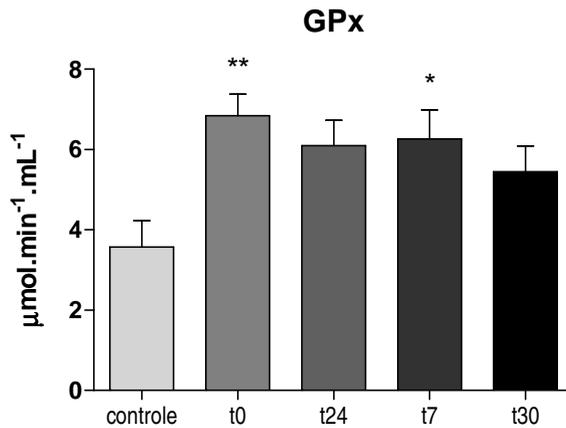


Gráfico 3: Atividade da Glutathiona peroxidase (GPx) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

#### 4.2.4 Atividade da GR

A atividade da GR em pacientes examinados em todos os intervalos de tempo, 0, 1, 7 e 30 dias, mostraram tendência de alta ficando a atividade em torno de  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ , quando comparados ao grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre grupos (Gráfico 4).

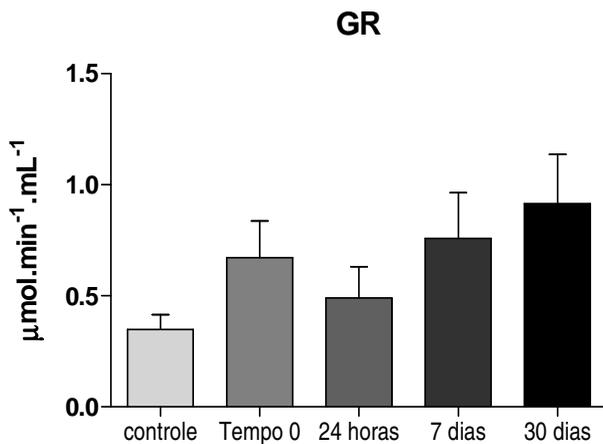


Gráfico 4: Atividade da Glutathione redutase (GR) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

#### 4.2.5 Atividade da GST

Nos indivíduos vítimas de acidente ofídico a atividade de GST foi avaliada e mostrou-se muito diminuída (abaixo de  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), comparativamente ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) em todos os tempos de coleta. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico 5).

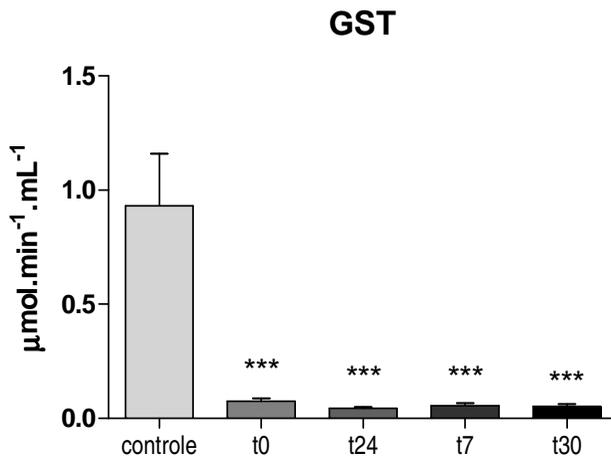


Gráfico 5: Atividade da Glutathione S-transferase (GST) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

### 4.3 DETERMINAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

#### 4.3.1 Glutathiona Reduzida (GSH)

Em comparação aos indivíduos do grupo controle, as coletas de pacientes com acidente ofídico realizadas em todos os tempos mostraram uma diminuição de alta significância \*\*\* ( $p < 0,001$ ), para os conteúdos de GSH no sangue total, em torno de 60%. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico 6).

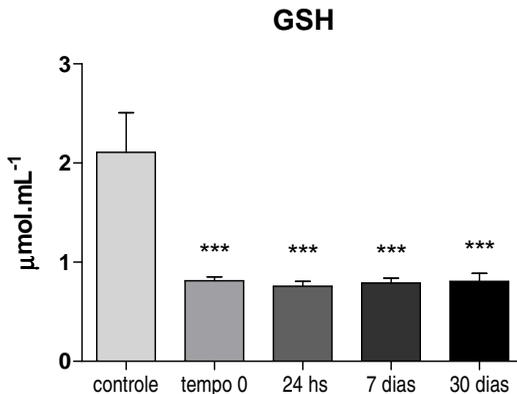


Gráfico 6: Concentração de Glutathiona reduzida (GSH) no extrato ácido do sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

#### 4.3.2 Vitamina E

Todos os tempos examinados no grupo de pacientes picados, tiveram uma diminuição altamente significativa \*\*\* ( $p < 0,001$ ), quando aplicado o índice de variância, exceção do período de 30 após a picada que apresentou uma diminuição de

$p < 0,05$ ), em comparação ao grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico 7).

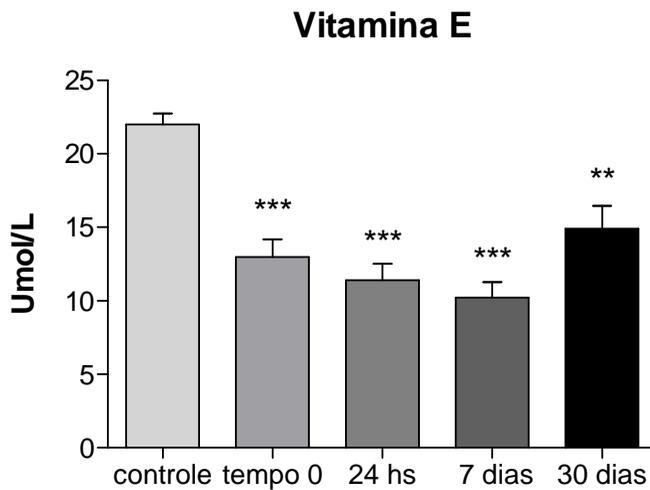


Gráfico 7: Concentração de vitamina E no plasma sanguíneo de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

## 4.4 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANO

### 4.4.1 TBARS

Considerando as determinações da concentração em função do tempo, não foi observada nenhuma alteração significativa na concentração de TBARS, quando aplicada análise de variância. Em relação ao grupo controle, os níveis mostraram-se elevados revelando apenas uma discreta tendência de diminuição da concentração no tempo de 24 horas e 7 dias após a picada, aumentando novamente após 30 dias decorridos. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico 8).

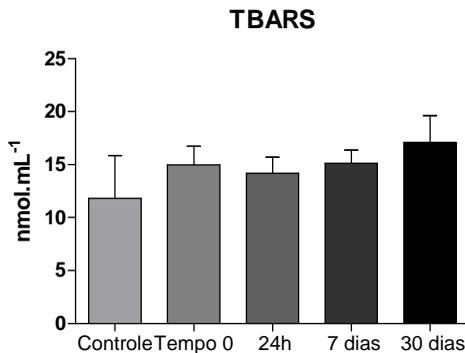


Gráfico 8: Concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico TBARS no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

#### 4.4.2 Proteína Carbonilada

Considerando as determinações iniciais, não foi observada nenhuma alteração significativa na concentração de proteína carbonilada quando aplicada análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Contudo, apresentou uma tendência de diminuição de concentração 24 hs e 7 dias após o acidente ofídico, tornando a se igualar em 30 dias (Gráfico 9).

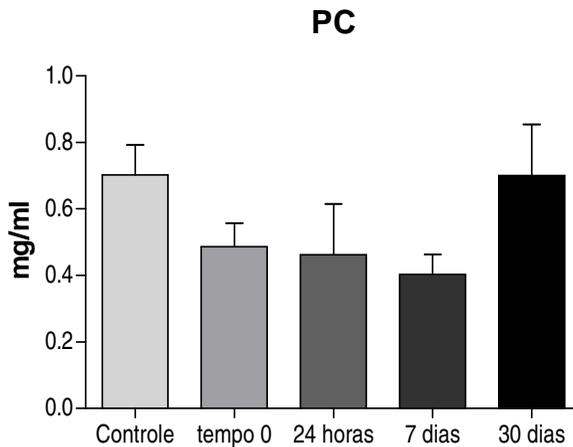


Gráfico 9: Concentração de proteína no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

#### 4.5 MPO

Considerando as determinações iniciais, foi observada uma tendência de aumento na concentração de mieloperoxidase (MPO) dos pacientes vítimas de acidente ofídico quando relacionados ao grupo controle. Entretanto, quando aplicada análise de variância seguida pelo teste de Tukey, não apresentou alteração estatística significativa. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os distintos tempos de coleta (Gráfico 10).

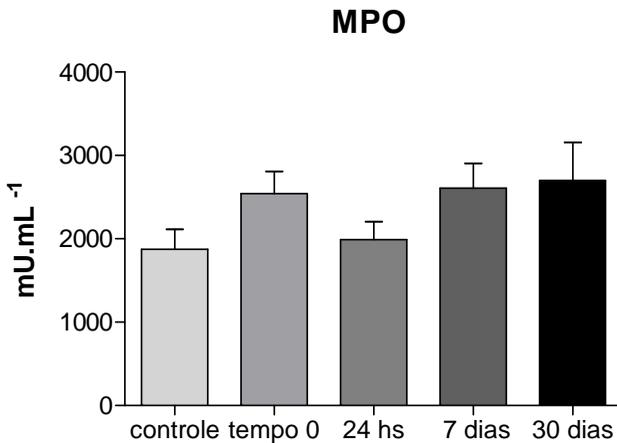


Gráfico 10: Concentração de mieloperoxidase (MPO) no sangue de indivíduos saudáveis (banco de sangue - grupo controle) e nos 3 tempos de coleta após entrada na emergência HU/UFSC e retornos (7 e 30 dias).

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com as análises feitas neste trabalho, os grupos envolvendo pacientes vítimas de acidente botrópico apresentaram a SOD com atividade muito diminuída relativamente ao grupo controle (banco de sangue). Esta resposta poderia estar associada ao processo hemorrágico que o veneno causa, pois de acordo com Ferreira e Matsubara (1997), em processos hemolíticos decorrentes de agressão térmica os glóbulos vermelhos humanos apresentam queda da atividade da SOD.

Em outro estudo, realizado por Oury e colaboradores (2002), foi relatado que o aumento da atividade proteolítica de proteases ativadas resultou em uma diminuição da SOD alveolar devido à remoção proteolítica do domínio de ligação de heparina relativamente à SOD. Por outro lado, Ueda et al.(2008) demonstraram que os níveis de SOD pulmonar foram diminuídos pela administração intravenosa com TNF- $\alpha$ , citando estudos anteriores em que a produção *in vitro* de SOD de fibroblastos da pele humana e células musculares lisas vasculares, é diminuída quando tratada com TNF- $\alpha$ , gerando outra hipótese, em que a baixa atividade de SOD poderia estar relacionada à ação das metaloproteinases presentes no veneno de Bothrops, tanto por sua atividade proteolítica, como pela via de atividade precursora de TNF- $\alpha$ .

Contrariamente ao comportamento da SOD, a atividade da CAT mostrou um aumento significativo na comparação com os controles, principalmente para os tempos próximos ao acidente ofídico, provavelmente devido ao aumento da geração de peróxido de hidrogênio, substrato específico desta enzima, causado provavelmente pela atividade inflamatória decorrente da peçonha (FRANÇA, MÁLAQUE, 2003). A catalase é uma das principais enzimas de defesa celular. A enzima atua na primeira linha de neutralização ao peróxido de hidrogênio, juntamente com a GPx, evitando assim, a formação do radical hidroxil via reações de Fenton e/ou Haber-Weiss

(BOVERIS, CADENAS, 1997). De acordo com Zamuner e colaboradores (2001), os venenos botrópicos induzem um acúmulo de leucócitos no local da picada, onde tem lugar uma importante via metabólica ativada por fagocitose em leucócitos e a conseqüente geração exacerbada de EROs, incluindo o peróxido de hidrogênio. De fato, o aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em leucócitos peritoneais de camundongos estimulados com o veneno total de *B. jararaca* observado por Zamuner e col. (2001), está relacionado com aumento da produção de mieloperoxidase associada ao acúmulo de neutrófilos nos tecidos (KUEBLER et al., 1996). Coerentemente, o veneno botrópico aumentou a produção de peróxido de hidrogênio em túbulos renais proximais de ratos (CASTRO et al., 2003).

Assim como a atividade da catalase, as determinações iniciais da atividade da GPx não apresentaram diferenças temporais significativas entre os grupos de indivíduos picados, embora tenha apresentado um aumento significativo em relação ao grupo controle, sugerindo aumento das defesas antioxidantes perante o aumento de EROs, tanto pela provável exacerbação já mencionada da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como pelo aumento da geração de hidroperóxidos, apesar de que não foi detectado um aumento significativo nos níveis de TBARS.

A enzima GPx é, a exemplo da catalase, responsável pela conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas também de outros hidroperóxidos até H<sub>2</sub>O, através da utilização e oxidação da glutationa reduzida (GSH), formando a forma oxidada da glutationa (GSSG) (CHANCE et al., 1979). De modo interessante, os aumentos nas atividades da GPx verificados em todos os tempos pós acidente ofídico, ocorreram apesar da depleção dos níveis de GSH, substrato imprescindível à sua atividade (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006). O inverso ocorreu com a atividade da GST, como será detalhada adiante, que exibiu atividades muito diminuídas após o acidente ofídico, de forma paralela à depleção dos níveis de GSH.

Em comparação aos indivíduos do grupo controle (abaixo de  $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), a atividade da GR nos grupos experimentais apresentou um aumento significativo (em torno de  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), não tendo sido detectadas diferenças significativas entre os diferentes tempos pós acidente botrópico, de acordo com o comportamento verificado nos resultados referentes às outras enzimas antioxidantes. Sendo a GR uma flavoproteína que permite a contínua conversão de GSSG para GSH, via oxidação do NADPH para NADP (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006), sugere-se que este aumento foi em consideração aos níveis depletados de GSH encontrados em todos os tempos pós-acidente botrópico, provavelmente para manter as concentrações de tal antioxidante estáveis.

A depleção da concentração da GSH poderia estar envolvida com o aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , relação já encontrada também em cultura de células presentes no processo inflamatório (ISHII et al., 1992; PHELPS et al., 1995). De acordo com Clissa e colaboradores (2001), a jararagina liberou TNF- $\alpha$  e interleucinas no local e no soro de camundongos que receberam injeções desta toxina, a qual está presente no veneno botrópico.

Ambas as tentativas de justificativas acima descritas poderiam também estar relacionadas com o fato das atividades da GST estarem muito diminuídas em comparação com os indivíduos oriundos do grupo controle do banco de sangue. Adicionalmente, a GST também regula a síntese de leucotrienos e prostaglandinas, assim como a resposta imune e inflamatória, além de participar na eliminação de hidroperóxidos, entre outros produtos produzidos de forma endógena ou mesmo oriundos do metabolismo de xenobióticos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

No caso de pacientes vítimas de acidente botrópico, fica evidente a elevação plasmática de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL6, que podem causar lesão hepática, além de aumentar a produção de EROs (OLIVEIRA JR, 2004). Como um dos principais efeitos pró-inflamatórios endoteliais do TNF- $\alpha$ , ocorre a indução da expressão de moléculas de adesão, de outras

citocinas, de fatores de coagulação e da enzima óxido nítrico sintetase tipo induzível (iNOS), responsável pela síntese de óxido nítrico.

Através da expressão dos fatores de coagulação ocorre também a supressão da atividade anticoagulante, culminando em um bloqueio do suprimento sanguíneo e necrose dos tecidos afetados. O TNF- $\alpha$  também ativa leucócitos inflamatórios como macrófagos, neutrófilos, monócitos e linfócitos, e induz os fagócitos mononucleares e outros tipos de células a produzirem citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e o próprio TNF), contribuindo assim, para o acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório (Clissa et al., 2001), e aumentando localmente a geração de EROs (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Em função deste aumento de EROs, a diminuição da concentração de vitamina E nos pacientes picados poderia estar relacionada à sua mobilização e ao aumento de seu catabolismo e a sua função antioxidante de seqüestrar EROs, mas salientando que sua participação mais importante é evitar as reações de propagação junto às membranas celulares e de organelas (MINGJIAN et al., 1992; MAGHIT et al., 2000). Neste particular e mais especificamente, a vitamina E é considerada a primeira linha de defesa da peroxidação lipídica protegendo ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares do ataque de EROs pelo seqüestro de radicais peroxil (ROO $\bullet$ ) e alcoxil (RO $\bullet$ ), acarretando no término da reação em cadeia da lipoperoxidação por formar um aducto não radicalar (SIES, 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006).

Considerando as determinações da concentração em função do tempo, não foi observada nenhuma alteração significativa na concentração de TBARS, mostraram-se elevados, revelando apenas uma discreta diminuição não significativa, da concentração no tempo de 24 horas e 7 dias após a picada, aumentando estes níveis novamente após 30 dias decorridos. Geralmente são encontrados níveis mais elevados de lipoperoxidação em processos inflamatórios (e.g. YADAV et al., 2002), ao contrário dos resultados aqui obtidos. Entretanto, os

níveis inalterados de TBARS verificados no presente trabalho, poderiam estar refletindo a depleção de vitamina E, indicando que esta importante linha de defesa antioxidante foi efetiva na proteção ao dano lipídico. Em estudos recentes de nosso grupo, pacientes chagásicos tratados com suplementação antioxidante de combinação de vitaminas E e C, sem ou com tratamento com benzonidazol, durante 6 meses, também mostraram esta relação inversa entre lipoperoxidação e níveis de vitamina E (MAÇAO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010).

No caso da avaliação dos conteúdos de proteína carbonilada, determinando o dano oxidativo às proteínas nas determinações iniciais, não foi observada nenhuma alteração significativa na concentração de PC, quando aplicada análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Apenas apresentou uma tendência de diminuição de concentração nos grupos de tempo 24h e tempo 7dias, tornando a aumentar em 30 dias após o acidente ofídico.

Com a ativação e degranulação das células inflamatórias, a mieloperoxidase, uma heme proteína secretada por células fagocíticas, particularmente pelos neutrófilos (GOLDBLUM et al., 1985), produz o ácido hipocloroso (HOCl), um potente agente oxidante citotóxico (RAJAGOPALAN et al., 1996; HEINECKE, 1998) e que possui importante ação antimicrobiana e outros corpos estranhos, incluindo componentes da peçonha botrópica (KLEBANOFF et al., 2005). Caracterizando o processo inflamatório e o estresse oxidativo inerentes ao acidente ofídico de origem botrópica, o acúmulo de neutrófilos no tecido após a injeção de jararagina foi descrito por Costa e colaboradores (2002), caracterizando uma defesa contra um dos constituintes da peçonha botrópica.

De acordo com as análises desenvolvidas neste trabalho, foi observada uma tendência de aumento na concentração da MPO nos pacientes vítimas de acidente ofídico quando comparados aos controles, notadamente após 7 e 30 dias. Esta diferença temporal poderia ser explicada pelo fato de nos tempos iniciais de até 24 horas após o acidente ofídico a lesão endotelial não ter sido ainda estabelecida, o que corrobora os

resultados de tendência de aumento de atividade após 7 e 30 dias decorridos.

Resumidamente, relativamente aos indivíduos do grupo controle, os pacientes vítimas de acidente botrópico mostraram um quadro de estresse oxidativo acentuado, refletido nas atividades eritrocitárias aumentadas da CAT, GR e GPx, enquanto que as enzimas SOD e GST mostraram atividades diminuídas em comparação aos controles. Ainda nesta comparação com indivíduos saudáveis, relativamente às determinações não-enzimáticas, a concentração sanguínea de GSH apresentou uma queda acentuada comparativamente ao grupo controle, igualmente indicando um estresse oxidativo, aspecto também verificado na depleção dos níveis de vitamina E plasmáticos. No caso da avaliação de dano oxidativo, tanto as determinações de lipoperoxidação (TBARS) como as de proteínas carboniladas (PC), não houve diferenças significativas, tanto na comparação como os controles como nas coletas pós-acidente botrópico. A atividade da mieloperoxidase (MPO) mostrou apenas uma tendência de aumento (não significativa) relativamente ao grupo controle, sugerindo o status inflamatório decorrente do veneno botrópico.

## 6 CONCLUSÕES

✓ Os resultados obtidos neste trabalho sugerem uma condição de estresse oxidativo acentuado nos pacientes vítimas de acidente botrópico, em comparação com indivíduos do grupo controle.

✓ Na comparação entre os distintos tempos de coleta pós-acidente ofídico, não foi constatada nenhuma diferença significativa, indicando que o quadro de estresse oxidativo foi mantido e não atenuado, pelo menos dentro do período de um mês pós-acidente.

## 7 PERSPECTIVAS

✓ Sendo os acidentes ofídicos grandes causadores de sequelas capazes de gerar incapacidade temporária ou definitiva para o trabalho e para as atividades habituais de lazer, os resultados obtidos no presente trabalho indicam várias possibilidades futuras, tais como:

✓ A ampliação de estudos relacionados para os demais centros de informações toxicológicas de todo o país.

✓ Dar prosseguimento ao estudo com a intervenção antioxidante através de suplementação vitamínica, visando atenuar os sintomas e sequelas nos pacientes de acidente botrópico.

✓ Se a intervenção antioxidante for efetiva, implementar a suplementação como protocolo clínico para tratamento dos acidentes botrópicos, adicionalmente à terapia usual.

✓ Avaliar o dano ao DNA, a quantidade de  $\cdot\text{NO}$  pelo nitrito/nitrato e a nitração de proteínas (níveis de 3-nitrotirosina), como marcadores adicionais de dano oxidativo adicionais.

✓ Disponibilizar os dados obtidos através de publicação em revista científica congênere, ampliando os atualmente escassos estudos relacionados ao estresse oxidativo em acidente ofídico com *Bothrops spp.*

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Z.; REZNICK; PACKER, L. Carbonyl Assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 357-363, 1994.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 204, p. 234-254, 1984.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K-I. DNA damage response to oxidative stress. **DNA Repair**. v. 3, p. 1109, 2004.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory Clinical Medicine**. v. 61, p. 882-890, 1963.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**. v 90, p.105-110, 1984.

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

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide dismutase radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L.W. **Superoxide dismutase**, CRC:Boca Raton. v. 2, p. 159-168, 1982.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression and Cellular**. Marcel Dekker: New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

BOWLES, D.K.; TORGAN, C.E.; EBNER, S. Effect of acute, submaximal exercise on exercise on skeletal muscle vitamine E. **Free Radical Research Communications**. v.14, p.139-143, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

\_\_\_\_\_. Fundação nacional da Saúde \_ FUNASA. Disponível em:  
<<http://www.funasa.gov.br/internet/linkBanner/editalCham.asp>>.  
Acesso em: 05 dez. 2010.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods Enzymology**. v. 113, p. 484-490, 1985.

CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Savier, 2003. Cap: 2-6

CASTRO, I. et al. Bothrops venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**. v. 43, p. 833–839, 2003.

CECARINI, V. et al. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Molecular Cell Research**, v. 1773, p.93-104, 2007.

CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS DE SANTA CATARINA. CIT/SC. Disponível em: <<http://www.cit.sc.gov.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**. v. 59, p. 527-602, 1979.

CLISSA, P.B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**. v. 39, p.1567-1573, 2001.

COSTA, E.P. et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venomsinduced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, p. 13-17, 2002.

COSTA, R.M.A. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**. v. 85, p.1083-1099, 2003

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. In: *Towards Prolongation of Healthy Life Span*. **New York Academy of Science**. v. 854, p. 435-443, 1998.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**. v. 329, p. 23-38, 2003.

EVANS, M. D.; COOKE, M. S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. **Bioassays**. v. 26, p. 533-542, 2004.

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, p. 61-68, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymology**. v. 105, p. 114-121, 1984.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. Pp. 72-86 In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Cardoso et al. (Orgs.). Sarvier, São Paulo – SP. 2003.

FOX, J.W., SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snakevenom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**. v.45, p. 969–985, 2005.

GOLDBLUM, S.E.; WU, K.M.; JAY, M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, p. 1978-85, 1985.

GOODE, H.F.; COWLEY, H.C.; WALER, B.E. Decrease antioxidant status and peroxidation in patient with septic shock and secondary organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 23, p. 646-651, 1995.

GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury, Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JACOBY, W.B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p.7130-7139, 1976.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. ed. 4. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1504, p. 196-219, 2001.

HEINECKE, J.W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. **Atherosclerosis**, v. 141, p. 1-15, 1998.

ISHII, Y. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated decrease in glutathione increase the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal Clinical Investigation**. v. 89, p. 794-802, 1992.

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

KAPPUS, H.; DIPLOCK, A. T. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 13, p. 55-74, 1992.

KLEBANOFF, S.J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: Role of nitrite. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 14, p. 351-360, 1993,

KUEBLER, W.M. et al. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. **International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental**. v. 16, p.89-97, 1996.

LOUREIRO, A.A.C. **Estudo Experimental da Ação Nefrotóxica da Peçonha da Serpente: *Bothrops moojeni***. 2002.148p. Tese- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, 2002.

MAÇAO, L. B. et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **International Journal of Cardiology**. v. 123, p.43-49, 2007.

MAGHIT, M. B. et al. Time course of oxidative stress after major burns. **Intensive Care Medicine**. v. 26, p.800-803, 2000.

MARUYAMA, M. et al. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (Jararaca) venom. **Toxicon**. v. 30, p. 853–864, 1992.

MINGJIAN, Z.; et al. Comparative observation of the changes in serum lipid peroxides influenced by the supplementation of vitamin E in burn patients and healthy controls. **Burns**. v. 18, n. 1, p. 19-21, 1992.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 247, p. 188-192, 1972.

MOREL, I. et al. Repair of oxidized DNA by flavonoid myricetin. **Methods in Enzymology**. v. 335, p. 308-316, 2001.

MORENO, S.N.J, et al. Stimulation of lipid peroxidation and ultrastructural alterations induced by nifurtimox in mammalian tissues. **Medicina**. v. 40, p.553-559, 1980.

MOURA-DA-SILVA, A.M. et al. Processing of protumour necrosis factor-( by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**. v. 26, p. 2000-2005, 1996.

NAVILIAT, M. et. al. Protein 3-nitrotyrosine formation during Trypanosoma cruzi infection in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, p.1825-1834, 2005.

NICOLETTI, G. et al. Plasma levels of vitamin E in Parkinson's disease. **Archives of Gerontology and Geriatrics**. v. 37, p. 7-12, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species antioxdants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, A.L. et al. Avaliação epidemiológica e laboratorial de pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Miracatu (Vale do Ribeira, São Paulo). **Revista de Patologia Tropical**. v. 37, p. 268-274, 2008.

OLIVEIRA JUNIOR, E. A. B. **Alpha glutationa S-Transferase: marcador de lesão hepática em pacientes com hepatite pelo vírus C?** 2004. 148 f. Tese – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2004.

OURY, T.D. et al. Depletion of pulmonary EC-SOD after exposure to hyperoxia, **American Journal of Physiology Lung**

**Cellular and Molecular Physiology.** v. 283, p. L777–L784, 2002.

PALACE, V. P.; MATEHWSKI, H. S. & KLAVERKAMP, J. F. Effects of sampling and storage conditions on the stability of biochemical parameters measured in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 95, p. 51-55, 1990.

PETRICEVICH, V.L. et al. Increments in cytokine and nitric oxide serum levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon.** v. 38. p.1253-1266. 2000.

PHELPS, D. T. et al. TNF- $\alpha$  induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. **The American of Journal Physiology.** v. 269, p. L551-L559, 1995.

RAJAGOPALAN, S. et al. Reactive oxygen species produced by macrophagederived from cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **Journal of Clinical Investigation.** v. 98, p. 2572-2579, 1996.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) - and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)- induced dermal inflammation. **Inflammation** v. 17, p. 723-741,1993.

RIBEIRO C.M. et al. Antioxidant therapy attenuates oxidative insult caused by benzonidazole in chronic Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**. v.145,p.27-33, 2010.

SCANDALIOS, J. G. Introduction to Oxyradicals. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 23, n. 3, p. 471-472, 1997.

SIES, H ; STAHL, W. Vitamins E and C, beta carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 62, n. 6, p. 1315S-1321S, 1997.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. **Oxidative Stress**, Ed. Academic press, USA, p. 1-7, 1985.

\_\_\_\_\_. Oxidative Stress. **Oxidants and Antioxidants**. Academic Press, p.650, 1991.

\_\_\_\_\_. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**., Berlim, v. 215, n. 2, p. 213- 219, 1993.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**. v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In: SHILS, M.E. et. al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. ed. 9. São Paulo: Manole. p. 801-812,2003.

UEDA, J. et al. Decreased pulmonary extracellular superoxide dismutase during systemic inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 45, p. 897-904, 2008.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Protein glycation, diabetes and aging. **Recent Progress in Hormone Research**. v. 1, p. 56, 2001.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**. v. 160, p. 1-40, 2006.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; MARCON, J. L. Comparative antioxidant defenses in vertebrates - Emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 7, p. 33-45, 2000.

YADAV, D. et al. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 97, p. 2634-2639, 2002.

YAMASAKI, S.C. et al. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon**. v. 52, p. 445-454, 2008.

ZAMUNER, S.R., et al. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**. v. 39, p. 1505-1513, 2001.

ZYCHAR, B.C. et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**. v. 55, p. 227-234, 2010.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO

***PROJETO: ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO E  
MONITORAMENTO DO STATUS ANTIOXIDANTE DE  
PACIENTES DE OFIDISMO ATENDIDOS NA  
EMERGÊNCIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA UFSC***

Responsáveis: Danilo Wilhelm Filho, residente na Rodovia SC 405, 435A, Fazenda Rio Tavares, Florianópolis. Telefone: 048-32374145.

Juliana de Ornellas Strapazon, residente na Rua Vereador Levino Dressel, 38, Glória, Joinville. Telefone: 047 30273231/047-96161073.

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar o estresse oxidativo e monitoramento do *status* antioxidante de pacientes de acidente ofídico atendidos na emergência do Hospital Universitário da UFSC.

Esta pesquisa tem como principal benefício monitorar os níveis de marcadores de estresse oxidativo que irá ajudar a esclarecer os danos causados pelo veneno nas defesas antioxidantes. Assim, com estes resultados podemos orientar a conduta adequada futuramente para evitar complicações provocadas pelo veneno da cobra.

Os pesquisadores, Danilo Wilhelm Filho e Juliana de Ornellas Strapazon farão a consulta de seu prontuário, coletando informações, dentre estas: idade e exames bioquímicos. Para avaliação do estresse oxidativo, será realizada uma coleta de sangue de 05 ml a mais na sua coleta de rotina durante o internamento, com material descartável.

A avaliação do seu prontuário médico e dos resultados dos exames somente será realizada pelos pesquisadores envolvidos na pesquisa e médicos responsáveis pelo seu tratamento. Todos os resultados serão de uso exclusivo desta pesquisa. Salientamos que as consultas ao seu prontuário obedecerão a Resolução CNS 196/96, as disposições legais e normativas em vigor no Brasil, como Código Civil, Código de Defesa do Consumidor, Código de Ética Médica, entre outros, além da autorização prévia da instituição, onde estão localizados os prontuários.

Você tem a liberdade de querer participar desta pesquisa ou não, no caso de aceitação, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo à continuidade de seu tratamento.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer etapa do estudo, não existindo também, compensação financeira relacionada à sua participação. Havendo comprovação de que tenham ocorrido danos causados diretamente pela pesquisa, você terá direito a tratamento médico na instituição, assim como às indenizações legalmente estabelecidas.

A qualquer momento você terá acesso aos resultados parciais da pesquisa, bem como a qualquer dado referente ao resultado dos exames de sangue.

Todos os dados coletados assim como os resultados desta pesquisa serão publicados e divulgados no meio científico sem qualquer identificação pessoal, mantendo sigilo e preservando a sua privacidade.

Esse documento será assinado em 2 (duas) vias por ambas as partes, uma pelo pesquisador responsável e outra por você.

*Eu, \_\_\_\_\_, acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo citado com as informações que foram lidas para mim ou por mim. Discuti com a pesquisadora Juliana Strapazzon sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros os*

*propósitos do estudo, os procedimentos realizados, sem desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que a garantia de acesso a tratamento hospitalar será independente de minha*

*participação ou não na pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou qualquer prejuízos.*

---

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Assinatura do Paciente

---

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Assinatura dos Pesquisadores

## ANEXOS

### ANEXO A; PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DE PESQUISA COM SERES HUMANOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE SANTA CATARINA**  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPHS

Campus Prof. João David Ferreira Lima – CEP 88040-900  
Trindade - Florianópolis - Santa Catarina - Brasil | [www.cep.ufsc.br/](http://www.cep.ufsc.br/) +55 (48) 3721-9206

**PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 099/09**

#### **I – Identificação:**

**Título do Projeto:** Análise do estresse oxidativo e monitoramento do status de pacientes de ofidismo atendidos na emergência do Hospital Universitário da UFSC.

**Área:** Ciências da Saúde - Farmácia

**Pesquisador Responsável:** Danilo Wilhelm Filho

**Pesquisador Principal:** Juliana Strapazon

**Data coleta dados:** maio de 2009 a dezembro de 2009.

**Instituição onde a pesquisa será conduzida:** Hospital Universitário da UFSC.

**Data de apresentação ao CEPHS:** 15.04.2009

#### **II - Objetivos:**

##### **Geral:**

Acompanhar durante os dias de internamento os biomarcadores de estresse oxidativo em vítimas de ofidismo (picadas de cobra) hospitalizadas.

##### **Específicos:**

- monitoramento das vítimas de picada de jararaca em todo o país durante o período de internação.
- acompanhamento dos indicadores de estresse oxidativo nestes pacientes durante o período de hospitalização.

#### **III – Sumário do Projeto:**

O projeto pretende analisar e avaliar os chamados biomarcadores de estresse oxidativo (enzimas antioxidantes e outros não enzimáticos) presentes no sangue das vítimas de picadas de cobra jararaca, atendidas na emergência do Hospital Universitário da UFSC. Haverá consulta de prontuário para coleta de informações sobre o paciente (idade e exames químicos), além de uma coleta de sangue extra (5 ml), junto com a coleta normal.

#### **IV – Comentário:**

O projeto, nos seus fundamentos acadêmicos, está bem definido e cumpre com todos os requisitos técnicos exigidos. Além disso, mostra-se bem instruído, com todas as especificações necessárias ao caso, tendo sido incluídos os documentos solicitados. Em relação ao Termo de Consentimento, este apresenta-se numa linguagem compatível com os possíveis pacientes, com redação correta e clara. Voto, portanto, pela aprovação do Projeto.

#### **V – Parecer CEPHS:**

**( X ) Aprovado**

#### **PARECER:**

Tendo em vista o exposto, somos de parecer favorável à aprovação do referido projeto.

**Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado, em reunião deste Comitê na data de 27 de abril de 2009.**

#### **RELATÓRIO PARCIAL E-ADENDO:**

Em fevereiro de 2010 recebemos relatório parcial informando que foram coletadas amostras de sangue de 12 pacientes, porém apenas 9 retornaram após a internação para novas coletas e dosagens dos biomarcadores do estresse oxidativo.

As conclusões parciais comprovaram o desequilíbrio dos antioxidantes, por isso os pesquisadores solicitam a inclusão de outros procedimentos na pesquisa, quais sejam: randomização e divisão em dois grupos, um deles receberá suplemento com Vitamina E (800mg) e Vitamina C (500mg) e o outro grupo receberá placebo durante 30 dias para posterior mensuração dos biomarcadores.

O CEP aprova apenas o relatório parcial, porém o adendo à pesquisa só poderá ser aprovado mediante apresentação de um novo de TCLE contendo as informações e esclarecimentos sobre a medicação e placebo; e de um novo orçamento sobre os custos e financiamento para os suplementos manipulados, pois não poderá onerar os pacientes (participantes), nem o Hospital Universitário por ser este de caráter público.