



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RAFAEL MATOS XIMENES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CABENEGRINA A-II FRENTE ÀS ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS E AOS EFEITOS PRESSÓRICOS
INDUZIDOS PELO VENENO DE *Bothrops jararacussu* EM RATOS.

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO
CO-ORIENTADOR: FRANCISCO JOSÉ DE ABREU MATOS

Fortaleza

2009

RAFAEL MATOS XIMENES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CABENEGRINA A-II FRENTE ÀS ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS E AOS EFEITOS PRESSÓRICOS
INDUZIDOS PELO VENENO DE *Bothrops jararacussu* EM RATOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO
CO-ORIENTADOR: FRANCISCO JOSÉ DE ABREU MATOS

Fortaleza

2009

X34a Ximenes, Rafael Matos

Avaliação da atividade da cabenegrina A-II frente às alterações bioquímicas e hematológicas e aos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos / Rafael Matos Ximenes. – Fortaleza, 2009.

126f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. *Bothrops* 2. Pterocarpanos 3. Pressão Arterial 4. Envenenamento 5. Hematologia I. Monteiro, Helena Serra Azul (Orient.) II. Título.

CDD: 615.32

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CABENEGRINA A-II FRENTE ÀS ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS E AOS EFEITOS PRESSÓRICOS
INDUZIDOS PELO VENENO DE *Bothrops jararacussu* EM RATOS.

RAFAEL MATOS XIMENES

Aprovado no dia 13 de julho de 2009

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro
Orientadora (UFC)

Prof^o. Dr. René Duarte Martins
Membro da Banca Examinadora (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Maria Goretti R. de Queiroz
Membro da Banca Examinadora (UFC)

A tio Tico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais,

Por toda minha formação como ser humano e pelo apoio na busca desse projeto de vida.

A tio Tico,

Pela infinita amizade, ensinamentos e principalmente, por ter tornado meus dias tão felizes e inesquecíveis.

A Roberto e Aida,

Por todo o carinho e companheirismo, pelo presente de uma nova família.

A professora Helena,

Pelo crédito que me foi dado, sem nem ao menos nos conhecermos.

*"Eu aprendi
que a melhor sala de aula do mundo
está aos pés de uma pessoa mais velha"*

William Shakespeare

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CABENEGRINA A-II FRENTE ÀS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS E AOS EFEITOS PRESSÓRICOS INDUZIDOS PELO VENENO DE *Bothrops jararacussu* EM RATOS. Rafael Matos Ximenes¹ e Helena Serra Azul Monteiro¹. ¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2009.

O uso de plantas medicinais no tratamento de picadas de serpentes é amplamente difundido nas culturas populares ao redor do mundo. Esta prática pode ser útil no tratamento primário de vítimas de acidentes ofídicos, principalmente em áreas onde o soro antiveneno não está prontamente disponível. Os pterocarpanos, especialmente as cabenegrinas A-I e A-II, tiveram sua atividade antiofídica comprovada em diversos modelos experimentais. Esta dissertação objetivou estabelecer uma metodologia para estudos das alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* em ratos e verificar o efeito da cabenegrina A-II nestas alterações, além de verificar o efeito da cabenegrina A-II nas alterações pressóricas induzidas pelo veneno. Foram analisados parâmetros indicativos da função renal (creatinina, uréia e ácido úrico), da função hepática (AST e ALT), de dano muscular (CK), além de glicose, eletrólitos e hemograma. As alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pelo veneno variaram conforme a via de administração, variações estas relacionadas à amplitude de absorção do veneno. Neste estudo, a via intramuscular foi escolhida para os estudos com a cabenegrina A-II. Neste modelo experimental, a cabenegrina A-II foi capaz de reverter à maioria dos efeitos bioquímicos e hematológicos produzidos pela administração do veneno de *B. jararacussu*, apontando para uma melhora considerável da função renal e hepática dos animais, bem como um dano muscular menos pronunciado. Nas alterações pressóricas causadas pelo veneno de *B. jararacussu*, a cabenegrina A-II bloqueou o efeito hipotensor do veneno, um indicativo de inibição enzimática promovida por este pterocarpano prenilado. Estes dados, acrescentados a estudos prévios realizados com essas substâncias, as colocam como uma alternativa de protótipos na busca de novos agentes antiveneno.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*, pterocarpanos, cabenegrina A-II.

ABSTRACT

ACTIVITY OF CABENEGRIN A-II IN BIOCHEMICAL, HEMATOLOGICAL AND PRESSURE EFFECTS INDUCED BY *Bothrops jararacussu* SNAKE VENOM IN RATS. ¹Rafael Matos Ximenes e ¹Helena Serra Azul Monteiro. ¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, 2009.

Medicinal plants against snakebite are widespread used in folk medicine in the world. This practice may be useful as a first treatment of snakebite victims, mainly in places where antivenom immunotherapy is not promptly available. Pterocarpanes, especially the cabenegrins A-I and A-II, had their antiophidic activity proved by several experimental models. This work aimed to fix one efficient methodology to study biochemical and hematological alterations induced by *Bothrops jararacussu* venom in rats and verify the effects of cabenegrin A-II in these alterations, besides studying the effects of cabenegrin A-II in pressure changes induced by this venom. Indicatives parameters for renal function (creatinin, urea and uric acid), hepatic function (AST and ALT) and muscle injury (CK), besides glucose, electrolytes and hemogram were analyzed. Biochemical and hematological changes varied according the way of administration of the venom, variations related to the rate of absorption of the venom. In this case, intramuscular way was chosen to study the effects of cabenegrin A-II, where cabenegrin A-II was able to block the major part of biochemical and hematological effects induced by *B. jararacussu* venom, showing an improve in renal and hepatic function and less muscle injury than control group. On pressure changes induced by *B. jararacussu* venom, cabenegrin A-II blocked the hypotensive effect of the venom, indicating enzymatic inhibition promoted by this prenylated pterocarpan. These data, added to previous studies with this class, indicate prenylated pterocarpanes as lead compounds in research of new antivenom drugs.

Keywords: *Bothrops jararacussu*, pterocarpanes, cabenegrin A-II.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Produtos naturais com atividade antiofídica	15
2.1.1 <i>Harpalyce brasiliiana Benth.</i>	18
2.1.2 <i>Pterocarpanos</i>	19
2.1.2.1 <i>Considerações gerais</i>	19
2.1.2.2 <i>Atividade farmacológica dos pterocarpanos</i>	21
2.1.2.3 <i>Cabenegrinas A-I e A-II</i>	23
2.2 Venenos botrópicos	25
2.2.1 <i>Constituintes: atividades farmacológicas e tóxicas</i>	25
2.2.2 <i>Bothrops jararacussu</i>	27
2.2.3 <i>Características dos envenenamentos botrópicos</i>	28
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais de experimentação	35
4.2 Veneno e Substâncias	35
4.3 Envenenamento experimental por <i>B. jararacussu</i>	35
4.3.1 <i>Procedimento experimental</i>	35
4.3.2 <i>Grupos experimentais</i>	36
4.3.3 <i>Determinações bioquímicas</i>	37
4.3.4 <i>Determinações hematológicas</i>	37
4.4 Efeitos da cabenegrina A-II em ratos envenenados experimentalmente	38
4.4.1 <i>Procedimento experimental</i>	38
4.4.2 <i>Ensaio experimentais</i>	38
4.4.3 <i>Determinações bioquímicas</i>	39
4.4.4 <i>Determinações hematológicas</i>	39
4.5 Efeitos na pressão arterial média de ratos anestesiados	40

4.5.1	<i>Procedimento cirúrgico</i>	40
4.5.2	<i>Sistema de aquisição de dados</i>	41
4.5.3	<i>Procedimento experimental</i>	41
4.5.4	<i>Grupos experimentais</i>	42
4.6	Análise estatística	42
4.7	Aspectos éticos	42
5.	RESULTADOS	43
5.1	Envenenamento experimental por <i>B. jararacussu</i>	44
5.1.1	<i>Grupo intramuscular</i>	44
5.1.2	<i>Grupo intraperitoneal</i>	52
5.1.3	<i>Grupo subcutâneo</i>	60
5.2	Efeitos da cabenegrina A-II em ratos envenenados experimentalmente	67
5.3	Efeito na pressão arterial média de ratos anestesiados	74
5.3.1	<i>Relação dose-efeito do veneno de <i>B. jararacussu</i> na P.A.M. e F.C.</i>	74
5.3.2	<i>Efeito da cabenegrina A-II sobre a resposta pressórica induzida pelo veneno de <i>B. jararacussu</i></i>	76
6.	DISCUSSÃO	77
7.	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	APENDICE	98

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No mundo, especialmente no Brasil, e não diferente no estado do Ceará, a população rural, mais exposta a acidentes ofídicos, na maioria das vezes não tem acesso imediato ao tratamento convencional baseado na soroterapia. Como consequência, 60% das vítimas de acidentes ofídicos são inicialmente tratadas por “curandeiros” com extratos vegetais (MORS *et al.*, 2000; OTERO *et al.*, 2000; MATOS, 2007).

A aplicação de plantas medicinais com atividade antiofídica pode ser útil no tratamento primário de vítimas de acidentes com serpentes. Isto é particularmente importante em áreas onde o soro antiveneno não está prontamente disponível (PITHAYANUKUL *et al.*, 2005).

Durante a soroterapia, a neutralização dos efeitos tóxicos sistêmicos dos venenos é normalmente alcançada, mas a neutralização do dano tecidual local raramente ocorre (CARDOSO *et al.*, 2003). A demora no atendimento a pacientes que sofrem acidentes ofídicos, mesmo com a soroterapia, pode agravar o quadro clínico, com evolução para a insuficiência renal aguda (HAVT, FONTELES & MONTEIRO, 2001).

Sendo assim, a pesquisa por novos inibidores de venenos, sejam eles sintéticos ou naturais, capazes de complementar a soroterapia, principalmente na neutralização dos danos teciduais locais, é necessária e de grande importância para saúde pública (DA SILVA *et al.*, 2007).

Algumas classes de metabólitos secundários são capazes de interagir com macromoléculas alvo – enzimas e receptores – sendo uma importante fonte para pesquisa de possíveis inibidores das ações de venenos de serpentes. O levantamento etnofarmacológico de espécies popularmente usadas para tratar

acidentes ofídicos em determinadas áreas, deve ser usado para guiar as pesquisas nessa busca (MORS *et al.*, 2000).

Em 1982, Nakagawa e colaboradores isolaram de um remédio fitoterápico, adquirido no estado do Amazonas e conhecido como “Específico Pessoa”, dois pterocarpanos prenitados com potente atividade antiofídica, os quais foram designados como cabenegrinas A-I e A-II.

De acordo com os autores, o remédio estudado era preparado a partir do extrato hidroalcoólico de uma planta não identificada botanicamente, mas conhecida popularmente como “cabeça-de-negro”. No entanto, a existência de pelo menos dez plantas conhecidas pelo mesmo nome na América do Sul impossibilitou a identificação do material original (NAKAGAWA *et al.*, 1982).

Dentre as espécies conhecidas como “raiz-de-cobra”, duas são encontradas no Ceará, ambas apresentando registros etnofarmacológicos como antiofídicas: *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) e *Harpalyce brasiliana* Benth. (Papilionoideae) (DA SILVA *et al.*, 1999; MATOS, 2007). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de saponinas triterpênicas, bredemeyerosídeos, com atividade antiofídica em *B. floribunda* (PEREIRA *et al.*, 1996) e de pterocarpanos prenitados em *H. brasiliana* (SILVA, MATOS & SILVEIRA, 1997).

A maioria dos acidentes ofídicos na América do Sul é causada por espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* (BARRAVIERA & PEREIRA, 1994). No território brasileiro, o gênero *Bothrops* possui 20 espécies classificadas e é responsável por 90% dos acidentes ofídicos (MILANI *et al.*, 1997; ZENI *et al.*, 2007).

Os venenos botrópicos induzem, qualitativamente, um quadro fisiopatológico similar, caracterizado por dano tecidual local imediato e proeminente (edema, hemorragia e mionecrose); alterações vasculares (hemorragia e choque hipovolêmico) e distúrbios coagulativos que podem evoluir até falência renal aguda (MELO, LÚCIA & HABERMEHL, 2007).

Alterações patológicas locais, provocadas por picadas de serpentes, têm sido extensivamente relatadas devido à grande variedade de enzimas e outros compostos presentes nos venenos ofídicos. Contudo, as alterações fisiopatológicas, a função das enzimas e as complicações sistêmicas induzidas por doses subletais, não estão esclarecidas para a maioria dos venenos botrópicos, incluindo o de *Bothrops jararacussu* (ZENI *et al.*, 2007).

Plantas contendo pterocarpanos têm uso descrito em diversas culturas ao redor do mundo como antídotos orais contra venenos de serpentes e aranhas (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Por possuírem atividade conhecida contra outros venenos botrópicos, e até mesmo contra o veneno de *B. jararacussu*, o estudo de pterocarpanos prenilados é uma boa alternativa para obtenção de novos agentes bloqueadores de venenos de serpentes, na busca de uma alternativa viável para complementação da soroterapia tradicional.

O estudo da atividade dessas substâncias nas alterações pressóricas induzidas pelos venenos nos possibilita um indicativo de inibição enzimática do veneno, que posteriormente poderá ser confirmado em ensaios com enzimas isoladas. As alterações bioquímicas e hematológicas servem como indicadores gerais do funcionamento sistêmico, possibilitando a avaliação guiada de quais classes enzimáticas estão sob ação das substâncias testadas, bem como, em decorrência disso, quais órgãos estão sendo “protegidos”.

Sendo assim, os modelos experimentais usados neste trabalho são adequados a pesquisa de moléculas promissoras no tratamento sistêmico, e possivelmente local, de envenenamentos ofídicos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produtos naturais com atividade antiofídica

O uso de produtos naturais contra os efeitos de picadas de serpentes tem sido reconhecido há muito tempo, mesmo em tempos modernos, mas somente nos últimos 20 anos esse uso recebeu uma atenção científica mais próxima (MORS *et al.*, 2000; MELO, LÚCIA & HABERMEHL, 2007).

Vários artigos de revisão sobre plantas medicinais e terapias alternativas foram publicados nos últimos anos provenientes de diversas partes do planeta. Um grande número deles menciona plantas com conhecida atividade de neutralização das ações de venenos ofídicos. Entretanto, somente alguns atribuem a atividade a compostos químicos identificados, e um percentual muito pequeno propõe um mecanismo de ação para esses compostos (PEREIRA *et al.*, 1994; MORS *et al.*, 2000).

No estudo de constituintes isolados de plantas previamente testadas, deve-se ter em mente que um só constituinte, normalmente não reproduz toda a atividade de um extrato. Como no caso de várias plantas medicinais, existe de fato, mais de um composto ativo presente nestas plantas, agindo em sinergismo em várias estruturas alvos (MORS *et al.*, 2000; WAGNER *et al.*, 2007).

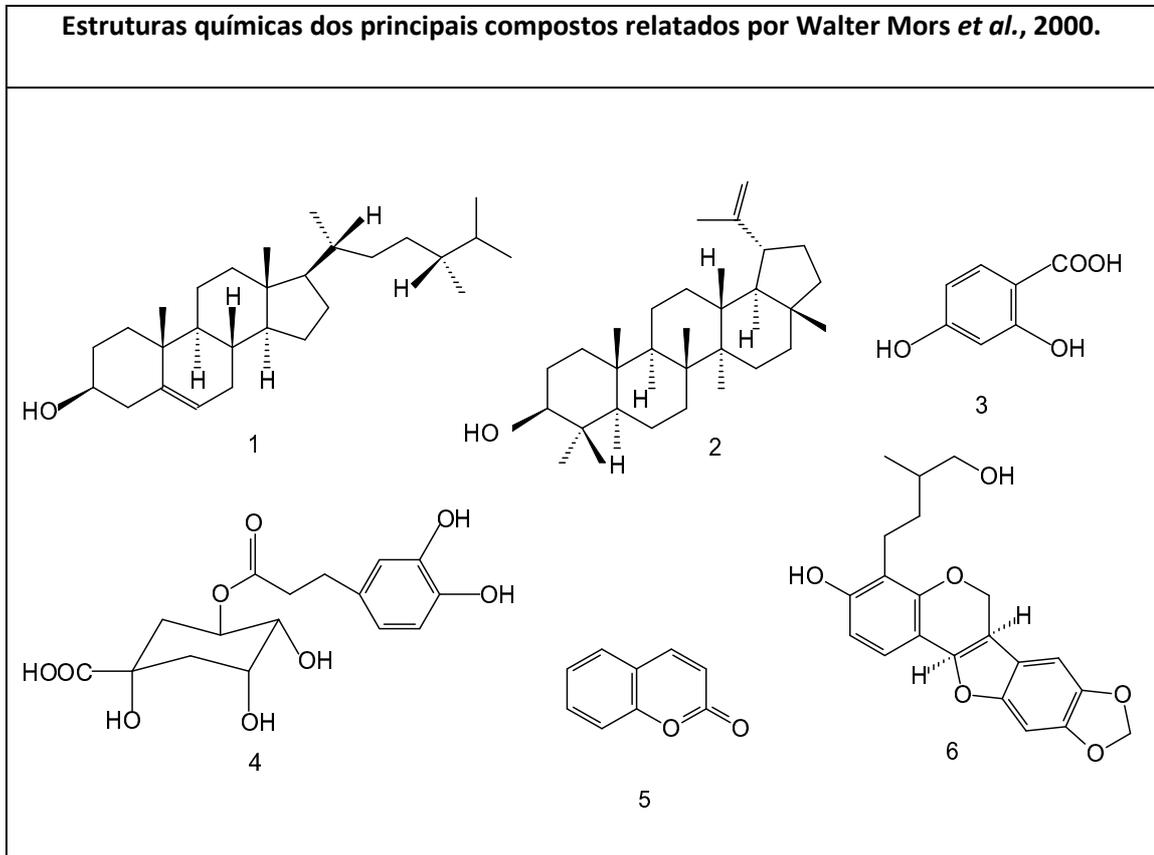
Existe certa semelhança entre a capacidade de algumas plantas, e seus constituintes ativos, de neutralizar ações de venenos ofídicos e, das mesmas, possuírem certo grau de atividade anti-inflamatória e hepatoprotetora, como no caso de *Eclipta alba* (L.) Hassk., *Curcuma longa* L. e *Aristolochia cymbifera* L. (MELO, LÚCIA & HABERMEHL, 2007). Esta observação aponta a existência de alguma analogia entre o mecanismo relacionado com estas atividades (MORS *et al.*, 2000).

As principais classes de metabólitos secundários capazes de inibir a letalidade de venenos ofídicos (MORS *et al.*, 2000) estão listadas na Tabela 1, assim como as estruturas químicas de alguns compostos estão ilustradas no Quadro 1.

Tabela 1. Principais compostos testados por Mors *et al.* (2000) frente a inibição da letalidade do veneno de *Bothrops jararaca*, divididos nas principais classes e subclasses.

Classe	Subclasse	Constituinte	% de inibição
Esteroides	Fitoesteroides	β-sitosterol	70
		Colesterol	60
Triterpenoides	Triterpenos pentacíclicos	Lupeol	70
		Friedelina	40
		Ácido Betulínico	40
		Betulinol	40
		Bredemeyerosídeo	80
		D	
Compostos Fenólicos	Derivados do Ácido		
	Hidroxibenzoico	Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	83
		Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	80
	Derivados do Ácido		60
	Cinâmico	Ácido Clorogênico	
		Cynarina	20
	Cumarinas	Cumarina	40
		Bergaptena	20
		Quercetina	40-80
	Flavonoides	Rutina	20-80
		Apigenina	40
		Derricidina	70
		Pterocarpanos	Cabenegrina A-I
		Cabenegrina A-II	100
	Cumestanos	Wedelolactona	40

Quadro 1. Estruturas químicas dos principais compostos relatados por Mors *et al.* (2000) com atividade protetora de letalidade dos venenos ofídicos. **1.** β -sitosterol; **2.** Lupeol; **3.** Ácido 2,4-dihidroxibenzoico; **4.** Ácido Clorogênico; **5.** Cumarina e **6.** Cabenegrina A-I.



Estudos realizados na Tailândia mostraram que taninos extraídos de frutos jovens de caqui (*Diospyros kaki* L.F.) têm forte efeito detoxificante para vários venenos ofídicos (OKONOGI *et al.*, 1979). A neutralização das atividades neurotóxica e hemorrágica dos venenos testados foi extremamente alta e os autores passaram a recomendar o uso do extrato dos frutos jovens para lavagens de emergência no local da inoculação do veneno nos acidentes ofídicos (PITHAYANUKUL *et al.*, 2005).

A atividade de vários extratos tem sido avaliada para o tratamento tópico de envenenamentos, principalmente botrópicos, devido aos inúmeros casos de acidentes envolvendo o gênero. *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) e *Aristolochia cymbifera* L. (Aristolochiaceae) foram testadas no tratamento local do

envenenamento por *Bothrops alternatus* em coelhos, demonstrando que o extrato de *Curcuma longa* foi efetivo no tratamento dos efeitos locais (edema, hemorragia e necrose) causados pelo envenenamento botrópico (MELO, LÚCIA & HABERMEHL, 2007).

Espécies como *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), *Eclipta prostata* L. (Asteraceae), *Mimosa pudica* L. (Fabaceae), *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae), *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) e *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson (Apocynaceae) tiveram sua atividade antiofídica comprovada nos últimos anos (BRAGA, 1976; BIONDO *et al.*, 2003; ARAÚJO, 2008; LORENZI & MATOS, 2008).

2.1.1 *Harpalyce brasiliiana* Benth.

Harpalyce brasiliiana Benth. (Papilionoideae), conhecida como “raiz-de-cobra”, tem porte arbustivo, medindo de 1 a 4 metros de altura. É encontrada principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão. Apresenta ramos alongados, folhas de coloração verde escura, aveludadas, estípulas pequenas, setáceas e caducas, com 7 a 11 folíolos, breve peciolados, oblongo elípticos de 2,5 a 3,5 cm de comprimento; flores alaranjadas; legume reto glabro de 5,0 a 7,5 cm de comprimento e 1,2 a 3,0 cm de largura (ARAÚJO, 2008).

Esta espécie, já era descrita como medicinal e utilizada na preparação de específicos (remédios para picadas de serpentes) em 1859, fato relatado na famosa obra *Flora Brasiliensis*, publicada pelo botânico Carl Friedrich Phillip von Martius na Alemanha, entre 1840 e 1906. A Figura 1 mostra exemplar fotografado pelo professor Dr. Edilberto R. Silveira, do Departamento de Química Orgânica da UFC. A Figura 2 é uma litogravura extraída de *Flora Brasiliensis*.



Figura 1. Fotos de diferentes partes de *H. brasiliiana*: (A) sementes, (B) flor, (C) raiz, (D) espécime completo em seu habitat (Retirada de Flavonoides e Floroglucínóis de *Harpalyce brasiliiana*: aspectos químicos, biológicos e espectroscópicos. ARAÚJO, 2008)

2.1.2 Pterocarpanos

2.1.2.1 Considerações gerais

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Sendo uma classe amplamente distribuída no reino vegetal, principalmente em angiospermas, apresentando neste grupo enorme diversidade estrutural (HEINRICH *et al.*, 2003; CSEKE *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2007).



Figura 2. Litogravura de *Harpalyce brasiliana* Benth., extraída de *Flora Brasiliensis* (VON MARTIUS, 1859).

Os isoflavonoides são caracterizados, como os demais flavonoides, por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. Ao contrário das outras classes de flavonoides, sua distribuição taxonômica é restrita. Salvo raríssimas exceções, são de ocorrência exclusiva em Fabaceae (Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae) (TAHARA & IBRAHIM, 1995; SIMÕES *et al.*, 2007).

Os pterocarpanos representam a segunda maior classe de isoflavonoides, depois das isoflavonas. Apresentam um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavonas, mas apresentam uma numeração diferente das isoflavonas. São subdivididos em pterocarpanos, 6a-hidróxi-pterocarpanos e pterocarpenos. A ocorrência dos pterocarpanos é ainda mais restrita, sendo os gêneros *Erythrina*, *Glycine*, *Sophora* e *Swartzia* os de maior ocorrência (AL-HAZIMI & ALKHATHLAN, 2000; SIMÕES *et al.*, 2007).

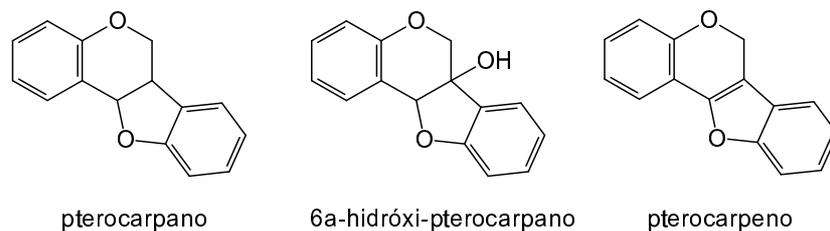


Figura 3. As estruturas das subclasses de pterocarpanos.

2.1.2.2 Atividade farmacológica dos pterocarpanos

Em fitofisiologia, os pterocarpanos são classificados como fitoalexinas, substâncias sintetizadas para defesa da planta, principalmente das infecções por fungos (AL-HAZIMI & ALKHATHLAN, 2000; SIMÕES *et al.*, 2007). Várias outras atividades farmacológicas têm sido relacionadas aos pterocarpanos além da antifúngica, como: antimicrobiana, inseticida e antiretroviral (PINHEIRO & SILVEIRA, 2006).

Nove flavonoides isolados de *Platymiscium floribundum* foram testados em linhagens de células tumorais, e dentre eles os pterocarpanos foram os mais ativos. Em seguida, essas substâncias foram testadas em ovos de ouriço-do-mar para avaliação da atividade antimitótica. Os resultados apontaram para uma atividade tão forte quanto a de doxorubicina e de etoposídeo, em concentrações nanomolares (FALCÃO *et al.*, 2005).

Pterocarpanos - isolados de *Harpalyce brasiliana* Benth. - foram avaliados quanto à atividade antimitótica em ovos de ouriço-do-mar e atividade citotóxica em linhagens de leucemia, melanoma e câncer de cólon, onde ficou claro que o substituinte metoxil em C2 é uma importante unidade farmacofórica, sendo responsável por grande parte da atividade dos compostos testados (MILITÃO *et al.*, 2007).

Harpalycina-I, erroneamente chamada de edunol, e um análogo sintético (composto 5) contendo um grupamento benzila em C4 tiveram suas atividades antifólicas contra o veneno de *Bothrops jararacussu* testadas *in vitro* e *in vivo*. Harpalycina-I inibiu a atividade mitotóxica *in vitro*, em concentrações de 0,1 – 3 μM (DA SILVA *et al.*, 2004).

O composto 5 inibiu completamente a atividade mitotóxica do veneno *in vitro* com $\text{IC}_{50} = 9,97 \mu\text{M}$. Além disso, em 100 μM , este pterocarpano benzilado também inibiu 65% da atividade fosfolipásica e 80% da atividade proteolítica do veneno de *B. jararacussu*. Todos os animais testados sobreviveram três semanas após os experimentos, enquanto no grupo controle, 50% dos animais morreram neste período. Estes dados apontam o composto 5 como um potencial novo antiveneno, necessitando de estudos mais aprofundados (DA SILVA *et al.*, 2004).

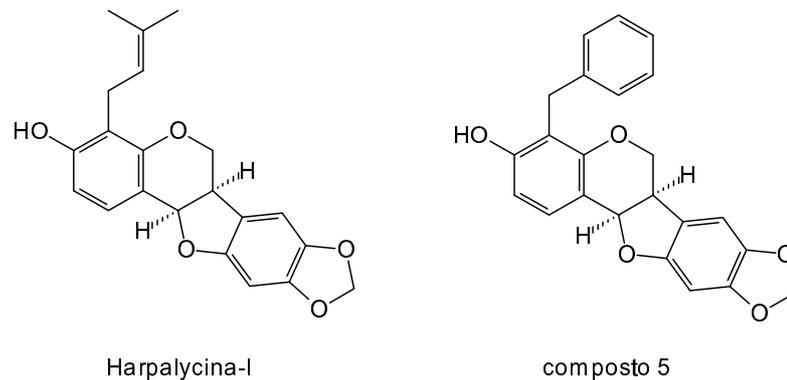


Figura 4. Estruturas da harpalycina-I e do composto 5, um pterocarpano benzilado sintético.

Plantas contendo pterocarpanos têm uso descrito em diversas culturas ao redor do mundo como antídotos orais contra venenos de serpentes e aranhas (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, 2008).

2.1.2.3 Cabenegrinas A-I e A-II

A preparação fitoterápica hidroalcoólica “Específico Pessoa”, feita a partir de uma planta sul-americana chamada “Cabeça de Negro”, é vendida na floresta amazônica como antídoto oral para picada de serpentes e aranhas (NAKAGAWA *et al.*, 1982). Este é um remédio amplamente usado na região Norte e Nordeste por trabalhadores rurais desde o início do século XX, que a tomam antes de entrar na floresta ou nas lavouras (ARAÚJO, 2008).

Duas potentes substâncias antiofídicas foram isoladas do “Específico Pessoa”, as cabenegrinas A-I e A-II, e suas estruturas foram determinadas por técnicas espectroscópicas, se tratando de dois novos pterocarpanos. Como na América do Sul existem cerca de 10 espécies chamadas pelo nome de “cabeça de negro”, os autores não puderam identificar botanicamente a espécie usada no preparo de tal remédio (NAKAGAWA *et al.*, 1982).

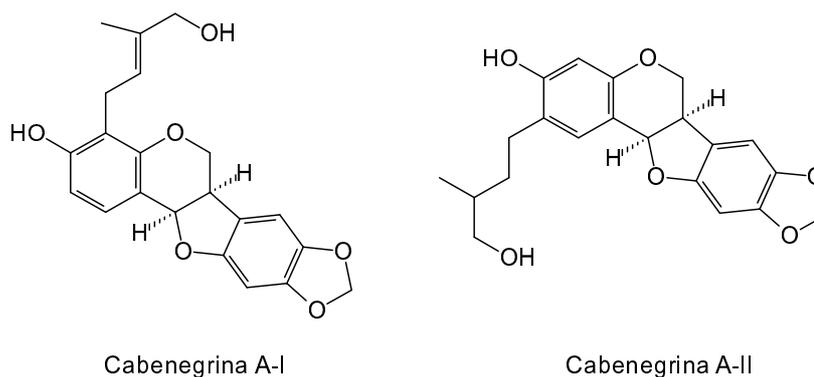


Figura 5. Estruturas das cabenegrinas A-I e A-II, primeiramente isoladas por Nakagawa *et al.* em 1982, e posteriormente encontradas em *Harpalyce brasiliiana* Benth..

No estudo de Nakagawa *et al.* (1982), camundongos *Swiss* foram injetados intraperitonealmente com 2,5 vezes a DL_{50} do veneno de *Bothrops atrox* sendo imediatamente administrada pela mesma via as cabenegrinas A-I e A-II. A sobrevivência dos animais foi medida por 24 horas. A dose mínima das cabenegrinas A-I e A-II para que os animais sobrevivessem foi de $2,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente.

As cabenegrinas também foram capazes de reverter os efeitos tóxicos do veneno de *B. atrox* administrado pela via intravenosa em cães da raça *Beagle*, assim como, reverter os efeitos cardiotóxicos em sistema de coração isolado da mesma espécie, na dose de 1 mg.kg^{-1} (NAKAGAWA *et al.*, 1982).

Foram isolados do extrato etanólico das raízes de *Harpalyce brasiliiana* Benth., conhecida popularmente como “raiz-de-cobra”, vários pterocarpanos, dentre eles, as cabenegrinas A-I e A-II (SILVA, MATOS & SILVEIRA, 1997). O isolamento destas substâncias sugeriu *H. brasiliiana* como uma das espécies utilizadas na preparação do remédio “Específico Pessoa” (ARAÚJO, 2008).

As cabenegrinas A-I e A-II também tiveram sua atividade antimetástática avaliada, com valores de IC_{50} de $0,3 - 1,8 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,4 - 7,3 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A atividade citotóxica dessas substâncias foi testada em linhagens de melanoma, colón e leucemia, apresentando para cabenegrina A-I ($IC_{50} > 25$

$\mu\text{g.mL}^{-1}$, de 6,9 - 11,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 4,4 - 59,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), e para cabenegrina A-II (IC_{50} de 12,8 - 22,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de 9,2 - 12,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $> 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) (MILITÃO *et al.*, 2007).

2.2 Venenos botrópicos

2.2.1 Constituintes: atividades farmacológicas e tóxicas

Várias substâncias são encontradas nos venenos de serpentes, suas estruturas variam das mais simples as mais complexas, com rica variedade de efeitos biológicos, e com proporções e características específicas para cada espécie. Entre 90 e 95% do peso seco dos venenos ofídicos é composto por substâncias protéicas, as quais são responsáveis por quase todos os efeitos biológicos encontrados (HAVT, 1999; ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009).

O veneno como um todo, permite as serpentes confinar, imobilizar e digerir suas presas, além de funcionar como mecanismo de defesa contra predadores. De acordo com o efeito tóxico predominante no animal envenenado, os venenos de serpentes podem ser convenientemente classificados como neurotóxicos e anti-hemorrágicos, com os venenos botrópicos pertencentes ao segundo grupo (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009).

A fração não-proteica dos venenos é composta principalmente de íons, como cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco. Porém, algumas substâncias orgânicas também estão presentes, como aminoácidos livres, pequenos peptídeos, carboidratos, fosfolipídios e aminas biogênicas (HAVT, 1999).

A fração proteica dos venenos botrópicos incluem, enzimas: isoenzimas fosfolipases A2 do grupo II (hemolíticas e não-neurotóxicas), serino proteases, metaloproteases Zn^{2+} -dependentes, L-aminoácido oxidases (LAAO); e proteínas

sem ação enzimática: Lectinas tipo C, miotoxinas, desintegrinas, inibidores Kunitz-*like*, fatores de crescimento e proteínas secretórias ricas em cisteína (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) atuam clivando lipídios de membrana, com liberação de ácidos graxos e mediadores inflamatórios, alterando a permeabilidade das membranas celulares e promovendo hemólise indireta. Além da atividade hemolítica, as PLA₂ também apresentam ações neurotóxicas pré-sinápticas (isoenzimas do grupo I) e miotóxica, dando origem a necrose e mioglobinúria (HAVT, 1999; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; TOYAMA *et al.*, 2009).

As proteases são divididas em dois grandes grupos, serino proteases e metaloproteases, ambas causando distúrbios de coagulação e dano tecidual. Algumas proteases, com ação hipotensora, liberam bradicinina, além de alterar a formação do coágulo de fibrina no final da cascata de coagulação sanguínea causando hemorragias (GOMES-RÜTH, KRESS, & BODE, 1993; DA SILVA *et al.*, 2007; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

As desintegrinas, domínios ricos em cisteína e lectinas tipo C normalmente são domínios não-enzimáticos conjugados a metaloproteases. Os domínios desintegrinas são potentes ligantes específicos da integrina, com suas ações farmacológico/toxicológicas decorrentes disso. Domínios ricos em cisteína atuam na agregação plaquetária induzida por colágeno, participando dos eventos hemorrágicos e, finalmente, lectinas tipo C ligam-se a galactose presente na membrana de células sanguíneas contribuindo para formação de trombos (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

L-aminoácido oxidases são flavoenzimas que catalisam a desaminação de L-aminoácidos para formar os α -cetoácidos correspondentes, peróxido de hidrogênio e amônia. Elas são responsáveis pela coloração amarela dos venenos, contendo flavina (FAD) como grupo prostético (cofactor ligado a proteína). As L-aminoácido oxidases contribuem para toxicidade dos venenos por causa da produção de peróxido de hidrogênio durante a reação de oxidação-redução (TOYAMA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009).

2.2.2 *Bothrops jararacussu*

O veneno de *B. jararacussu* apresenta uma alta atividade fosfolipásica, principalmente miotóxica. As principais frações fosfolipásicas básicas encontradas neste veneno são a BthTX-I, Lys-49 cataliticamente inativa e a BthTX-II, Asp-49 com baixa atividade catalítica, que são capazes de induzir mionecrose, hemorragia, edema, hipotensão e inibição da agregação plaquetária (TAKEDA *et al.*, 2004).

Além das PLA₂, são encontradas proteases, como a BjussuMP-I, uma metaloprotease hemorrágica, com atividade proteolítica sobre caseína e fibrinogênio, além de atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (MAZZI *et al.*, 2004). A BjussuSP-I, uma serinoprotease *trombina-like*, é capaz de estimular a produção de anticorpos monoclonais, que inibem sua atividade coagulativa, mas não inibem a atividade proteolítica sobre o fibrinogênio. Esta serinoprotease não apresentou atividade hemorrágica e miotóxica, nem induziu a formação de edema. Em contrapartida, BjussuSP-I possui uma potente atividade desfibrin(ogen)ante *in vivo*, apontando para uma importante característica do envenenamento associado ao consumo de fibrinogênio e coagulopatia. (PÉREZ *et al.*, 2007; SANT'ANA *et al.*, 2008).

O veneno de *B. jararacussu* altera todos os parâmetros funcionais avaliados no sistema de perfusão de rim isolado. Aumento na taxa de filtração glomerular e fluxo urinário foram independentes dos parâmetros vasoativos (pressão de perfusão e resistência vascular renal), e promovido por PAF (fator de agregação plaquetária) (HAVT, FONTELES & MONTEIRO, 2001).

Kashima *et al.* (2004), catalogou uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *B. jararacussu*, identificando a informação genética para produção de uma série de proteínas, dentre elas, algumas PLA₂ básicas (BthTX-I e BthTX-II), uma PLA₂ ácida (BthA-I), metaloproteases, serino proteases, lectinas e L-aminoácido oxidases, além de poucos clones de fator de crescimento de nervos, proteína indutora de apoptose vascular e precursor de proteína do veneno rica em cisteína.



Figura 6. *Bothrops jararacussu*

2.2.3 Características dos envenenamentos botrópicos

Ribeiro e Jorge (1997) analisaram uma série de 3.139 casos de acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, atendidos no Hospital Vital Brasil durante uma década. 97,5% dos casos foram causados por *Bothrops jararaca*. A segunda espécie na lista foi *B. jararacussu*, com 1,4% dos casos.

As principais manifestações clínicas sistêmicas foram: hemorragia (12,3% dos casos), insuficiência renal (1,6%) e choque (0,7%). As manifestações no local da picada foram mais prevalentes, ocorrendo dor (95,6%), edema (95,4%), equimose (56,1%), bolhas (13,8%), necrose (16,5%) e abscessos (11,0%). Além disso, ocorreram sangramentos fora da região anatômica da picada, destacando-se: gengivorragia (73,0% dos casos), hematúria (8,3%), hematomas (4,9%),

hemorragias por ferimentos de pele (4,2%), epistaxe (3,1%), hematêmese (2,6%), petéquias (2,6%) e hemorragia por via genital (1,3%) (RIBEIRO & JORGE, 1997).

A coagulação sanguínea foi avaliada e foi detectado prolongamento do tempo de coagulação em 57,9% dos pacientes, onde 46,7% apresentaram incoagulabilidade sanguínea. Os pacientes foram tratados com o soro antivenenoso poliespecífico (Instituto Butantan). Dentre os pacientes tratados, 0,7% desenvolveram insuficiência renal aguda e tiveram de se submeter à diálise, 0,7% tiveram o membro atingido amputado e 0,3% dos pacientes faleceram mesmo após tratamento. A letalidade, no Brasil, por picada do gênero *Bothrops* é de aproximadamente 0,5% dos casos tratados (RIBEIRO & JORGE, 1997).

Uma avaliação hematológica de pacientes picados por *B. jararaca* mostrou diminuição tempo dependente no número de hemácias, no hematócrito e na hemoglobina, tanto nos casos mais severos quanto nos menos severos, assim como nos casos onde ocorreu sangramento e nos que não ocorreu. A contagem de plaquetas teve uma queda abrupta nas primeiras horas, que foi revertida pela administração do antiveneno (SANTORO *et al.*, 2008).

Os leucócitos totais aumentaram nas primeiras horas, principalmente nos casos mais severos. A contagem diferencial revelou aumento nos neutrófilos, nos segmentados e nas células jovens, enquanto os eosinófilos diminuíram nas primeiras 6 horas. Basófilos e monócitos não tiveram alterações significativas (SANTORO *et al.*, 2008).

Esses achados indicaram que a trombocitopenia na admissão dos pacientes é associada com o desenvolvimento de sangramentos sistêmicos e da severidade do envenenamento. Além disso, trombocitopenia pode ser um fator agravante para o desenvolvimento de complicações locais, principalmente com necrose (SANTORO *et al.*, 2008).

Em pacientes picados por *B. jararacussu*, alguns parâmetros bioquímicos marcadores de função renal tiveram suas concentrações elevadas no plasma (creatinina, uréia). As enzimas creatinquinase e lactato desidrogenase tiveram suas

concentrações aumentadas, indicando dano muscular e/ou cardíaco, corroborado pelo aumento na concentração de uréia, anteriormente citado (MILANI *et al.*, 1997).

Insuficiência renal aguda é a complicação mais severa do tratamento convencional do envenenamento por *B. jararacussu* e por outras espécies de *Bothrops*. Necrose tubular aguda, necrose cortical bilateral a glomerulonefrite difusa com proliferação mesangial foram confirmadas histologicamente. Necrose cortical pode ocorrer devido à coagulação intravascular, dano direto pelas toxinas ao endotélio vascular e/ou por vasoespasma (MILANI *et al.*, 1997).

A presença de trombina em pequenas artérias, arteríolas e capilares glomerulares, sugerem que a coagulação intravascular induzida por enzimas prócoagulantes do veneno de *B. jararacussu* pode causar isquemia e necrose cortical renal por oclusão vascular (MILANI *et al.*, 1997).

Dados experimentais mostraram alterações histológicas no fígado induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* como alta concentração perivascular leucocitária e coagulação intravascular. Concentração sérica de AST (aspartado aminotransferase) aumentou significativamente indicando dano hepático, como observado em casos de hepatite, outra doença associada com necrose após administração de algumas classes de medicamentos ou após infarto do miocárdio, doenças do músculo esquelético, pancreatite aguda, doença hemolítica, entre outras (ZENI *et al.*, 2007).

Os níveis de ALT (alanina aminotransferase) também aumentaram, mas não significativamente. O fato que a concentração AST aumentou mais que a de ALT indica não só destruição celular, mas também destruição mitocondrial. Estes achados foram similares a achados anteriores induzidos por outros venenos, como *Bothrops asper* e *Bothrops alternatus* (ZENI *et al.*, 2007).

Em vista das alterações relacionadas com os acidentes ofídicos, e das complicações do tratamento soroterápico convencional (principalmente em relação aos efeitos locais), o estudo de pterocarpanos prenilados é uma boa alternativa para obtenção de novas substâncias antiveneno, que atuem nos danos locais, obtendo a

neutralização não alcançada pela soroterapia tradicional. Os dados etnofarmacológicos embasam empiricamente as pesquisas com os pterocarpanos e com as plantas que os contêm.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações bioquímicas, hematológicas e pressóricas induzidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos, e seu possível bloqueio pela cabenegrina A-II.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer os padrões das alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* pelas vias subcutânea, intraperitoneal e intramuscular em ratos, nos tempos de 6, 24 e 48 horas;
- ✓ Avaliar os efeitos induzidos pela cabenegrina A-II préincubada com o veneno de *B. jararacussu* nas alterações bioquímicas e hematológicas, nos tempos de 6, 24 e 48 horas;
- ✓ Estudar as alterações na pressão arterial média e na frequência cardíaca promovidas pelo veneno de *B. jararacussu* em ratos anestesiados;
- ✓ Observar o efeito da cabenegrina A-II préincubada com o veneno de *B. jararacussu* na pressão arterial média e na frequência cardíaca de ratos anestesiados.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados ratos *Wistar* machos entre 8 e 12 semanas de nascidos, aclimatados no local por 4 semanas. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas com água *ad libitum* para a realização dos experimentos.

4.2 Veneno e Substâncias

O veneno de *Bothrops jararacussu* foi obtido no Instituto Butantan. O veneno liofilizado foi mantido a -20 °C até o momento da utilização.

A cabenegrina A-II foi isolada do extrato etanólico das raízes de *Harpalyce brasiliiana* Benth. e fornecida pelo professor Dr. Edilberto R. Silveira do Departamento de Química Orgânica da UFC.

4.3 Envenenamento experimental por *B. jararacussu*

4.3.1 Procedimento experimental

Os animais foram divididos em grupos de oito, recebendo no tempo zero a administração de 0,1 mL de solução de NaCl 0,9%, contendo ou não o veneno bruto de *B. jararacussu*. O jejum de alimentos dos animais foi mantido durante as primeiras seis horas do experimento, momento em que foram anestesiados levemente com éter dietílico para coleta de 1 mL de sangue pelo plexo retro-orbital

em microtubos contendo 20 µL de heparina 500 UI e 15 µL de soro antibotrópico (para que o veneno não continuasse agindo nas amostras) (Instituto Butantan, Lote: 0612218/B). Para a realização das duas coletas de sangue subsequentes, os animais foram deixados em jejum por 12 horas antes da realização das mesmas. Ao término da coleta no tempo de 48 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.3.2 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com as vias de administração e doses do veneno.

- ❖ Grupo Controle – Os animais receberam solução de NaCl 0,9 % por via intraperitoneal.
- ❖ Grupo IM1 – Os animais receberam 1 mg.kg⁻¹ de veneno de *B. jararacussu*, dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9 %, por via intramuscular.
- ❖ Grupo IM3 – Os animais receberam 3 mg.kg⁻¹ de veneno de *B. jararacussu*, dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9 %, por via intramuscular.
- ❖ Grupo IP1 – Os animais receberam 1 mg.kg⁻¹ de veneno de *B. jararacussu*, dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9 %, por via intraperitoneal.
- ❖ Grupo IP3 – Os animais receberam 3 mg.kg⁻¹ de veneno de *B. jararacussu*, dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9 %, por via intraperitoneal.

- ❖ Grupo SC1 – Os animais receberam 1 mg.kg^{-1} de veneno de *B. jararacussu*, dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9 %, por via subcutânea.

- ❖ Grupo SC3 – Os animais receberam 3 mg.kg^{-1} de veneno de *B. jararacussu*, dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9 %, por via subcutânea.

4.3.3 Determinações bioquímicas

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC, sob orientação da professora Dra. Maria Goretti R. de Queiroz. Para as determinações bioquímicas foram utilizados kits comerciais, produzidos pela *LabTest*.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 r.p.m. por 15 minutos para separação do plasma. As alíquotas de plasma foram transferidas para microtubos e congeladas a -20°C até o momento das dosagens. Foram analisados parâmetros indicativos de função hepática (transaminase oxalacética e transaminase pirúvica), de função renal (creatinina, uréia e ácido úrico), de injúria muscular (creatinoquinase), além de dosagem de glicose.

4.3.4 Determinações hematológicas

As análises hematológicas foram realizadas em aparelho Sysmex-Roche, modelo KX-21N. Foram analisados o número total de leucócitos, hemácias e plaquetas, hematócrito, hemoglobina e o RDW (Red cell Distribution Width). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sob microscópio

óptico, onde foram analisados os valores absolutos e relativos de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, além da descrição da morfologia das hemácias.

4.4 Efeitos da cabenegrina A-II em ratos envenenados experimentalmente

4.4.1 Procedimento experimental

Os animais foram divididos em grupos de oito, recebendo no tempo zero a administração de 3 mg.kg^{-1} do veneno de *B. jararacussu* dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de *polissorbato 80*, contendo ou não a cabenegrina A-II. O jejum de alimentos dos animais foi mantido durante as primeiras seis horas do experimento, momento em que foram anestesiados levemente com éter dietílico para coleta de sangue pelo plexo retro-orbital em microtubos contendo 20 μL de heparina 500 UI e 15 μL de soro antibotrópico (Instituto Butantan, Lote: 0612218/B). Para a realização das duas coletas de sangue subsequentes, os animais foram deixados em jejum por 12 horas antes da realização das mesmas. Ao término da coleta no tempo de 48 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Para os experimentos envolvendo o veneno de *B. jararacussu* e a cabenegrina A-II, as duas soluções foram pré-incubadas por 15 minutos a temperatura de 37°C .

4.4.2 Ensaios experimentais

Foram realizados dois grupos experimentais. Os dois grupos receberam 3 mg.kg^{-1} de veneno de *B. jararacussu* por via intramuscular, conforme listado abaixo:

- ❖ Grupo VBj – Os animais receberam 3 mg.kg^{-1} de veneno de *B. jararacussu*, dissolvido em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9 %, contendo 1% de *polissorbato 80*, por via intramuscular.
- ❖ Grupo VBj + CA-II – Os animais receberam 3 mg.kg^{-1} de veneno de *B. jararacussu* e 1 mg.kg^{-1} de cabenegrina A-II, dissolvidos em 0,1 mL solução de NaCl 0,9 %, contendo 1 % de *polissorbato 80*, e préincubados por 15 minutos a 37°C , por via intramuscular.

4.4.3 Determinações bioquímicas

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 r.p.m. por 15 minutos para separação do plasma. As alíquotas de plasma foram transferidas para microtubos e congeladas a -20°C até o momento das dosagens. Foram analisados os parâmetros que foram alterados em relação ao grupo controle no experimento anterior de envenenamento experimental por *B. jararacussu*.

Foram dosados os parâmetros indicativos de função hepática (transaminase oxalacética e transaminase pirúvica), de função renal (creatinina, uréia e ácido úrico), de injúria muscular (creatinoquinase), e glicose.

4.4.4 Determinações hematológicas

Todas as análises hematológicas descritas no item 4.3.4 foram realizadas para estes dois grupos experimentais. Com exceção da contagem diferencial de leucócitos, que por não apresentar resultados significativos nos grupos anteriores não foi realizada.

4.5 Efeitos na pressão arterial média de ratos anestesiados

4.5.1 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg.kg^{-1} , i.p.) e mantidos em decúbito dorsal. A traquéia foi isolada e uma curta cânula de polietileno (PE120) foi inserida nos animais por meio de traqueostomia, permitindo um fluxo respiratório espontâneo e a fácil aspiração de eventuais secreções brônquicas.

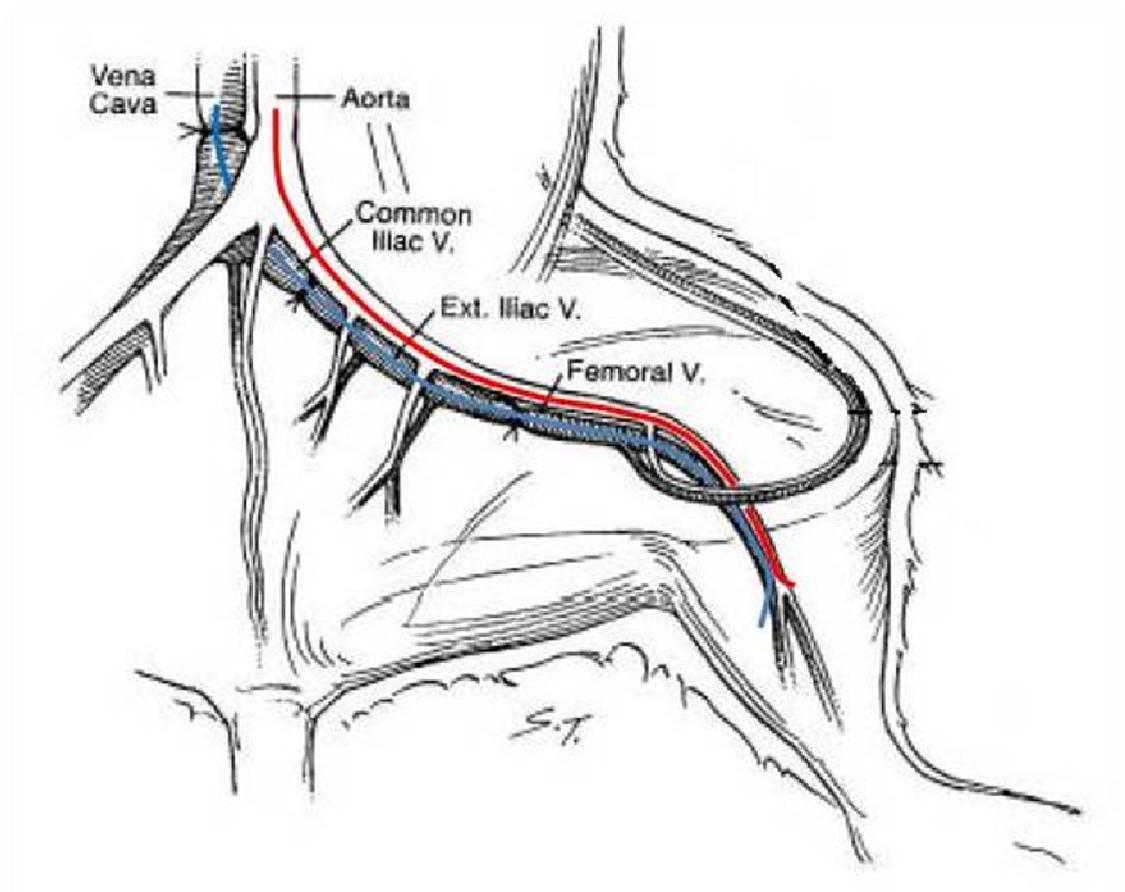


Figura 7. Localização anatômica da artéria e veia femoral e posicionamento dos cateteres arterial (vermelho) e venoso (azul).

Após a traqueostomia, dois cateteres de polietileno (PE10 conectado a PE50) pré-enchidos com heparina (500 UI.mL^{-1} em salina isotônica) foram implantados na aorta abdominal (para registro da P.A.M. e F.C.) e na veia cava inferior (para administração de drogas), ambos 1 cm abaixo da artéria renal, conforme técnica descrita previamente (Lahlou *et al.*, 1999 apud SIQUEIRA, 2005).

4.5.2 Sistema de aquisição de dados

No momento do experimento, o cateter aórtico foi acoplado a um transdutor de pressão piezo-elétrico (Braile BXSJ) acoplado ao sistema de amplificação de sinal com interface USB (DATAQ DI-148U) e utilizando o software de aquisição de dados WinDaq/Lite. A P.A.M. e a F.C. foram diretamente calculadas pelo software.

4.5.3 Procedimento experimental

A administração intravenosa do veneno de *B. jararacussu* (com ou sem cabenegrina A-II) foi sempre efetuada após um período de estabilização da P.A.M. e da F.C. Tais parâmetros foram registrados por períodos de 5 a 10 minutos, de acordo com a duração dos efeitos. Quando foram administradas injeções subsequentes do veneno os valores da P.A.M. foram acompanhados até que retornassem aos seus respectivos níveis de controle (SIQUEIRA, 2005). As doses do veneno e da cabenegrina A-II foram escolhidas baseadas na literatura e em experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa.

Ao término dos experimentos os animais foram sacrificados por overdose de tiopental sódico por via intravenosa.

4.5.4 Grupos experimentais

❖ Relação dose-efeito

Para estabelecer a relação dose-efeito, os animais receberam doses crescentes, em bolus, do veneno de *B. jararacussu* (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). O curso temporal das variações de P.A.M. e F.C. foi registrado após a administração.

❖ Antagonismo pela cabenegrina A-II

Nesta série experimental foram realizados dois grupos: (1) recebeu o veneno diretamente na dose de 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e o curso temporal das variações da P.A.M. foi registrado; (2) recebeu 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ do veneno préincubado com a mesma massa da cabenegrina A-II, por 15 minutos a 37°C e o curso temporal das variações da P.A.M. foi registrado para avaliar o potencial efeito do antagonista.

4.6 *Análise estatística*

Os resultados foram expressos utilizando média \pm erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA (análise de variância), com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de *Student*, considerando significantes resultados onde $*p < 0,05$, com 95% de confiança.

4.7 *Aspectos éticos*

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará, sob o número de protocolo 86/08.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Envenenamento experimental por *B. jararacussu*

5.1.1 Grupo intramuscular

Os animais envenenados com o veneno de *B. jararacussu* por via intramuscular foram divididos em dois grupos, os que receberam 1 mg.kg^{-1} e os que receberam 3 mg.kg^{-1} do veneno bruto.

Em relação aos parâmetros bioquímicos analisados nos tempo de 6, 24 e 48 horas, a glicose apresentou aumento significativo nos dois grupos, observado nos tempos de 24 e 48 horas (Figura 8).

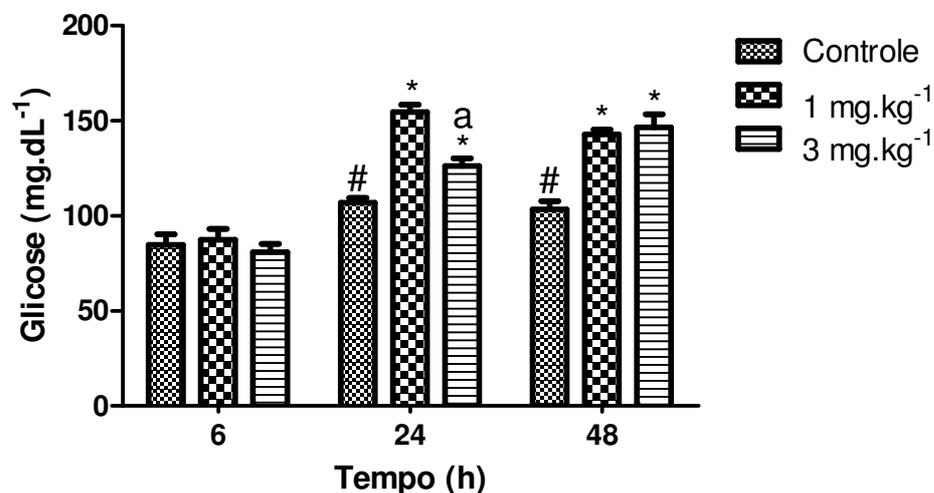


Figura 8. Alterações na glicose induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg^{-1} , i.m. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg^{-1} , no mesmo tempo.

Os valores de AST aumentaram em ambos os grupos nos tempos de 6 e 24 horas, aparentemente em relação dose-dependente. Em relação à ALT, foi observado aumento no grupo IM3 no tempo de 6 horas e no grupo IM1 no tempo de 24 horas. Estes resultados estão ilustrados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

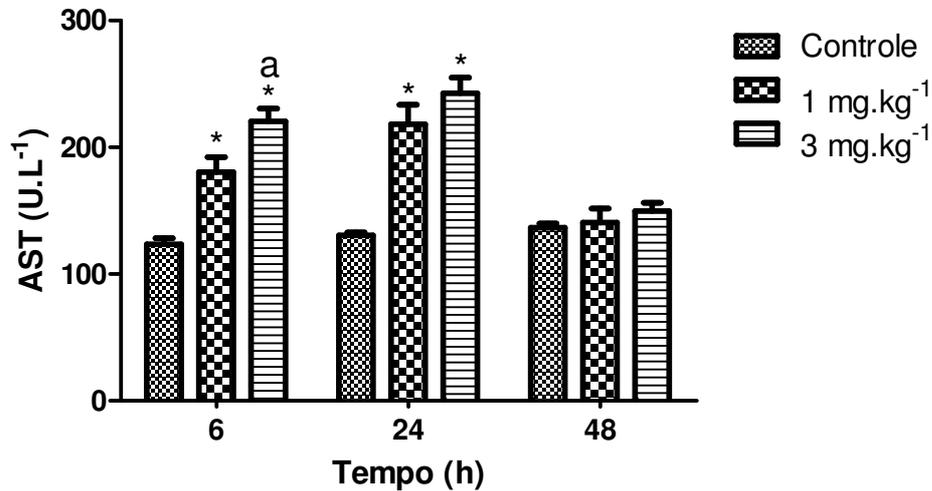


Figura 9. Alterações na AST induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

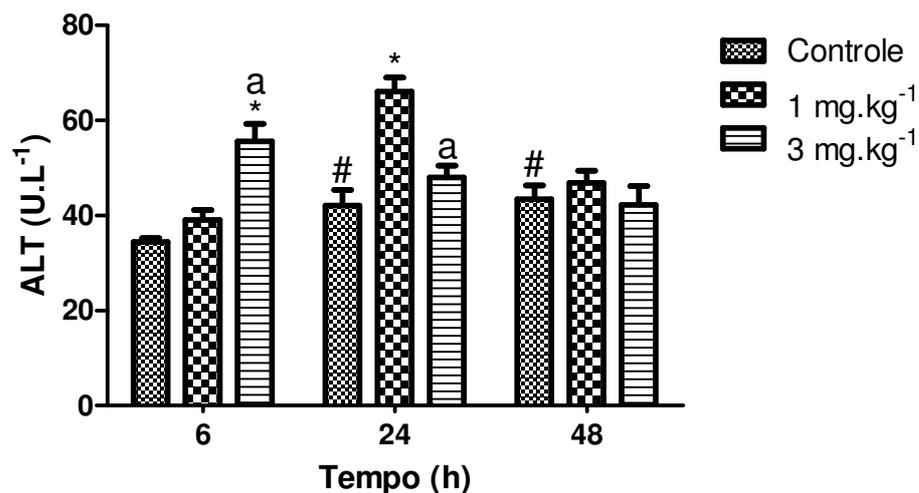


Figura 10. Alterações na ALT induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

Nos parâmetros indicativos do metabolismo proteico e de função renal, a concentração sanguínea de uréia aumentou no tempo de 6 e 48 horas, nas duas doses de veneno (Figura 11). Já os valores de creatinina aumentaram, em ambas as doses, nos tempos iniciais (6 e 24h), como evidenciado na Figura 12.

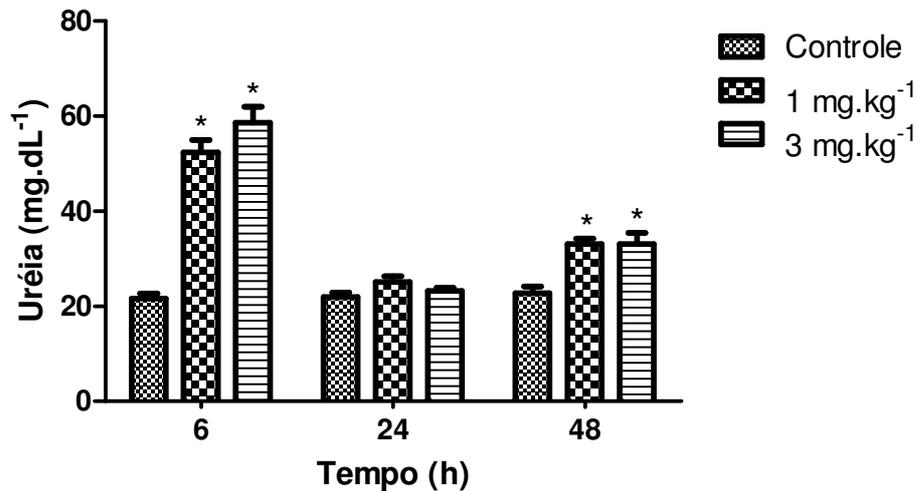


Figura 11. Alterações na concentração sanguínea de uréia induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

Os níveis séricos de ácido úrico, indicativos do metabolismo de ácidos nucleicos e função renal, aumentaram com a mesma amplitude, independente da dose do veneno de *B. jararacussu*, nos tempos de 24 e 48 horas. Resultados ilustrados na Figura 13.

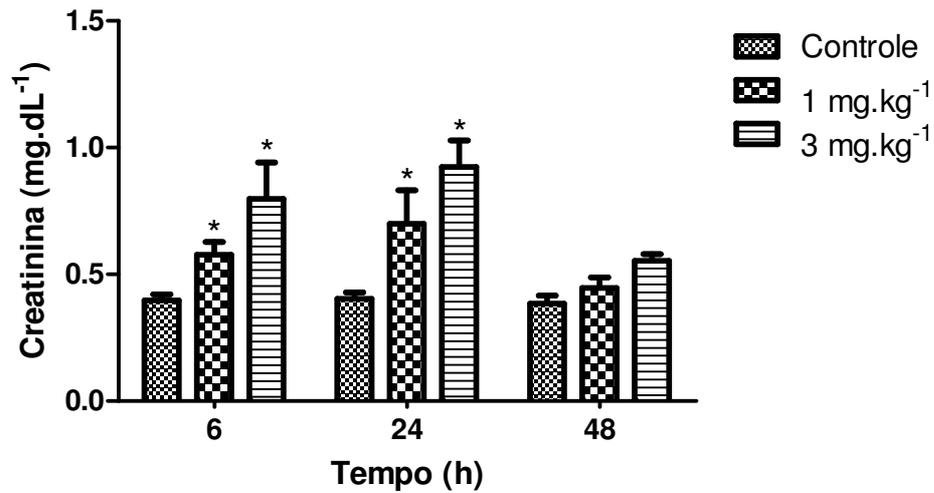


Figura 12. Alterações na creatinina sérica induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

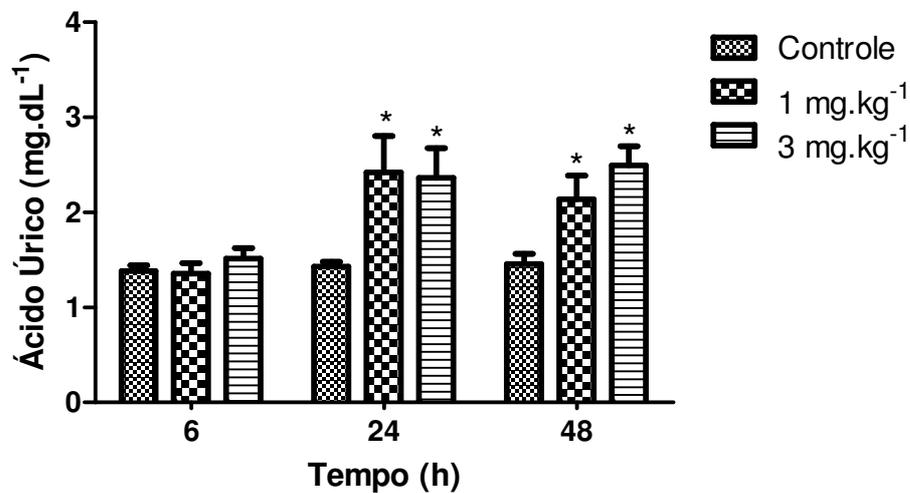


Figura 13. Alterações nos níveis de ácido úrico induzidos pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

Foi observado aumento na concentração de creatinoquinase circulante significativo e de maneira dependente da dose apenas no tempo de 6 horas (Figura 14). Nos tempos posteriores foi observada apenas uma perda, não significativa, da uniformidade dos dados obtidos (aumento no erro padrão). Valores descritos na Tabela 8, no Apêndice.

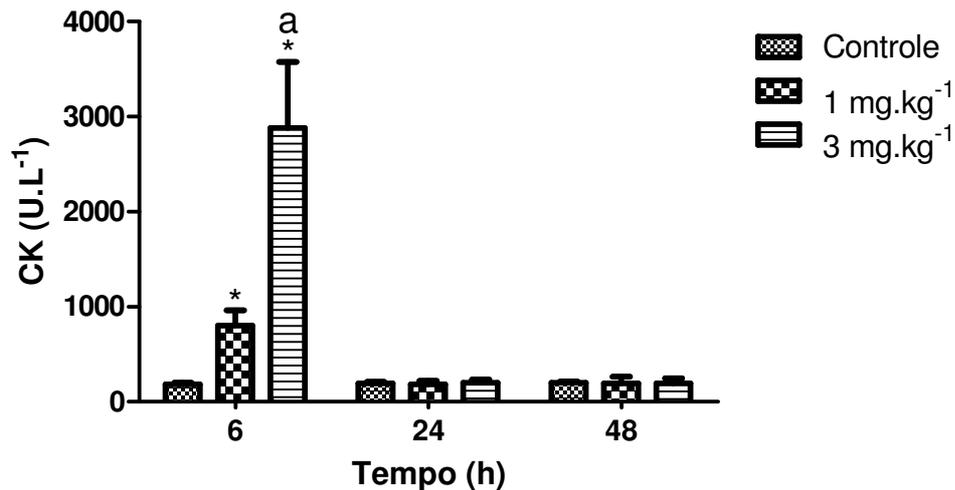


Figura 14. Alterações na concentração sanguínea de CK induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e \bar{a} = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

As análises hematológicas revelaram uma diminuição na contagem de leucócitos com 6 e 24 horas do início do experimento, valores que foram re-estabelecidos em 48 horas. Esta diminuição foi dependente da dose de veneno empregada conforme evidenciado na Figura 15.

A contagem de eritrócitos, a dosagem de hemoglobina e os valores de hematócrito, por serem parâmetros intimamente relacionados, se comportaram de maneira semelhante, nas duas doses e nos três tempos, aumentando significativamente no tempo de 6 horas e, diminuindo no tempo de 24 horas na maior dose. Somente o hematócrito diminuiu significativamente no tempo de 48 horas. Hemácias, hemoglobina e hematócrito estão descritos nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente.

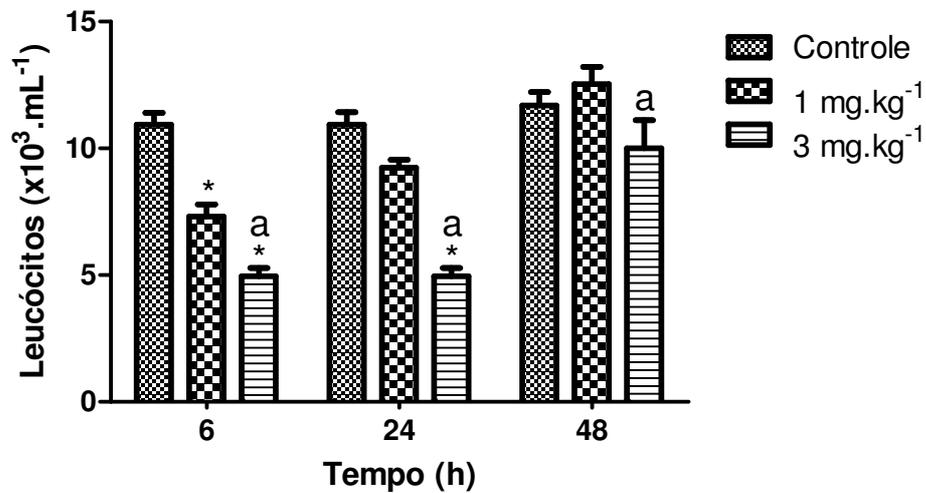


Figura 15. Alterações na contagem de leucócitos induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e *a* = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

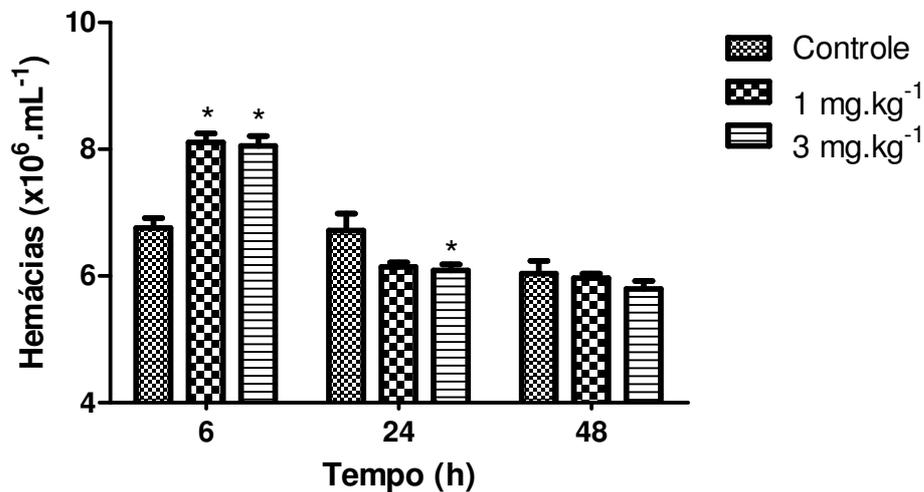


Figura 16. Alterações no número de hemácias induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

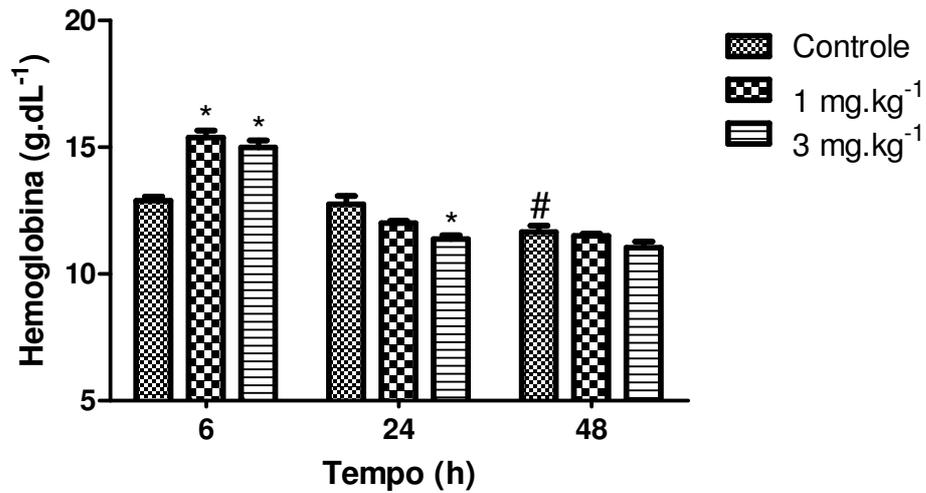


Figura 17. Alterações na concentração de hemoglobina induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

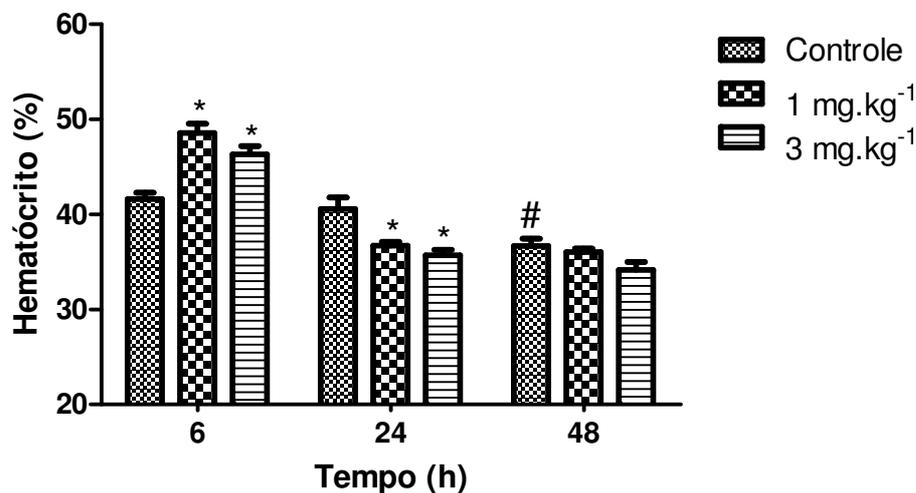


Figura 18. Alterações nos valores de hematócrito induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

A contagem de plaquetas foi um parâmetro bastante alterado na dose de 3 mg.kg⁻¹ de veneno, com significativa redução dos valores tanto em relação ao controle quanto a dose de 1 mg.kg⁻¹, como mostrado na Figura 19.

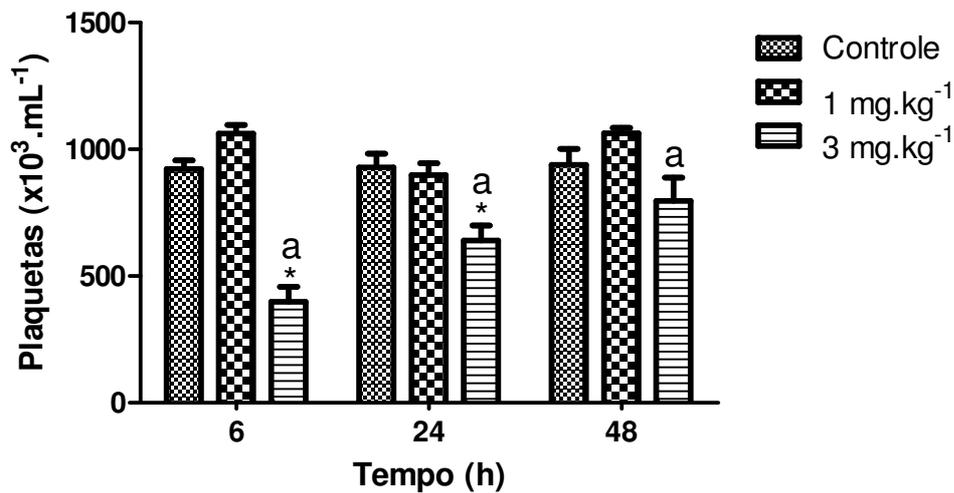


Figura 19. Alterações na contagem de plaquetas induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.m. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com *p* < 0,05. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e *a* = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

Os valores percentuais de RDW (Red cell Distribution Width, em tradução literal: “Distribuição da largura das células vermelhas”) não foram alterados nas duas doses testadas em nenhum dos tempos, revelando ausência de anisocitose. Valores descritos na Tabela 14 no Apêndice.

As dosagens de eletrólitos não apresentaram mudanças significativas, assim como a contagem diferencial dos leucócitos, que mostraram uma tendência ao aumento do número de linfócitos nos últimos tempos, mas sem apresentarem relevância estatística, por isso, esses valores não foram listados. A morfologia dos eritrócitos também não apresentou alterações.

5.1.2 Grupo intraperitoneal

Dentre os parâmetros bioquímicos analisados nos animais que receberam as duas doses do veneno de *B. jararacussu* pela via intraperitoneal, a glicemia teve aumento significativo na dose de 1 mg.kg⁻¹ no tempo seis horas e na dose de 3 mg.kg⁻¹ no tempo de 48 horas (Figura 20, Tabela 2 – Apêndice).

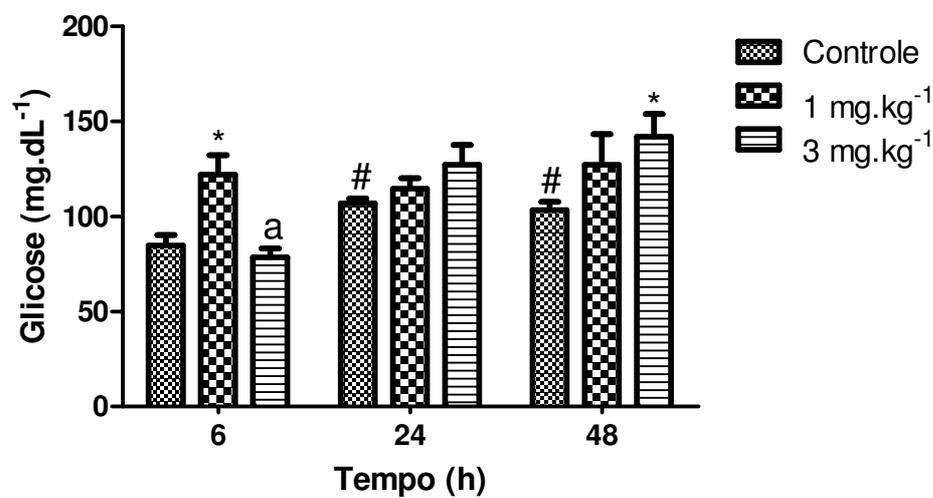


Figura 20. Alterações na glicemia induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e ^a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

As dosagens de AST e ALT aumentaram de forma semelhante no tempo de 6 horas, nas duas doses testadas. Contudo, ALT se manteve aumentada no tempo de 24 horas na dose de 3 mg.kg⁻¹ (Figuras 21 e 22, Tabelas 3 e 4 – Apêndice).

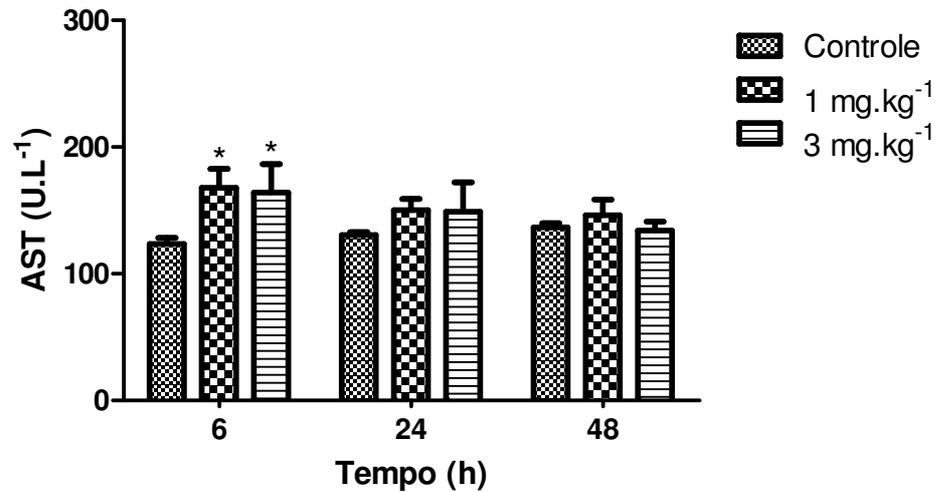


Figura 21. Alterações na AST induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

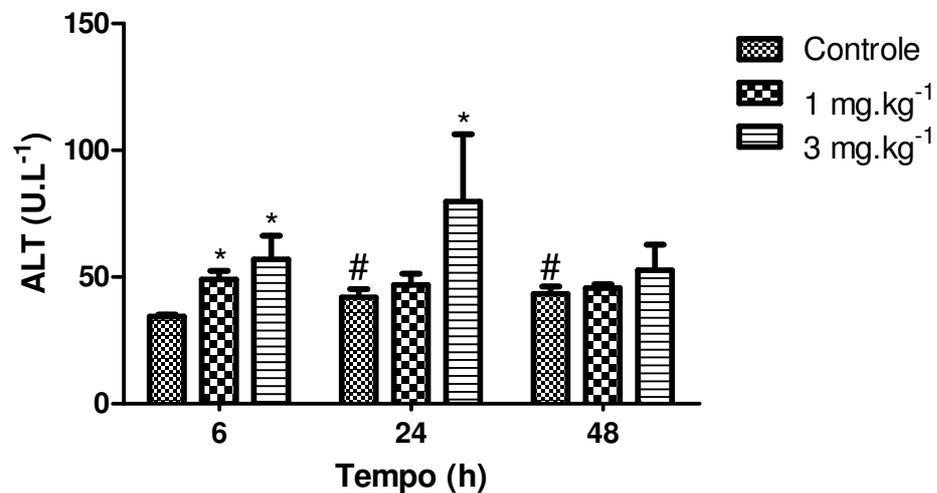


Figura 22. Alterações na ALT induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

As dosagens de uréia sérica aumentaram significativamente nas duas doses, nos três tempos, com tendência a dose-dependência, e significativa no tempo de 6 horas. Valores ilustrados na Figura 23 e listados na Tabela 5 do Apêndice. A concentração de creatinina aumentou nos dois primeiros tempos, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹ (Figura 24 e Tabela 6).

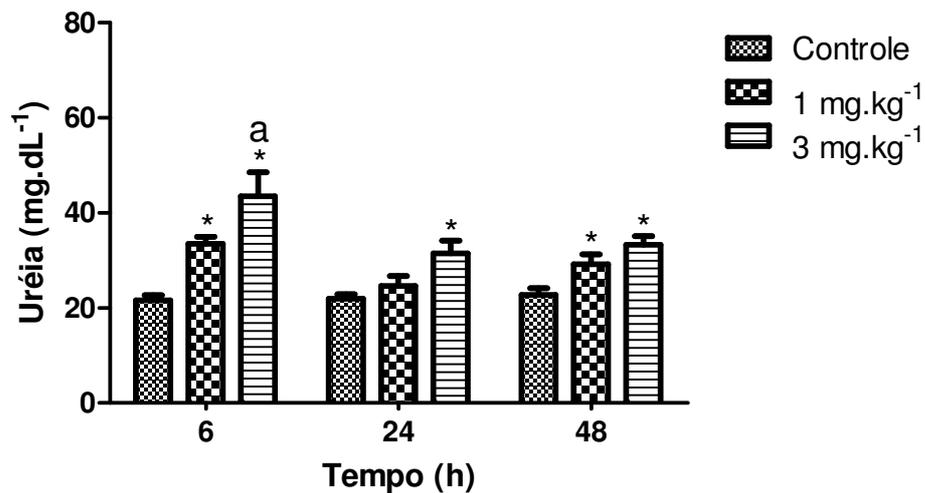


Figura 23. Alterações na uréia sérica induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

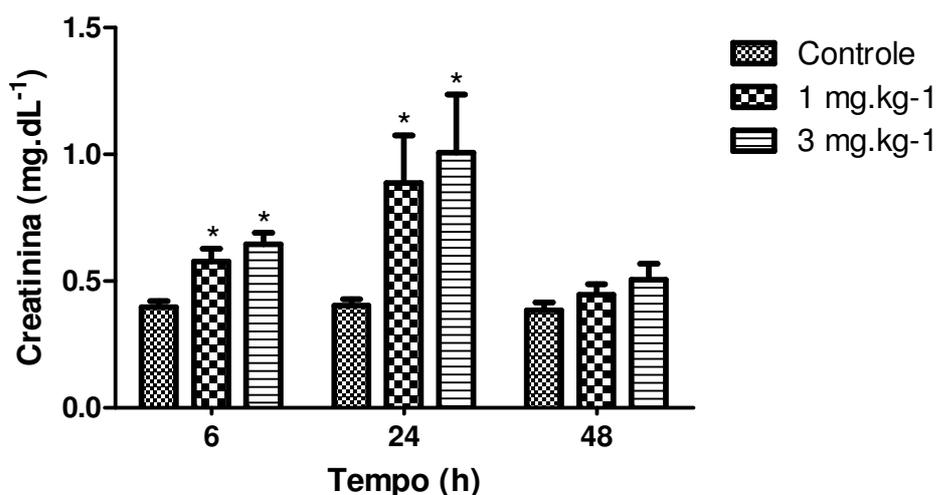


Figura 24. Alterações na creatinina induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

Ácido úrico teve seus valores aumentados em relação ao controle nos tempos 6 e 24 horas e somente na maior dose de veneno (Figura 25, Tabela 7). Já a concentração sanguínea de creatinoquinase aumente no tempo de 6 nas duas doses e de forma dose-dependente, conforme ilustrado na Figura 26 e relacionados na Tabela 8.

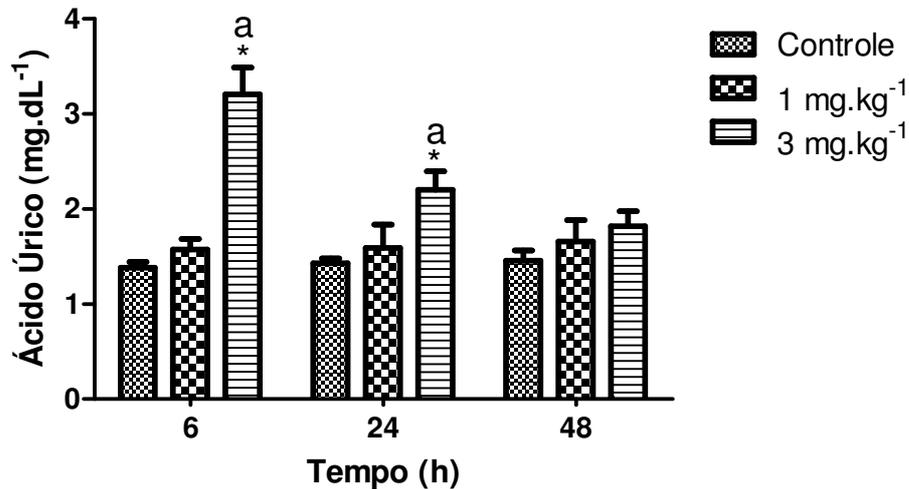


Figura 25. Alterações no ácido úrico induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e **a** = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

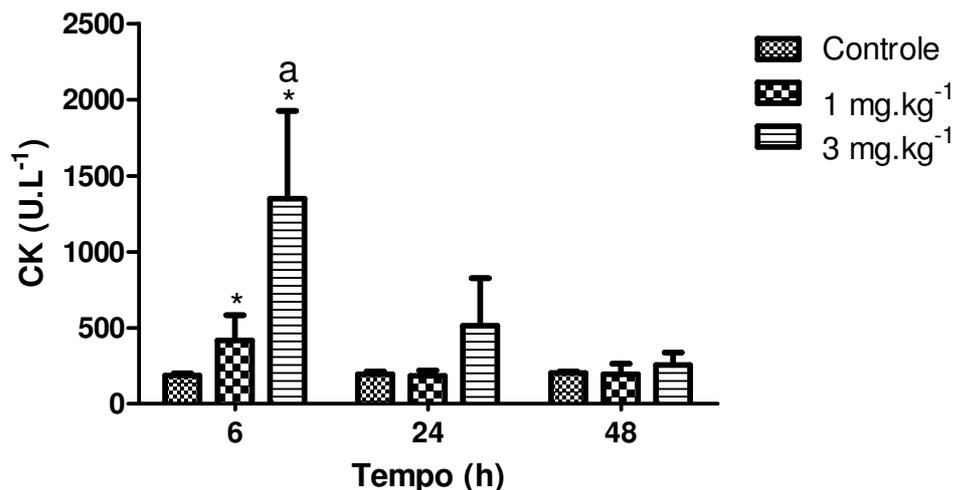


Figura 26. Alterações na CK sérica induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e **a** = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

As análises hematológicas revelaram uma diminuição do número de leucócitos nas duas doses de veneno no tempo de 6 horas (Figura 27, Tabela 9). A contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e os percentuais de hematócrito tiveram comportamento semelhante, por serem funções interdependentes, apresentando reduções significativas para ambos os grupos tratados nos tempo de 24 e 48 horas, conforme mostrado nas Figuras 28, 29 e 30, respectivamente (Tabelas 10, 11 e 12, do Apêndice).

O número de plaquetas foi o fator mais alterado pela administração intraperitoneal do veneno, com reduções bastante significativas em todos os tempos, independente da dose de veneno administrada. Esta redução foi mais acentuada no tempo de 6 horas. Resultados representados na Figura 31 (Tabela 13). O RDW apresentou aumento estatístico na dose de 1 mg.kg^{-1} no tempo de 48 horas, conforme Figura 32 e Tabela 14 do Apêndice.

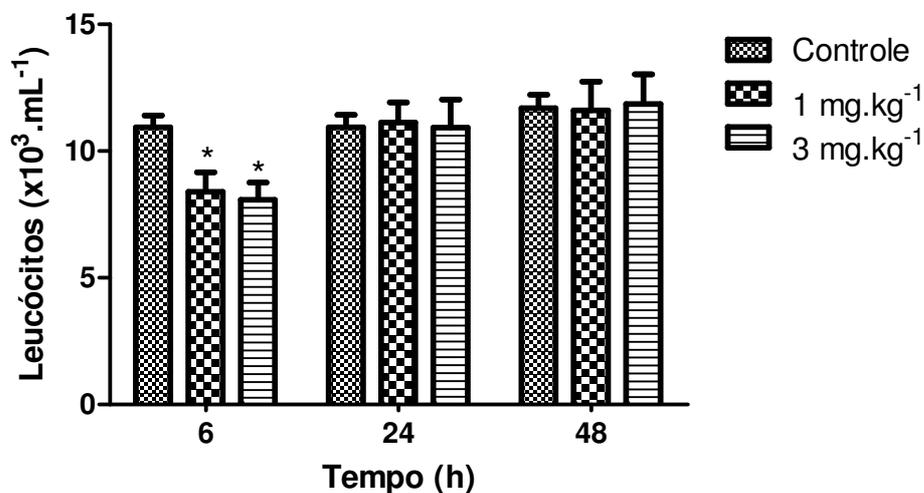


Figura 27. Alterações na contagem de leucócitos induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg^{-1} , i.p. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

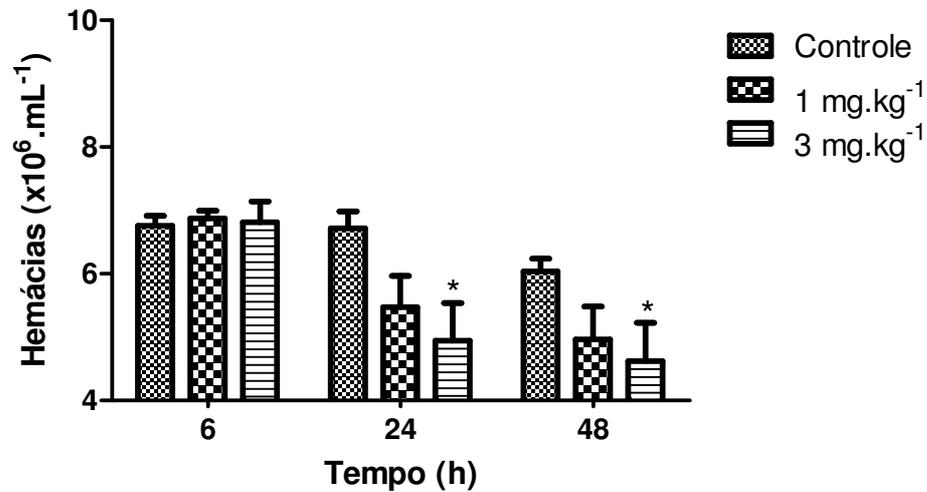


Figura 28. Alterações na contagem de hemácias induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

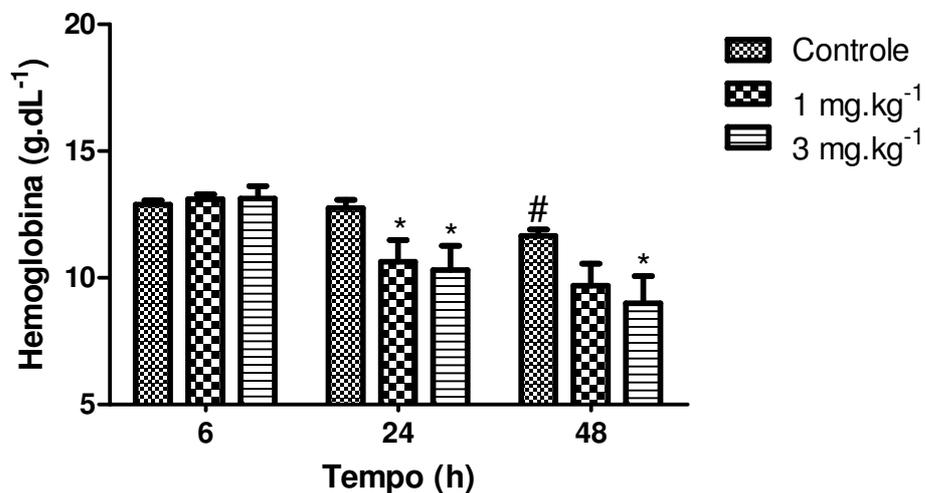


Figura 29. Alterações na hemoglobina induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

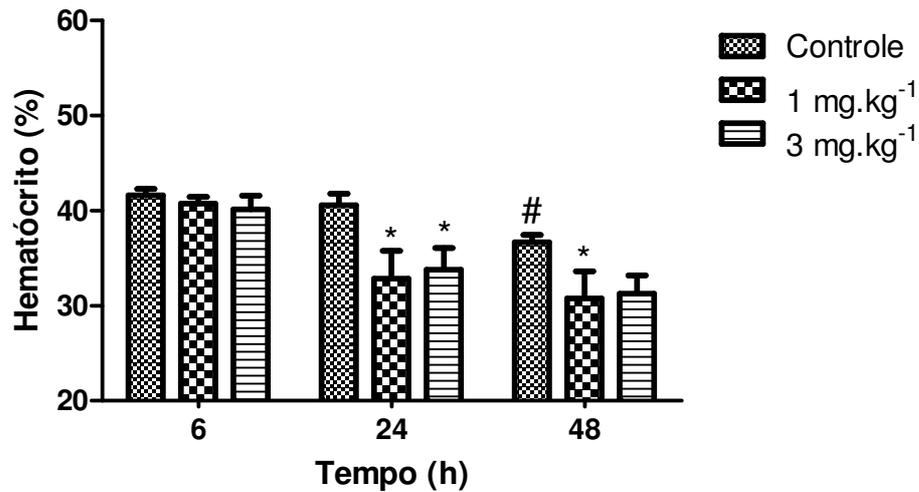


Figura 30. Alterações nos valores de hematócrito induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

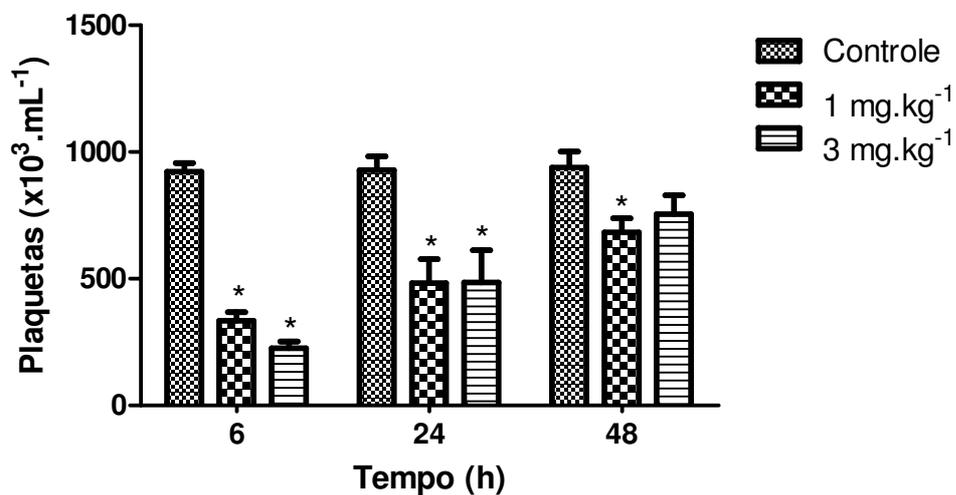


Figura 31. Alterações na contagem de plaquetas induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

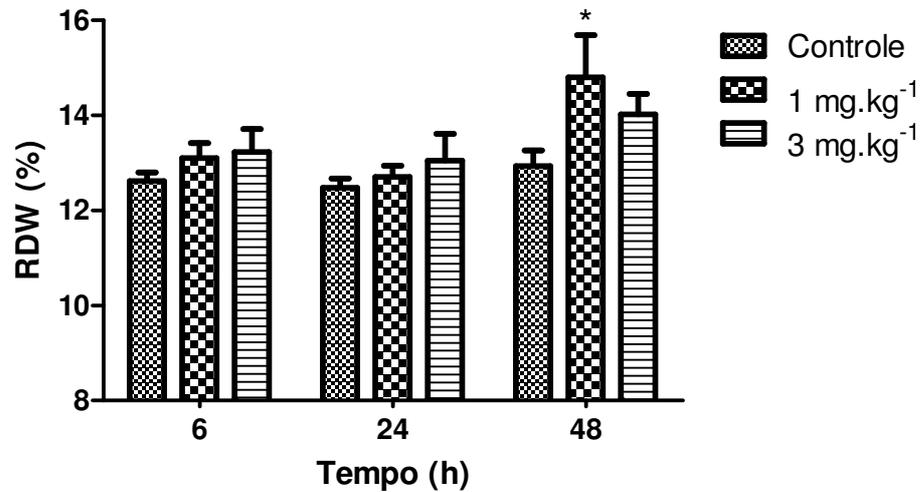


Figura 32. Alterações no RDW induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, i.p. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

As dosagens dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto não apresentaram alterações significativas em nenhum dos tempos nas duas doses testadas. A contagem diferencial de leucócitos também não revelou alterações quantitativas significativas. A morfologia das hemácias foi considerada normal.

5.1.3 Grupo subcutâneo

Os resultados do grupo subcutâneo tiveram amplitude menor quando comparados aos dos grupos intramuscular e intraperitoneal. Dentre os parâmetros bioquímicos, a concentração de glicose sanguínea apresentou aumento, nas duas doses testadas, em 48 horas (Figura 33, Tabela 2 do Apêndice).

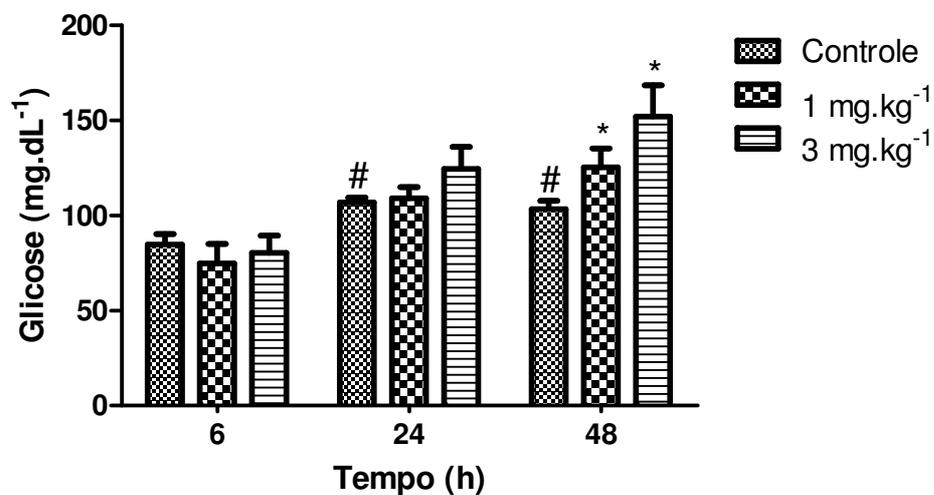


Figura 33. Alterações na glicemia induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

Aspartato aminotransferase apresentou discreto aumento, porém significativo, no grupo tratado com a maior dose de veneno no tempo de 6 horas (Tabela 3 do Apêndice). Alanina aminotransferase apresentou aumento, nas duas doses, somente no tempo de 6 horas, conforme Figura 34 e Tabela 4 do Apêndice.

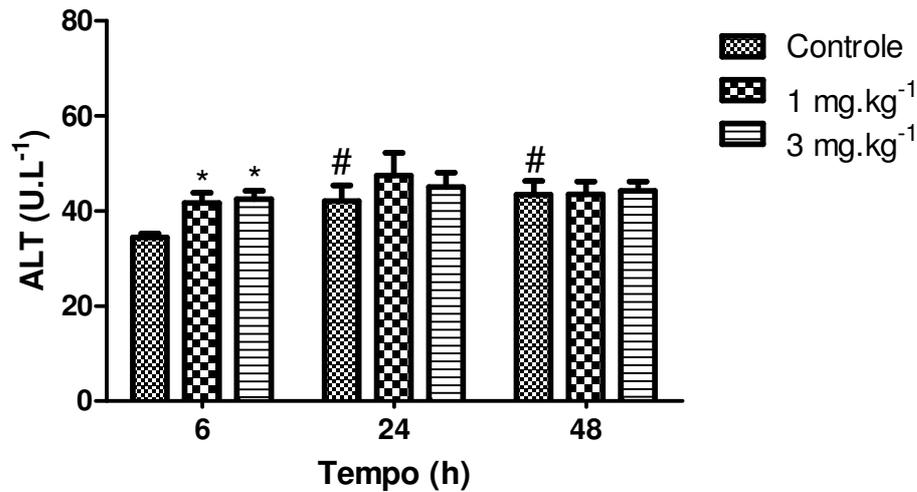


Figura 34. Alterações nos valores de ALT induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

Dentre as substância indicativas da função renal, as concentrações séricas de uréia aumentaram no tempo 6 e 48 horas, em ambas as doses, sendo no tempo 6 horas dependente da dose (Figura 35, Tabela 5 do Apêndice). Valores de creatinina apresentaram aumento em todos os tempos e todas as doses, com exceção da dose de 1 mg.kg⁻¹, que não apresentou aumento no tempo de 48 horas quando comparada ao controle do mesmo tempo. Resultados expressos na Figura 36 e na Tabela 6.

Ácido úrico só apresentou alteração significativa na dose de 1 mg.kg⁻¹ no tempo de 48 horas, aumentando em relação ao controle, conforme Figura 37 (valores na Tabela 7 do Apêndice). A dosagem dos eletrólitos Na⁺, K⁺ e Cl⁻ não apresentaram alterações significativas em nenhuma dose nos três tempos, de forma que os valores não foram relatados, por terem permanecido dentro da normalidade.

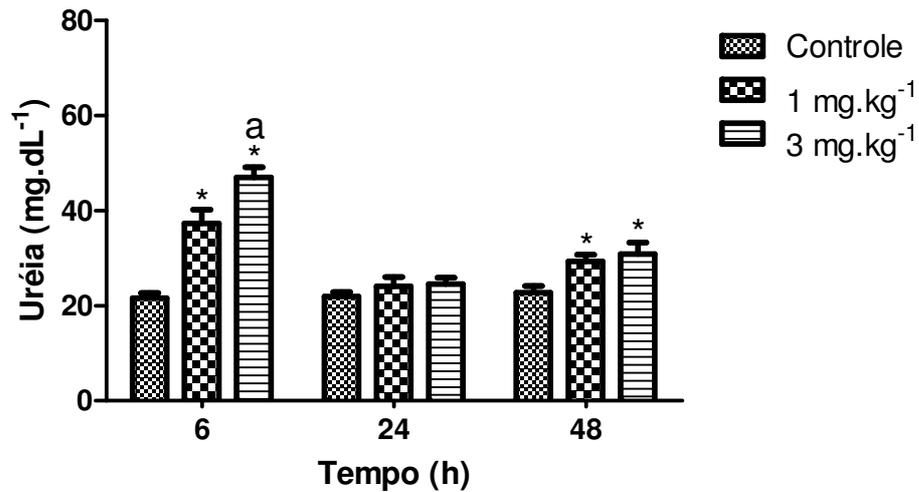


Figura 35. Alterações na uréia sérica induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

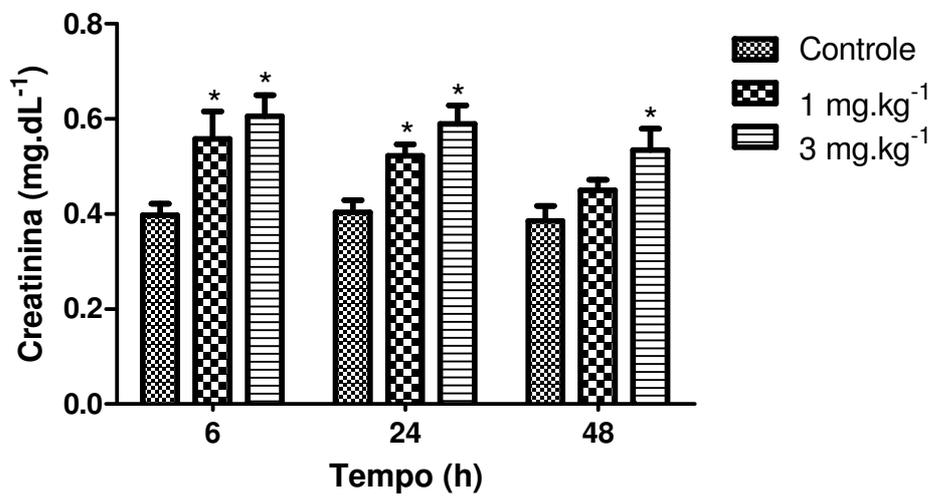


Figura 36. Alterações na creatinina sérica induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

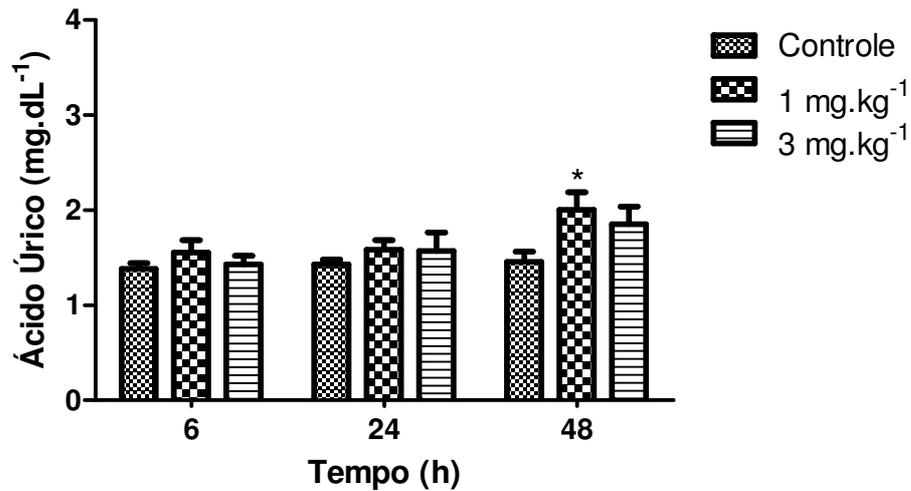


Figura 37. Alterações na concentração sanguínea de ácido úrico induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

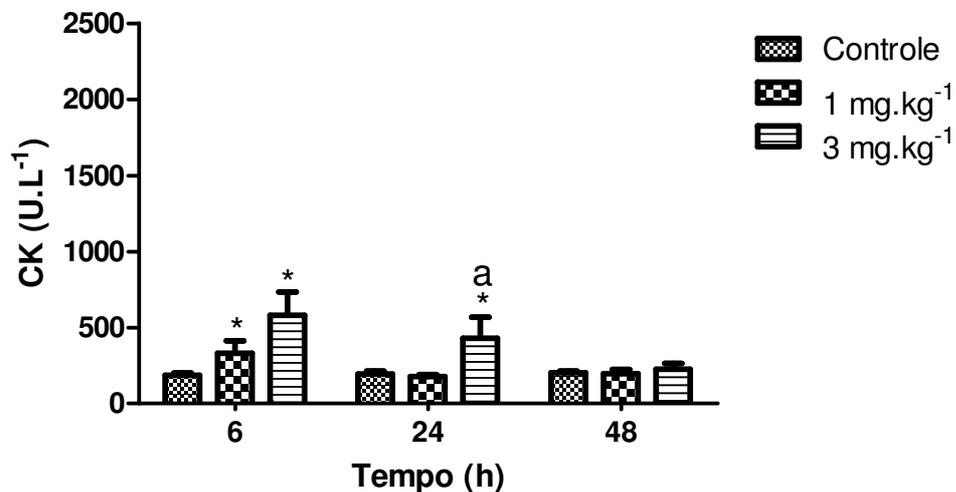


Figura 38. Alterações na CK sérica induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg⁻¹, no mesmo tempo.

A concentração de creatinoquinase aumentou, em menor escala, quando comparada as outras vias de administração do veneno. O aumento foi constatado no tempo de 6 horas nas duas doses, e se manteve na maior dose durante as primeiras 24 horas (Figura 38, acima). Valores relacionados na Tabela 8 do apêndice.

Na avaliação hematológica, a contagem de leucócitos totais mostrou uma diminuição no tempo de 6 horas em ambas as doses, diminuição essa, ainda percebida e estatisticamente significativa, no tempo de 24 horas para a maior dose (Figura 39). O número de hemácias diminuiu significativamente no tempo 24 horas nas duas doses, acompanhando o controle no tempo seguinte. O mesmo aconteceu com o hematócrito, este, porém, manteve a queda no tempo de 48 horas no grupo que recebeu a dose de 3 mg.kg^{-1} do veneno, Figura 40 e 41, respectivamente. Os valores de hemoglobina não apresentaram mudanças quando comparados ao controle.

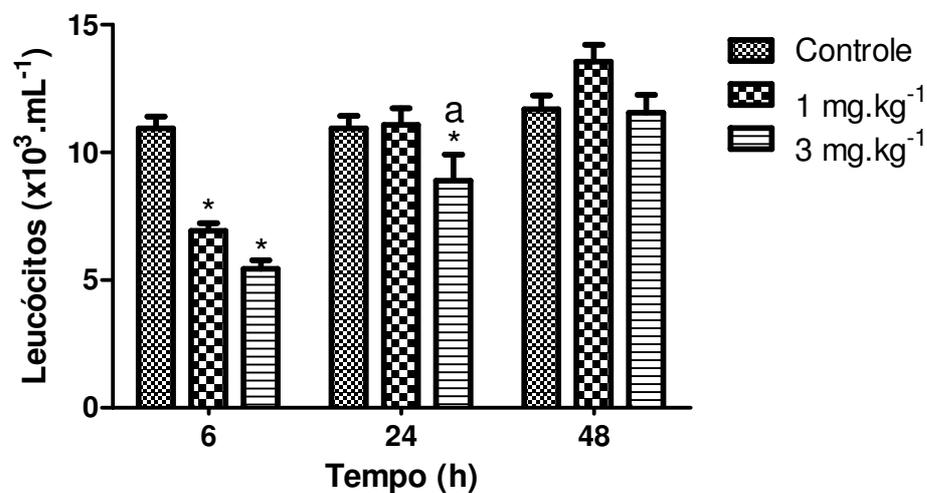


Figura 39. Alterações no número total de leucócitos induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg^{-1} , s.c. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos 1 e 3 mg.kg^{-1} , no mesmo tempo.

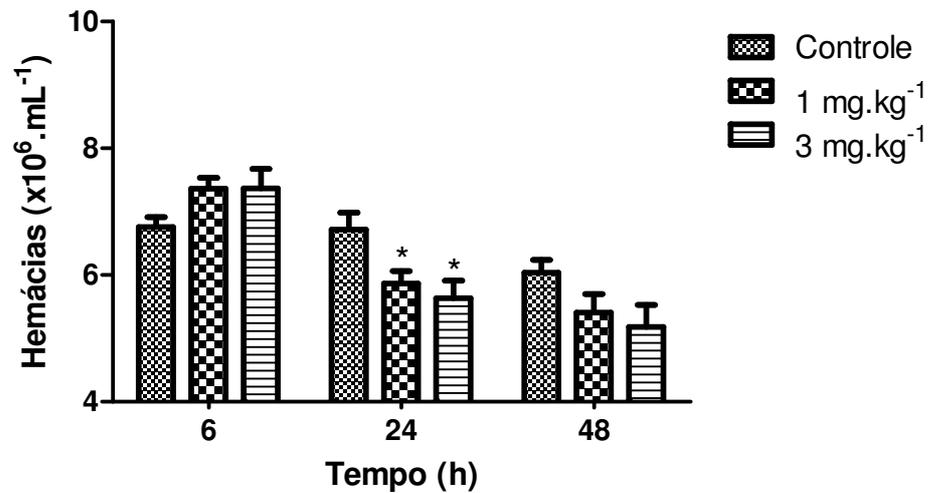


Figura 40. Alterações na quantidade de hemácias induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

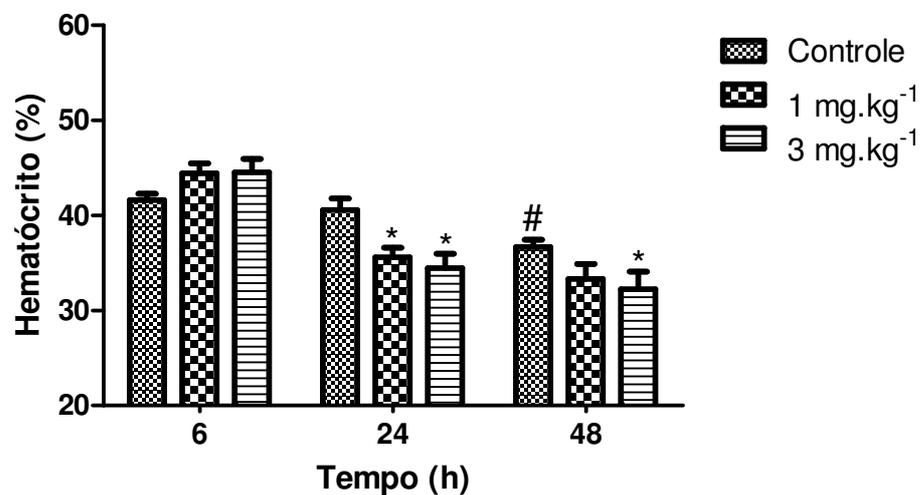


Figura 41. Alterações nos valores de hematócrito induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

As plaquetas tiveram alterações discretas que se mostraram significativas apenas na maior dose e no tempo de 6 horas (Figura 42, Tabela 13 do Apêndice). A contagem diferencial de leucócitos não revelou mudanças significativas, indicando apenas um aumento discreto no percentual de linfócitos.

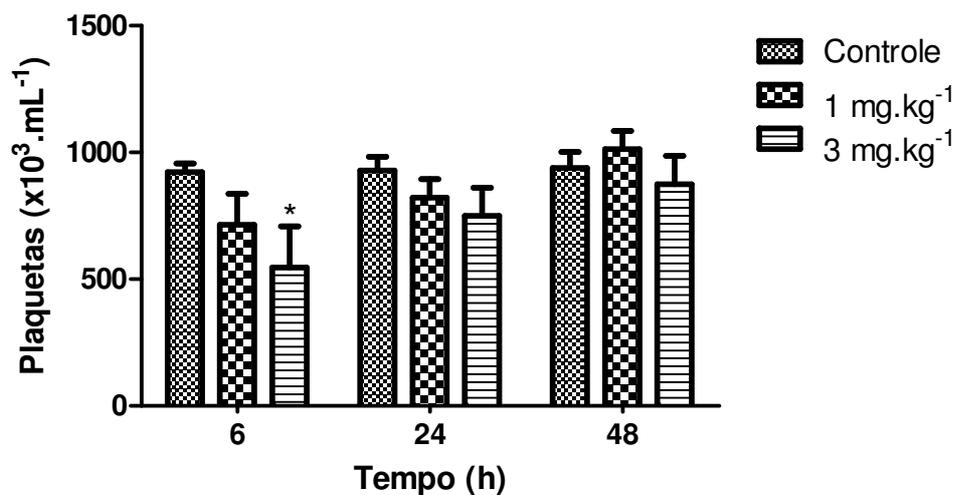


Figura 42. Alterações na quantidade de plaquetas induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*, nas doses de 1 e 3 mg.kg⁻¹, s.c. Valores expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

5.2 Efeitos da cabenegrina A-II em ratos envenenados experimentalmente

Nesta série experimental dois grupos foram realizados, o primeiro recebeu unicamente o veneno de *B. jararacussu* (i.m.) na dose de 3 mg.kg⁻¹. O segundo recebeu a mesma dose de veneno préincubado com 1 mg.kg⁻¹ da cabenegrina A-II.

A cabenegrina A-II reverteu totalmente às alterações na glicemia observadas pela administração do veneno sozinho nos tempos de 24 e 48 horas, ilustrado na Figura 43. Os valores de aspartato aminotransferase não foram alterados significativamente pela préincubação com a cabenegrina A-II, de forma que os mesmo se mantiveram elevados nos tempos de 6 e 24 horas (Figura 44, Tabela 16 do Apêndice). Já alanina aminotransferase teve as alterações inibidas pela cabenegrina A-II no tempo de 6 horas (Figura 45).

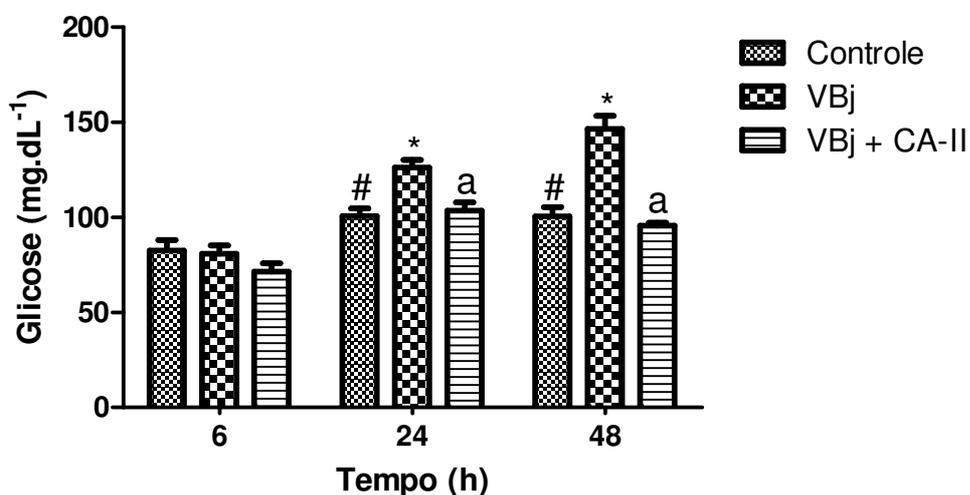


Figura 43. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações na glicemia induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

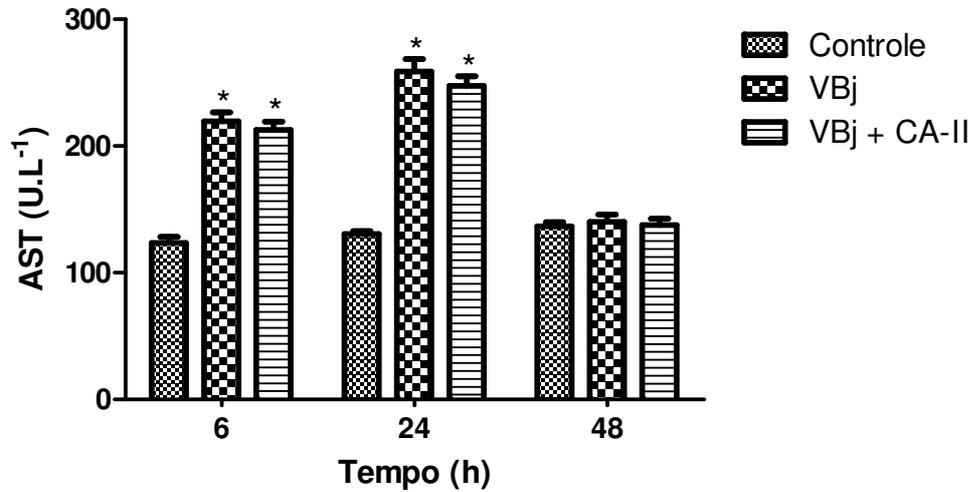


Figura 44. Efeito da cabenegrina A-II nas alterações na concentração sanguínea de AST induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo.

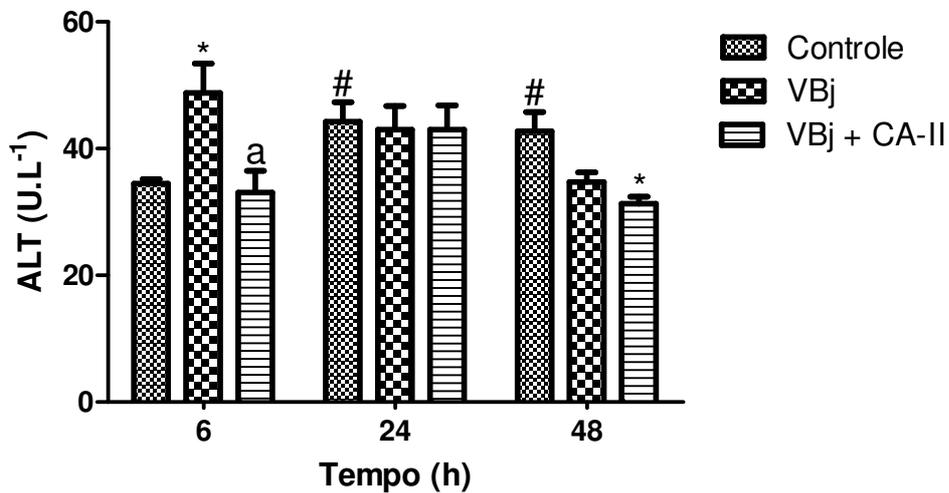


Figura 45. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações na concentração sanguínea de ALT induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e grupo controle no mesmo tempo; e ^a = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

Nos parâmetros renais, as elevações na concentração sérica de uréia induzidas pela administração do veneno sozinho foram parcialmente revertidas pelo tratamento do veneno com a cabenegrina A-II. Esta reversão foi significativa no tempo de 6 horas (Figura 46). As alterações nos níveis sanguíneos de creatinina provocadas pelo veneno foram totalmente revertidas pela administração concomitante da cabenegrina A-II, nos três tempos mensurados no experimento (Figura 47, Tabela 19 do Apêndice).

Os valores de ácido úrico que se mostraram elevados nos últimos dois tempos depois da administração somente do veneno foram revertidos parcialmente pela cabenegrina A-II, e estatisticamente significantes no tempo de 48 horas, conforme Figura 48. Os valores encontram-se dispostos na Tabela 20 do Apêndice. Os valores de creatinoquinase livre no soro foram significativamente reduzidos pela cabenegrina A-II (Figura 49, Tabela 21).

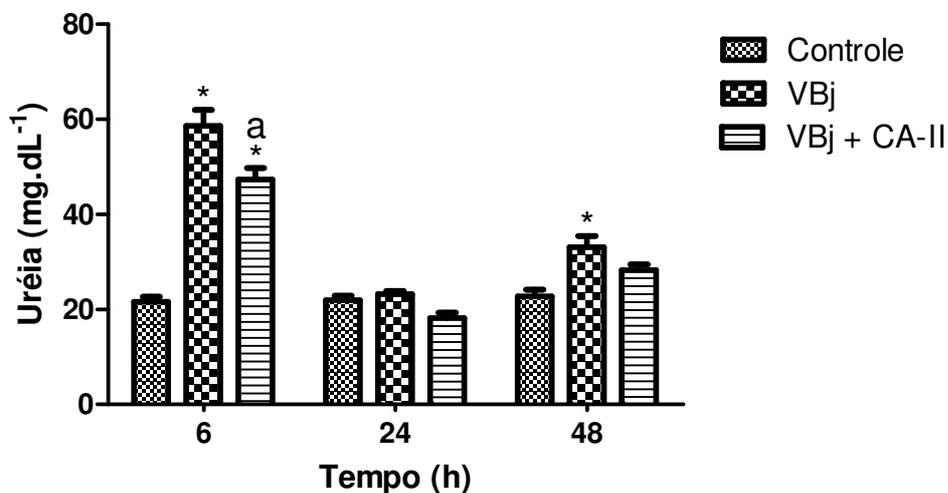


Figura 46. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações na concentração sanguínea de uréia induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e grupo controle no mesmo tempo; e ^a = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

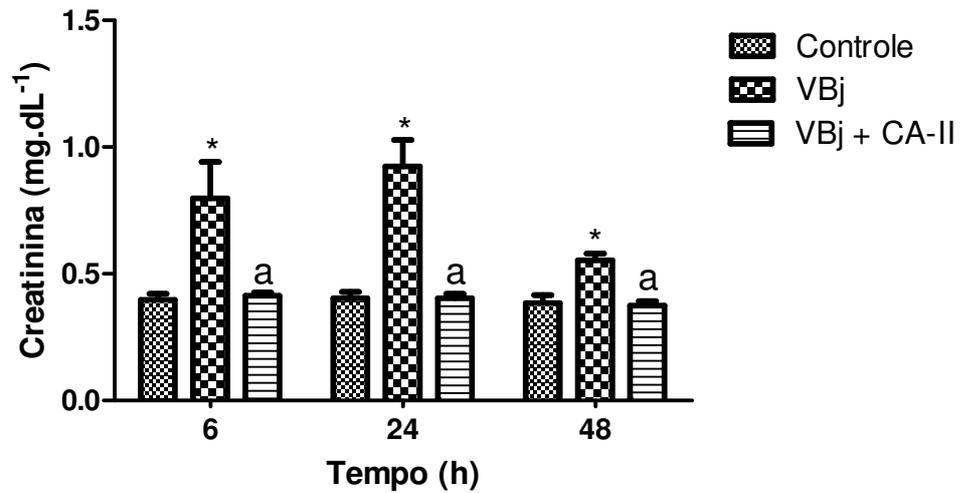


Figura 47. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações na concentração sanguínea de creatinina induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e grupo controle no mesmo tempo; e *a* = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

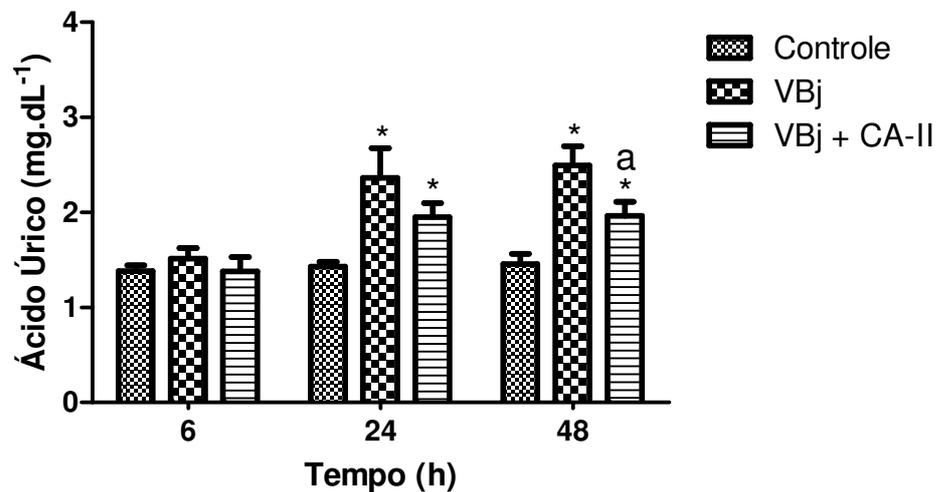


Figura 48. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações na concentração sérica de ácido úrico induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e grupo controle no mesmo tempo; e *a* = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

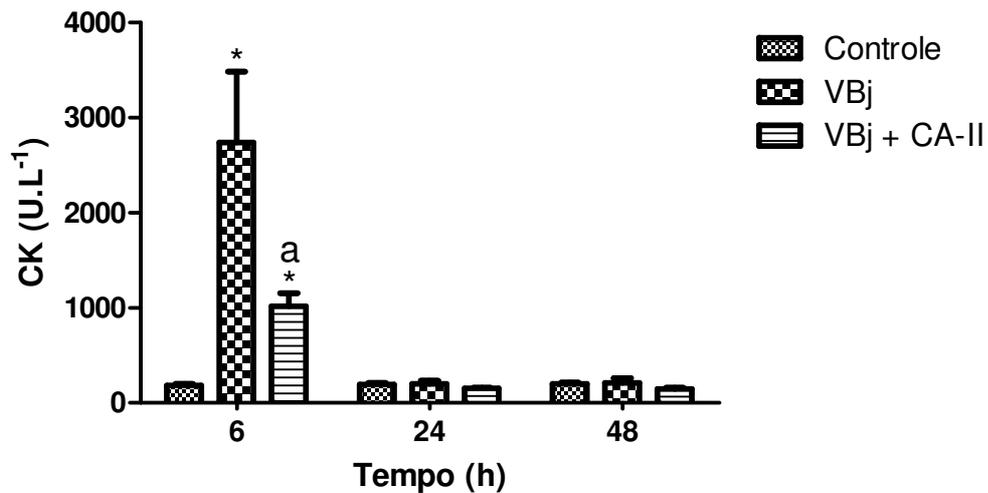


Figura 49. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações na concentração sérica de CK induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e grupo controle no mesmo tempo; e *a* = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

Em relação às alterações hematológicas induzidas pelo veneno sozinho, a cabenegrina préincubada foi capaz de reverter parcialmente a queda no número de leucócitos no tempo de 6 horas (Figura 50), de diminuir significativamente o aumento no número de eritrócitos no tempo de 6 horas, enquanto nos valores de hematócrito, a redução da queda percentual só foi significativa no tempo de 48 horas, conforme Figuras 51 e 52, respectivamente.

A queda no número de plaquetas observada após a administração do veneno de *B. jararacussu* nos tempos 6 e 24 horas foi totalmente bloqueada pela cabenegrina A-II no primeiro tempo, mas não no segundo (Figura 53, Tabela 26 do Apêndice). Os valores de RDW continuaram sem demonstrar alterações nos dois grupos, VBj e VBj + CA-II, conforme dispostos na Tabela 27 do Apêndice.

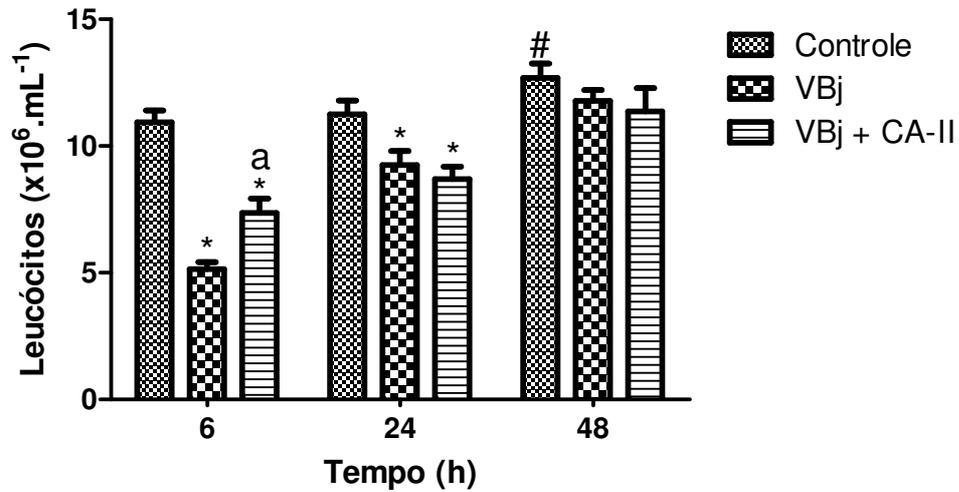


Figura 50. Efeito da cabenegrina A-II na diminuição dos leucócitos totais induzida pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

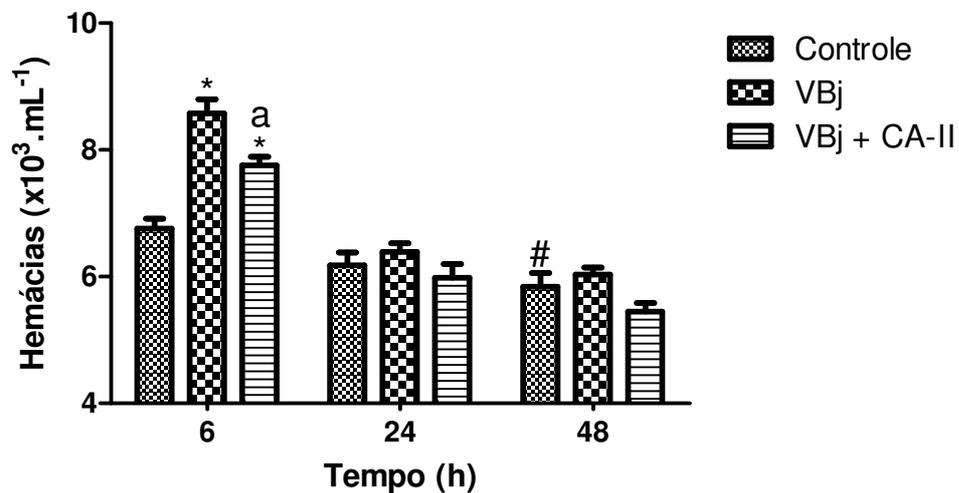


Figura 51. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações nas hemácias induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pósteste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

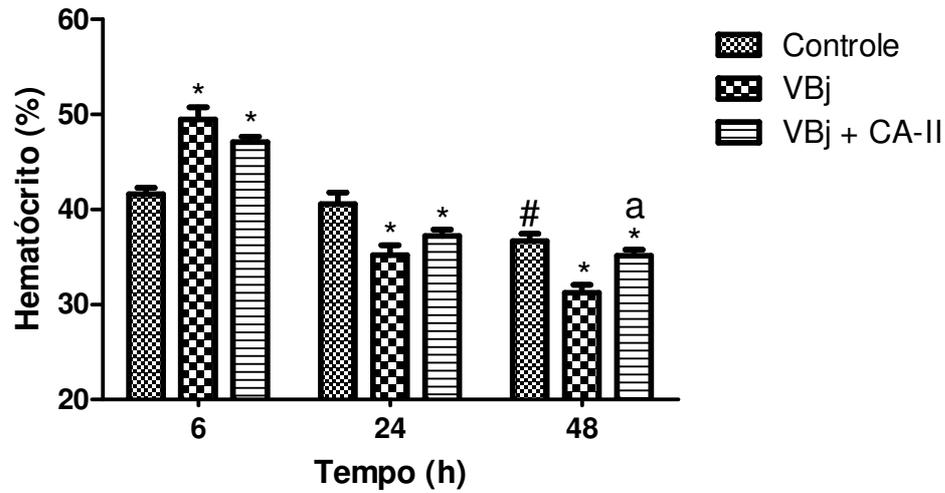


Figura 52. Efeito da cabenegrina A-II nas alterações dos valores de hematócrito induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. # = comparação entre os grupos controle; * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

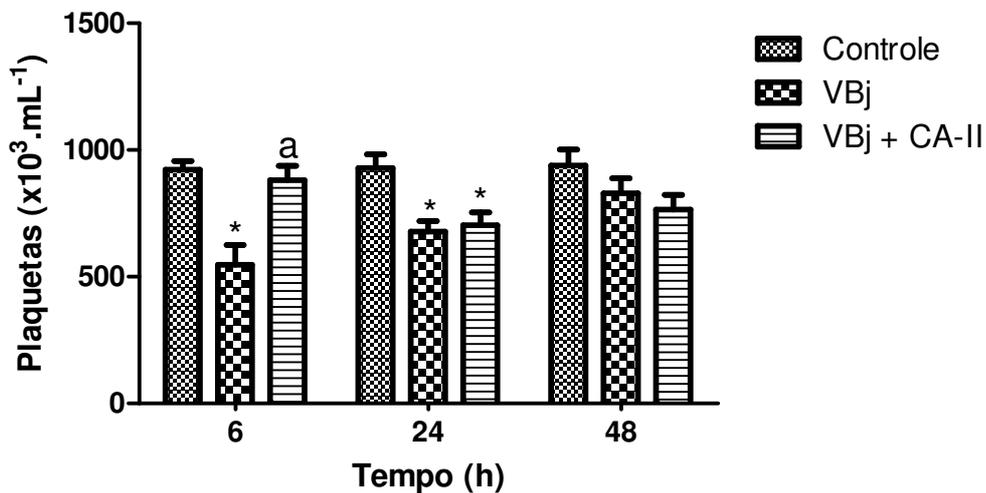


Figura 53. Reversão pela cabenegrina A-II das alterações no número de plaquetas induzidas pelo veneno de *B. jararacussu*. Valores expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo de coleta. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, e por teste *t* de Student com $p < 0,05$. * = comparação entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo tempo; e a = comparação entre os grupos VBj e VBj + CAII, no mesmo tempo.

5.3 Efeito na pressão arterial média de ratos anestesiados

5.3.1 Relação dose-efeito do veneno de *B. jararacussu* na P.A.M. e F.C.

Administrações consecutivas de doses crescentes do veneno de *B. jararacussu* produziram redução significativa da P.A.M. em relação ao controle em todas as doses utilizadas (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). A análise estatística destes percentuais máximos de redução da pressão arterial mostrou que a redução foi significativa em relação aos valores da dose imediatamente menor, unicamente nas duas maiores doses (100 e 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), conforme ilustrado na Figura 54, juntamente com os valores médios da frequência cardíaca nos intervalos de redução máxima da P.A.M. A análise da F.C. revelou uma taquicardia, provavelmente de origem reflexa, na dose de 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

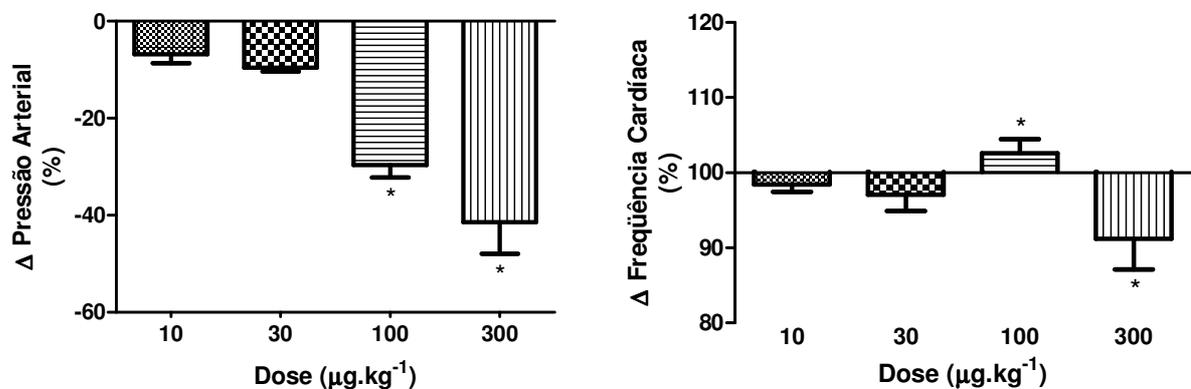


Figura 54. Relação dose-efeito da administração de veneno de *B. jararacussu*, em bolus, em ratos anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg.kg^{-1}), na pressão arterial média e na frequência cardíaca. Dados expressos como média \pm E.P.M. e analisados por análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni, e pelo teste *t* de Studente, com $*p < 0,05$.

Os valores iniciais de controle antes da administração do veneno estão expressos na Tabela X. A curva temporal da resposta pressórica induzida pelas doses do veneno esta ilustrada na Figura 55, assim como a curva temporal da frequência cardíaca na Figura 56.

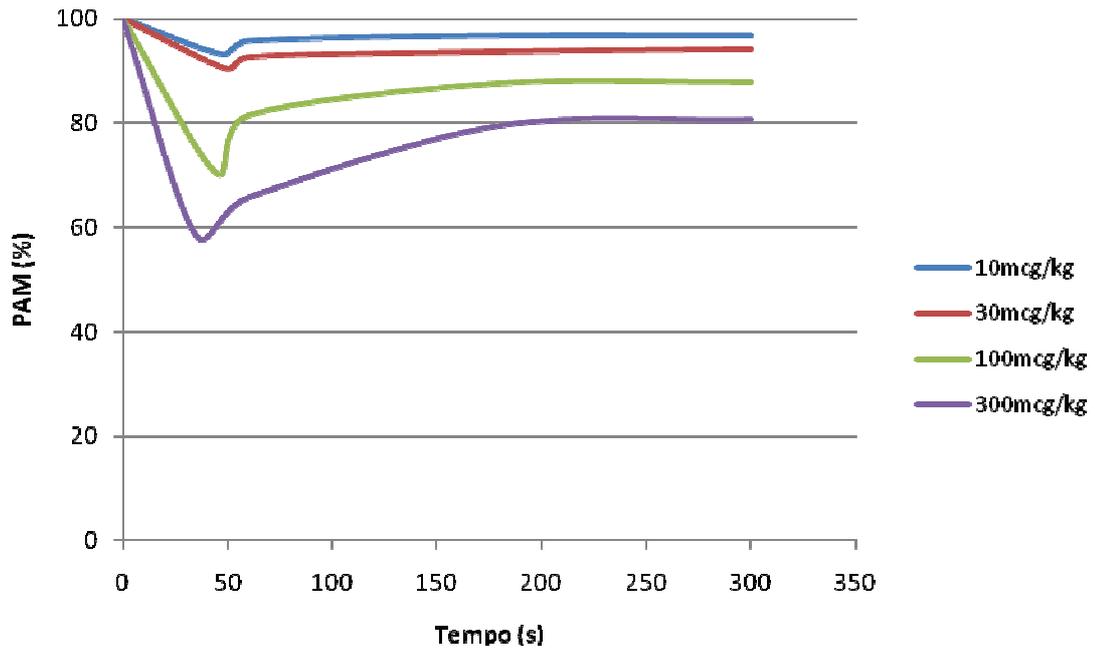


Figura 55. Curso temporal da resposta pressórica induzida pela administração, em bolus, do veneno de *B. jararacussu* em animais anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg.kg⁻¹).

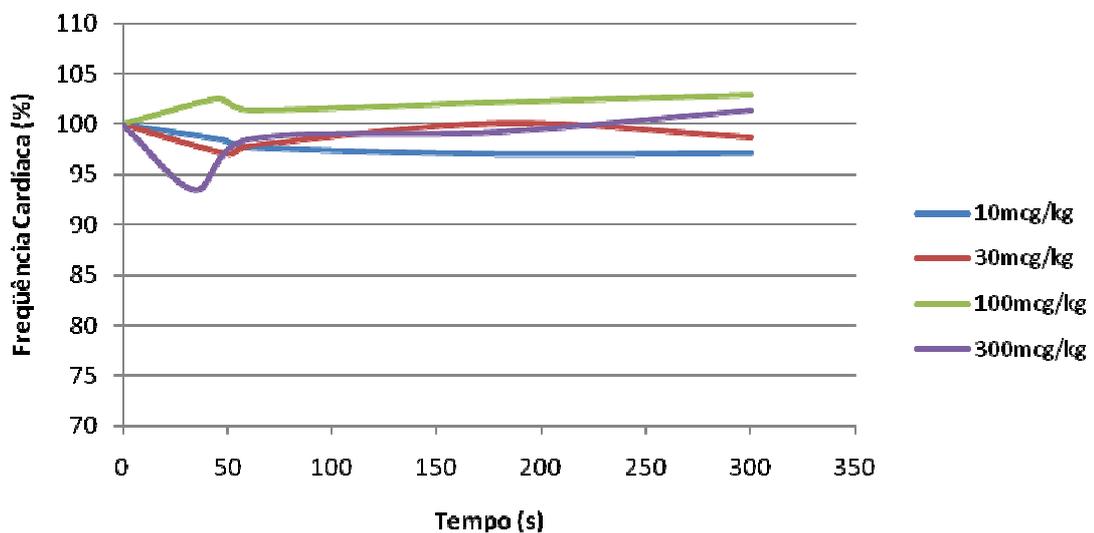


Figura 56. Curso temporal da frequência cardíaca após administração, em bolus, do veneno de *B. jararacussu* em animais anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg.kg⁻¹).

5.3.2 Efeito da cabenegrina A-II sobre a resposta pressórica induzida pelo veneno de *B. jararacussu*

Para avaliação do efeito da cabenegrina A-II na resposta pressórica ao veneno de *B. jararacussu*, primeiramente foi realizado um grupo que recebeu diretamente a dose de $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$, sem ter recebido doses menores antes, no intuito de verificar a ocorrência de taquifilaxia. Neste grupo, a redução após administração de $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de veneno em bolus produziu uma redução de $40,43 \pm 3,74\%$, comparada a $29,62 \pm 2,58\%$ da curva anterior.

O veneno préincubado com a cabenegrina A-II, no entanto, produziu uma redução na pressão arterial somente de $8,42 \pm 2,14\%$, mostrando uma inibição significativa do efeito hipotensor do veneno de *B. jararacussu*, conforme Figura 57.

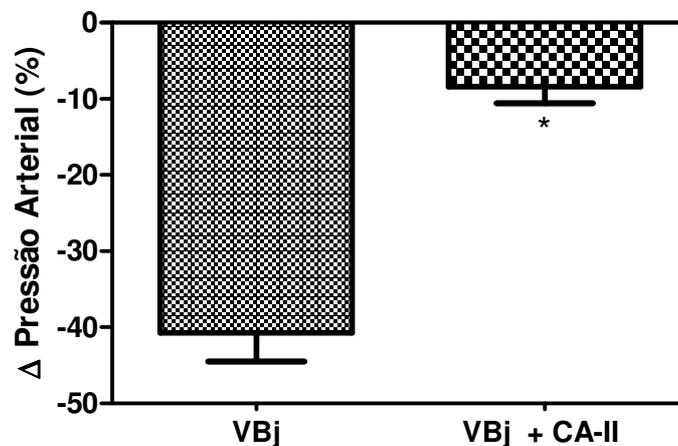


Figura 57. Comparação da amplitude das respostas pressóricas dos animais tratados com veneno de *B. jararacussu* na dose de $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e dos tratados com veneno ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$) préincubado com $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ da cabenegrina A-II por 15 minutos a 37°C . Valores expressos como média \pm E.P.M. e analisados pelo teste *t* de Student, com $*p < 0,0001$.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A espécie *Bothrops jararacussu* possui uma das peçonhas mais letais dentre as do gênero *Bothrops* (ZENI *et al.*, 2007), além de ser capaz de liberar um volume relativamente grande de veneno (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Numa revisão de 29 acidentes ofídicos, comprovadamente causados por *B. jararacussu*, um grande percentual dos pacientes desenvolveu oligúria e choque poucas horas após a picada, e três vítimas morreram (MILANI *et al.*, 1997)

Alterações fisiopatológicas, locais e sistêmicas, têm sido extensamente estudadas por causa da grande variedade de enzima e outros compostos presentes nos venenos de serpentes (ZENI *et al.*, 2007; GUTIÉRREZ, ESCALANTE & RUCAVADO, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Contudo, alterações fisiopatológicas, o papel das enzimas, e as complicações locais e sistêmicas induzidas por doses subletais do veneno de *B. jararacussu* não estão bem estabelecidas (ZENI *et al.*, 2007).

As manifestações clínicas das alterações induzidas pelos venenos botrópicos, especialmente por *B. jararacussu*, incluem sangramento, coagulopatia, hipotensão, alterações hemodinâmicas, edema pulmonar e insuficiência renal aguda. Também podem ocorrer, em casos menos comuns, hemólise intravascular, dano agudo do miocárdio, e em casos mais graves não tratados com soro antibotrópico, falência múltipla de órgãos e morte (MILANI *et al.*, 1997; GUTIÉRREZ, ESCALANTE & RUCAVADO, 2009).

O tratamento efetivo para alterações sistêmicas de envenenamento é a administração intravenosa do soro antiofídico. Infelizmente, os antivenenos disponíveis, algumas vezes, não protegem satisfatoriamente os pacientes quanto aos danos locais e renais. Uma das razões é que os anticorpos produzidos não reconhecem algumas toxinas particulares presentes no veneno da serpente envolvida no acidente (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009). Por este motivo, novos anticorpos têm sido produzidos baseados em proteínas/peptídeos específicos

amplamente envolvidos no quadro sistêmico dos envenenamentos (CALVETE *et al.*, 2009).

Apesar de todos estes esforços, a neutralização dos danos locais induzidos pelos venenos continua sendo um grande desafio devido alguns fatores: (1) o rápido início de ação das toxinas diretamente nos tecidos afetados, principalmente metaloproteases e PLA₂ miotóxicas; (2) a demora na administração do antiveneno e a baixa disponibilidade dos anticorpos no local afetado; e (3) a resposta fisiopatológica direta aos danos locais, que incluem um processo inflamatório proeminente, com ativação de leucócitos e liberação de vários mediadores que participam da degeneração tecidual (SANTORO *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

As pesquisas devem buscar a descoberta, desenvolvimento e aplicação de substâncias que possam ser injetadas no local atingido rapidamente após a picada, especialmente nas zonas rurais, retardando o dano tecidual local pela inibição de metaloproteases e PLA₂ *in situ* (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

Os resultados do envenenamento experimental por *B. jararacussu* foram muito semelhantes entre as vias de administração, com variações da intensidade dos mesmos, de acordo com a amplitude de absorção do veneno, e a amplitude dos danos locais causados pela retenção do veneno. A hiperglicemia induzida pela administração do veneno respondeu a esse perfil tendo início mais rápido no grupo intraperitoneal, seguido pelo grupo intramuscular e só aparecendo no último tempo no grupo subcutâneo.

Hiperglicemia é um efeito comum em venenos de várias espécies de serpentes, escorpiões e aranhas que possuem serotonina na sua composição (CORRÊA *et al.*, 1997). O veneno de *B. jararacussu* possui quantidades muito pequenas de serotonina na sua composição, mas provoca uma intensa agregação plaquetária, que libera grandes quantidades de serotonina na corrente sanguínea que poderiam estar influenciando a liberação de adrenalina pela adrenal, provocando assim, hiperglicemia pela maior liberação de glucagon e pela ação nos receptores musculares e hepáticas liberando glicose a partir do glicogênio

armazenado (YAMADA *et al.*, 1995; GAW *et al.*, 2001; MCPHERSON & PINCUS, 2007; RAZMARA, 2009). Além disso, o veneno de *B. jararacussu* por provocar hemólise devido à ação fosfolipásica (GUTIÉRREZ, ESCALANTE & RUCAVADO, 2009), pode estar liberando uma enzima degradante de insulina presente no interior das hemácias, diminuindo a insulina circulante e aumentando a concentração de glicose sanguínea (MCPHERSON & PINCUS, 2007).

Outra possível explicação para hiperglicemia seria a diminuição da produção de glicogênio pelo fígado, devido à destruição dos hepatócitos, como acontece na cirrose hepática (MOTTA, 2005; MCPHERSON & PINCUS, 2007). Essa hipótese é corroborada pelo aumento nos valores de AST e ALT, marcadores clássicos da função hepática (RAVEL, 1997).

A concentração elevada de AST nas amostras analisadas não pode ser associada somente com dano hepático, uma vez que esta enzima está presente no citoplasma e mitocôndrias de diversos tecidos, como músculo estriado esquelético e cardíaco, nos pulmões e no interior das hemácias (GAW *et al.*, 2001; BENVENUTI *et al.*, 2003; ZENI *et al.*, 2007). Alanina aminotransferase é uma enzima mais específica da função hepática, apesar de apresentar quantidades significativas nos rins (MCPHERSON & PINCUS, 2007). A proporção de aumento entre AST e ALT nestes experimentos indica um dano hepático agudo, com ALT se mantendo elevado por mais tempo devida a meia vida mais elevada. O grupo intramuscular apresentou valores elevados de AST além do tempo de 6 horas, provavelmente devido a contribuição da mAST (fração mitocondrial, altamente concentrada no músculo esquelético), que possui meia vida bem maior que a AST citoplasmática (MCPHERSON & PINCUS, 2007).

As alterações na aspartato aminotransferase, no caso do veneno de *B. jararacussu*, indicam possivelmente dano da musculatura esquelética e do miocárdio, os quais já foram relatados por Benvenuti *et al.* (2003), a cerca de uma paciente picada por *B. jararacussu* e por Zeni *et al.* (2007) no envenenamento experimental de camundongos. Resultados também corroborados pelo aumento na creatinoquinase.

O aumento nos níveis de uréia obedeceu a uma ordem interessante. Ocorreu um aumento inicial em todas as vias e doses do veneno testadas, atribuída por alguns autores a atividade proteolítica do veneno (ZENI *et al.*, 2007; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). No tempo de 24 horas, os valores de uréia se igualaram ao controle, voltando a aumentar no tempo de 48 horas.

A uréia sérica é amplamente utilizada na prática clínica como medida de disfunção renal. Ela não é utilizada como marcador da função renal, pois sua produção depende do fígado (MCPHERSON & PINCUS, 2007). Deste modo, podemos relacionar os valores normais de uréia no tempo de 24 horas, com os valores de ALT indicando dano hepático as 6 e 24 horas, fato que pode ter diminuído a produção de uréia, resultando em valores relativamente normais. A volta dos valores aumentados de uréia em 48 horas pode estar relacionada a danos renais, especialmente do túbulo distal, responsável pela secreção desta substância (GAW *et al.*, 2001; MOTTA, 2005; MCPHERSON & PINCUS, 2007).

Os valores de creatinina e ácido úrico elevados, além de aumentarem os indícios de disfunção renal, também estão relacionados a danos musculares (RIELLA, 1996; MCPHERSON & PINCUS, 2007). O dano muscular pode estar relacionado ao aumento de ácido úrico, uma vez que a ruptura de células musculares liberaria material genético para o meio extracelular. O ácido úrico vem do metabolismo dos ácidos nucleicos, especificamente das purinas, de modo que o aumento da concentração de ácidos nucleicos no meio extracelular aumentaria a produção de ácido úrico, que aliada à disfunção renal, acarretaria nos valores observados nas amostras analisadas nestes experimentos.

O veneno de *B. jararacussu* é amplamente conhecido pela sua alta atividade miotóxica, atribuída as toxinas BthTX-I e BthTX-II (HAVT, FONTELES & MONTEIRO, 2001; SIFUENTES *et al.*, 2008). A liberação de creatinoquinase foi notadamente maior no grupo i.m. do que nos outros dois grupos, como era de se esperar. Os altos valores de CK observados no grupo i.p. devem-se, além da maior absorção sistêmica do veneno, a fração da CK total denominada CK-BB, presente no cérebro e na musculatura lisa, principalmente dos intestinos, órgão diretamente

expostos ao veneno pela administração intraperitoneal (MOTTA, 2005; MCPHERSON & PINCUS, 2007).

Alguns dos parâmetros hematológicos alterados pelas duas doses de veneno servem para confirmar algumas indicações bioquímicas. Nos tempos iniciais dos experimentos, foi observada em todas as vias de administração uma diminuição no número total de leucócitos. Leucocitose e intensa e prolongada linfopenia foram relatados em pacientes picados por elapídeas australianas, mas os mecanismos não foram satisfatoriamente explicados (WHITE *et al.*, 1989 apud SANTORO *et al.*, 2008).

Experimentos realizados com *B. jararaca* em cães mostraram leucocitose neutrofílica e linfopenia. Contudo, pacientes picados por *B. jararaca*, os valores de linfócitos e neutrófilos voltaram ao normal após o tratamento (SANTORO *et al.*, 2008). Uma explicação plausível para leucopenia observados nestes resultados seria devido à realização dos experimentos em ratos, pois estes possuem linfócitos como as células de defesa mais abundantes, e não neutrófilos como cães e humanos. De forma que a linfopenia observada em humanos e cães pode ser a responsável pela leucopenia total em ratos, já que os linfócitos correspondem de 70 a 85% do número de leucócitos nesta espécie (DANTAS *et al.*, 2006).

Houve um aumento no número de hemácias, acompanhado pelo hematócrito no grupo intramuscular no tempo de 6 horas. Gutiérrez *et al.* (2009) sugeriram que esta hemoconcentração, principalmente na via i.m., acontece pela ação de vários componentes dos venenos botrópicos, especialmente as metaloproteases, que provocam hipovolemia por aumento da permeabilidade vascular (destruição do endotélio e da membrana basal) e pela ação de mediadores inflamatórios liberados no decorrer do envenenamento.

A subsequente redução da contagem de hemácias e do hematócrito pode ser devida a ação das metaloproteases também. Conforme os danos aos vasos causados por estas enzimas vão se propagando, o extravasamento de plasma dá lugar ao extravasamento de sangue, gerando hemorragias, potencializadas pela

incoagulabilidade sanguínea gerada por estes venenos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; GUTIÉRREZ, ESCALANTE & RUCAVADO, 2009).

A maioria dos fatores de coagulação são zimogêneos de serino proteases, que são convertidos a enzimas ativas durante o processo de coagulação. As seis formas ativas dos fatores II, VII, IX, X, XI e XII são serino proteases (BEUTLER *et al.*, 2000). A ação das serino proteases presentes nos venenos botrópicos podem estar diretamente envolvidas nos distúrbios de coagulação, principalmente a coagulação intravascular disseminada, relatada nos venenos botrópicos e sendo responsável por altos índices de mortalidade, principalmente por falência hepática, renal, pulmonar e pancreática devido à formação de microtrombina e posterior coagulopatia (BEUTLER *et al.*, 2000; RAMOS & SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

Participando desta ação prócoagulante, o veneno de *B. jararacussu*, possui enzimas trombina-like, a BJ-48, que como a trombina, age clivando o fibrinogênio em monômeros de fibrina e formando o trombo frouxo de fibrina (BEUTLER *et al.*, 2000; SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2007). As serino proteases presentes no veneno têm a capacidade de ativar plasmina, clivando plasminogênio plasmático. A plasmina, junto com as serino proteases, clivam o trombo frouxo de fibrina, aumentando a incoagulabilidade sanguínea e os sangramentos (BEUTLER *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009).

A grande queda de plaquetas observadas nos animais envenenados por *B. jararacussu* pode ser decorrente da ação de lectinas tipo C com o fator de Von Willebrand, promovendo a interação com o receptor GPIb das plaquetas, resultando em aglutinação plaquetária, como evidenciado para lectinas de *B. jararaca* e *B. asper* (GUTIÉRREZ, ESCALANTE & RUCAVADO, 2009). O dano nos microvasos induzidos pelas metaloproteases também promovem agregação plaquetária, com consequente sequestro de plaquetas da corrente sanguínea para os microvasos afetados, causando trombocitopenia (BEUTLER *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ, ESCALANTE & RUCAVADO, 2009).

Um fato que não pode ser deixado de lado é que fragmentos de anticorpos F(ab')₂ interagem diretamente com plaquetas e podem formar agregados plaquetários *in vitro*, o que não é lido por leitores automáticos e dificilmente vistos a olho desarmado nas amostras de sangue (BEUTLER *et al.*, 2000). No caso deste protocolo experimental, tais anticorpos foram adicionados as amostras no soro antibotrópico, para neutralização e interrupção dos efeitos do veneno no exato momento da coleta. Contudo, isto não invalida os dados, uma vez que as vítimas de acidentes ofídicos também receberão anticorpos no seu tratamento.

A cabenegrina A-II foi capaz de bloquear totalmente alguns efeitos do veneno de *B. jararacussu*, como a hiperglicemia, o aumento na AST e na creatinina, servindo como indicativo da melhoria na função renal dos animais. A inibição da hiperglicemia, juntamente com a inibição da trombocitopenia, nos aproxima da hipótese de que a hiperglicemia poderia ser gerada pela liberação plaquetária de serotonina.

A reversão total dos valores aumentados de creatinina, e parcial dos valores de ácido úrico e uréia, além de indicarem melhoria da função renal, nos apontam em três possíveis direções: (1) diminuição da ação das proteases (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009); (2) diminuição da mionecrose, com menor liberação de ácido nucleicos no espaço extracelular, fato este corroborado pela diminuição da liberação de CK (SIFUENTES *et al.*, 2008); e (3) diminuição da coagulação intravascular disseminada, fato que melhoraria a função renal, hepática e pancreática (o que diminuiria a hiperglicemia) (LOMONTE *et al.*, 2009).

A diminuição da hemoconcentração, que aumentou o número de hemácias e o hematócrito em 6 horas no grupo envenenado, podem nos servir de indicativo da atividade inibitória de metaloproteases pela cabenegrina A-II. Resultados prévios de *docking* realizados com a cabenegrina A-II nas toxinas BthTX-I e BthTX-II nos mostraram alta afinidade desta substância pelos sítios ativos das duas toxinas, principalmente se tratando do estereoisômero S da cabenegrina A-II. Estes resultados apontam para a atividade antiofídica da cabenegrina A-II ser pela inibição das enzimas do veneno e não por um antagonismo dos eventos

fisiopatológicos, como acontece em outros produtos naturais com atividade anti-inflamatória (MORS *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2004).

Os resultados na pressão arterial nos apontam para presença de peptídeos ponteciadores de bradicinina (BPBs), que atuam inibindo a enzima conversora de angiotensina (HVT, FONTELES & MONTEIRO, 2001); para presença de enzimas calicreína-*like* e serino proteases que levam a formação de calicreína a partir da précalicreína, que promovem liberação de bradicinina, com consequente produção de óxido nítrico (NO) (MUNKER *et al.*, 2007).

Outra possível causa de hipotensão promovida pelo veneno de *B. jararacussu* é a ação cardiotoxica direta causada pelas miotoxinas, uma vez que nestes experimentos, o veneno foi administrado diretamente na luz vascular, seguindo direto para o coração (SIFUENTES *et al.*, 2008).

A ação das cabenegrinas A-I e A-II nos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno de *Bothrops atrox* já havia sido relatada por Nakagawa e colaboradores (1982), mas nenhum mecanismo molecular desde bloqueio foi proposto pelos autores.

A ação da cabenegrina A-II no bloqueio dos efeitos pressóricos do veneno pode estar relacionada à inibição enzimática de serino proteases, calicreína-*like* ou, mais provavelmente, devido aos nossos dados preliminares, pela inibição das miotoxinas que agem diretamente no miocárdio. Neste caso, testes com as enzimas isoladas serão necessários para esclarecimento do mecanismo de bloqueio da hipotensão pela cabenegrina A-II (LOMONTE *et al.*, 2009).

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir a partir dos dados obtidos que o modelo experimental de envenenamento é eficiente em revelar as alterações sistêmicas induzidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu*, sendo um modelo adequado ao estudo de possíveis inibidores.

A cabenegrina A-II, conforme relatado anteriormente para outros venenos botrópicos, foi eficiente em bloquear a maioria dos efeitos bioquímicos, hematológicos e pressóricos induzidos pelo veneno de *B. jararacussu* em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HAZIMI, B. M. G.; ALKHATHLAN, H. Z. Naturally occurring pterocarpanoids and related compounds. **Journal of King Saud Arabia University**, v. 12, n. 2, p. 93-122, 2000.

ARAÚJO, R. M. **Flavonoides e Floroglucínóis de *Harpalyce brasiliensis***: aspectos químicos, biológicos e espectroscópicos. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Brasil, 2008.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barraviera, B. (Coord.) **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 1ed. São Paulo: Manole, 2000.

BENVENUTI, L. A.; FRANÇA, O. S. F.; BARBARO, K. C.; NUNES, J. R.; CARDOSO, J. L. C. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snakebite: a case report. **Toxicon**, v. 42, p. 331-334, 2003.

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLIER, B. S.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U. **William's Hematology**, 6th ed, USA: McGraw-Hill Professional, 2000.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M. S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, p. 1017-1025, 2003.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**, 3 ed, Mossoró, RN: Editora Universitária, 1976.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, XXX (XX), p. 2009.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, S. A.; HADDAD, V. J. **Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Editora Savier, 2003.

CORRÊA, M. M.; SAMPAIO, S. V.; LOPES, R. A.; MANCUSO, L. C.; CUNHA, O. A. B.; FRANCO, J. J.; GIGLIO, J. R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. **Toxicon**, v. 35, n. 7, p. 1053-1067, 1997.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products From Plants**, 2ed, Taylor & Francis Group, 2006.

DA SILVA, A. J. M.; COELHO, A. L.; SIMAS, A. B. C.; MORAES, R. A. M.; PINHEIRO, D. A.; FERNANDES, F. F. A.; ARRUDA, E. Z.; COSTA, P. R. R.; MELO, P. A. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpanes against snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 431-435, 2004.

DA SILVA, G. L.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. A New Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliensis**. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 10, n. 6, p. 438-442, 1999.

DA SILVA, J. O.; FERNANDES, R. S.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, C. Z.; MAZZI, M. V.; FRANCO, J. J.; GIULIATTI, S.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, p. 283-291, 2007.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta of Science and Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 183-189, 2009.

FALCÃO, M. J. C.; POULIQUEM, Y. B. M.; LIMA, M. A. S.; GRAMOSA, N. V.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MILITÃO, G. C. G.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R. J. Cytotoxic flavonoids from *Platymiscium floribundum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 423-426, 2005.

GAW, A. *et al.* **Bioquímica Clínica**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GOMES-RÜTH, F.-X.; KRESS, L. F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 11, p. 4151-4157, 1993.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, XXX, p. 1-12, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, XXX, p. 1-18, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

HAVT, A. **Toxicidade aguda e alterações hematológicas e renais do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Brasil, 1999.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA2 and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, p. 1841-1846, 2001.

HEINRICH, M., BARNES, J., GIBBONS, S., WILLIAMSON, E.M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.** London: Churchill Livingstone, 2003.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L.; ÁLVAREZ-CORRAL, M.; MUÑOZ-DORADO, M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, I. Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 125-154, 2008.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA JR., M.; XAVIER, M. A. S.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-219, 2004.

LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenoming and their treatment. **Toxicon**, XXX, p.1-17, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2 ed, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais** - Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil, 3 ed, Fortaleza: UFC Edições, 2007.

MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STABELI, R. G.; FRANCO, J. J.; TICLI, F. K.; CINTRA, A. C. O.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, p. 215-223, 2004.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. Henry's **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**, 21st ed, USA: Saunders Elsevier, 2007.

MELO, M. M.; LÚCIA, M.; HABERMEHL, G. G. Plants extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2007.

MILANI, R.; JORGE, M. T.; CAMPOS F. P. F.; MARTINS, F. P.; BOUSSO, A.; CARDOSO, J. L. C.; RIBEIRO, L. A.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O. S.; SANO MARTINS, I. S.; CARDOSO, D.; FERNANDES, I. D. O. F.; FERNANDES, J. C.; ALDRED, V. L.; SANDOVAL, M. P.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Snake bites by Jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo, Brazil. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 90, p. 323-334, 1997.

MILITÃO, G. C. G.; PINHEIRO, S. M.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Bioassay-guided fractionation of pterocarpans from roots of *Harpalyce brasiliiana* Benth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6687-6691, 2007.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C. Do; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.

MOTTA, V. T. **Bioquímica**. 4ed., São Paulo: Educus, 2005.

MUNKER, R.; HILLER, E.; GLASS, J.; PAQUETTE, R. **Modern Hematology: Biology and Clinical Management**, 2nd ed, USA: Humana Press, 2007.

NAKAGAWA, M.; NAKANISHI, K.; DARKO, L.L.; VICK, J.A. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 38, p. 3855-3858, 1982.

OKONOJI, T.; HATTORI, Z.; OGISO, A.; MITSUI, S. Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxin. **Toxicon**, v. 17, p. 524-527, 1979.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; JIMÉNEZ, S. L.; FONNEGRA, R.; OSORIO, R. G.; GARCÍA, M. E.; DÍAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part II: Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 505-511, 2000.

PEREIRA, B. M. R.; DAROS, M. R.; PARENTE, J. P.; MATOS, F. J. A. Bredemeyeroside D, a novel triterpenoid saponin from *Bredemeyera floribunda*: A potent snake venom antidote activity on mice. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 666-669, 1996.

PEREIRA, N. A.; RUPPELT PEREIRA, B. M.; DO NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes. IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.

PÉREZ, A. V.; SARAIVA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C. D.; SOARES, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 49, p. 1063-1069, 2007.

PINHEIRO, S. M.; SILVEIRA, E. R. **Flavonoides de *Harpalyce brasiliana* Benth:** aspectos químicos e espectroscópicos. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

PITHAYANUKUL, P.; RUENRAROENGSAK, P.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R.; SAEN-OON, S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plants polyphenols. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 527-533, 2007.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domain. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 142, p. 328-346, 2006.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico:** Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RAZMARA, M. **Platelet dysfunction in diabetes: impacts of hyperglycemia and GPIIb/IIIa inhibition.** Thesis – Karolinska Institute at Karolinska University Hospital (Solna), Stockholm, Sweden, 2009.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475-480, 1997.

RIELLA, M. C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios hidroeletrólíticos.** 3ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; FRANÇA, J. B.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; SILVA, F. H.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-

SIQUEIRA, R. J. B. **Estudo dos efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, em ratos normotensos.** Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia, UFPE, 2005.

TAHARA, S.; IBRAHIM, R. K. Prenylated Isoflavonoids – An Update. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1073-1094, 1995.

TAKEDA, A. A. S.; DOS SANTOS, J. I.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A2 complexed with *p*-bromophenacyl bromide and α -tocopherol inhibitors at 1.9- and 1.45-Å resolution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1699, p. 281-284, 2004.

TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; DIZ-FILHO, E. B. S.; OLIVEIRA, S. C. B.; TOYAMA, M. H. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Toxicon**, v. 53, p. 417-426, 2009.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, A. M. C.; MONTEIRO, H. S. A. FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H. Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, p. 70-82, 2007.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y.; YASHIKAWA, T.; KIMURA, I.; HORISAKA, K. The involvement of the peripheral 5-HT_{2a} receptor in peripherally administered serotonin-induced hyperglycemia in rats. **Life Sciences**, 57 (8), p. 819-825, 1995.

ZENI, A. L. B.; BECKER, A.; KRUG, M.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. **Journal of Venom and Animal Toxins including Tropical Diseases**, 13 (3), p. 664-676, 2007.

APÊNDICES

Tabela 2. Valores de glicemia (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg^{-1}), I.P. (1 e 3 mg.kg^{-1}) e S.C. (1 e 3 mg.kg^{-1}). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. $^{\#}p<0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. $^*p<0,05$, $^{**}p<0,01$ e $^{***}p<0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. $^ap<0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg^{-1})	I.M. (3 mg.kg^{-1})	I.P. (1 mg.kg^{-1})	I.P. (3 mg.kg^{-1})	S.C. (1 mg.kg^{-1})	S.C. (3 mg.kg^{-1})
6h	84,75 \pm 5,46	87,38 \pm 5,64	80,88 \pm 4,34	122,00 \pm 10,25 **	78,63 \pm 4,56 a	74,86 \pm 10,25	80,43 \pm 8,91
24h	106,90 \pm 2,48 $^{\#}$	154,50 \pm 3,97 ***	126,30 \pm 3,89 *a	114,60 \pm 5,66	127,30 \pm 10,29	109,00 \pm 5,91	124,50 \pm 11,55
48h	103,40 \pm 4,31 $^{\#}$	142,90 \pm 2,56 ***	146,50 \pm 6,90 ***	127,30 \pm 16,13	142,10 \pm 11,79 **	125,40 \pm 9,78	152,00 \pm 16,56 ***

Tabela 3. Valores de AST (U.L⁻¹) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg⁻¹), I.P. (1 e 3 mg.kg⁻¹) e S.C. (1 e 3 mg.kg⁻¹). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. #*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg ⁻¹)	I.M. (3 mg.kg ⁻¹)	I.P. (1 mg.kg ⁻¹)	I.P. (3 mg.kg ⁻¹)	S.C. (1 mg.kg ⁻¹)	S.C. (3 mg.kg ⁻¹)
6h	123,60 \pm 4,68	180,50 \pm	220,60 \pm				
		11,79***	10,14*** ^a	167,80 \pm 15,09**	164,00 \pm 22,62*	131,90 \pm 9,28	151,70 \pm 12,70**
24h	130,60 \pm 2,32	218,30 \pm	242,80 \pm				
		15,29***	12,30***	150,40 \pm 8,79	149,00 \pm 23,22	133,40 \pm 3,86	142,10 \pm 10,13
48h	136,50 \pm 3,28	140,90 \pm 10,93	149,80 \pm 6,61	146,40 \pm 12,14	134,20 \pm 7,19	135,50 \pm 3,90	136,30 \pm 4,44

Tabela 4. Valores de ALT (U.L^{-1}) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg^{-1}), I.P. (1 e 3 mg.kg^{-1}) e S.C. (1 e 3 mg.kg^{-1}). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. $^{\#}p<0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. $^*p<0,05$, $^{**}p<0,01$ e $^{***}p<0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. $^ap<0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg^{-1})	I.M. (3 mg.kg^{-1})	I.P. (1 mg.kg^{-1})	I.P. (3 mg.kg^{-1})	S.C. (1 mg.kg^{-1})	S.C. (3 mg.kg^{-1})
6h	34,45 \pm 0,77	39,13 \pm 2,03	55,63 \pm 3,65 ***a	49,00 \pm 3,39 ***	57,00 \pm 9,29 *	41,71 \pm 2,15 **	42,50 \pm 1,71 ***
24h	42,10 \pm 3,25 $^{\#}$	66,13 \pm 2,92 ***	48,00 \pm 2,48 a	46,88 \pm 4,44	79,75 \pm 26,63 *	47,50 \pm 4,72	45,00 \pm 3,12
48h	43,40 \pm 2,88 $^{\#}$	46,88 \pm 2,53	42,25 \pm 3,93	45,63 \pm 1,58	52,71 \pm 10,05	43,50 \pm 2,69	44,25 \pm 1,89

Tabela 5. Valores de uréia (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg^{-1}), I.P. (1 e 3 mg.kg^{-1}) e S.C. (1 e 3 mg.kg^{-1}). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg^{-1})	I.M. (3 mg.kg^{-1})	I.P. (1 mg.kg^{-1})	I.P. (3 mg.kg^{-1})	S.C. (1 mg.kg^{-1})	S.C. (3 mg.kg^{-1})
6h	21,63 \pm 1,08	52,38 \pm 2,60***	58,63 \pm 3,35***	33,50 \pm 1,45***	43,50 \pm 5,71*** ^a	37,33 \pm 2,89***	47,00 \pm 2,19*** ^a
24h	21,96 \pm 0,94	25,13 \pm 1,14	23,25 \pm 0,67	24,63 \pm 2,06	31,50 \pm 2,65**	24,13 \pm 1,91	24,57 \pm 1,36
48h	22,80 \pm 1,35	33,13 \pm 1,12***	33,13 \pm 2,31***	29,25 \pm 2,04*	33,33 \pm 1,74***	29,38 \pm 1,36*	30,88 \pm 2,42**

Tabela 6. Valores de creatinina (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg^{-1}), I.P. (1 e 3 mg.kg^{-1}) e S.C. (1 e 3 mg.kg^{-1}). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg^{-1})	I.M. (3 mg.kg^{-1})	I.P. (1 mg.kg^{-1})	I.P. (3 mg.kg^{-1})	S.C. (1 mg.kg^{-1})	S.C. (3 mg.kg^{-1})
6h	0,39 \pm 0,02	0,58 \pm 0,05*	0,80 \pm 0,14***	0,58 \pm 0,04**	0,64 \pm 0,04***	0,55 \pm 0,06**	0,60 \pm 0,04***
24h	0,40 \pm 0,02	0,70 \pm 0,13*	0,92 \pm 0,10***	0,89 \pm 0,19***	1,00 \pm 0,23***	0,52 \pm 0,02*	0,59 \pm 0,04***
48h	0,38 \pm 0,03	0,45 \pm 0,04	0,55 \pm 0,03	0,45 \pm 0,05	0,51 \pm 0,06	0,45 \pm 0,02	0,53 \pm 0,04**

Tabela 7. Valores de ácido úrico (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg^{-1}), I.P. (1 e 3 mg.kg^{-1}) e S.C. (1 e 3 mg.kg^{-1}). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg^{-1})	I.M. (3 mg.kg^{-1})	I.P. (1 mg.kg^{-1})	I.P. (3 mg.kg^{-1})	S.C. (1 mg.kg^{-1})	S.C. (3 mg.kg^{-1})
6h	1,38 \pm 0,06	1,35 \pm 0,11	1,51 \pm 0,11	1,57 \pm 0,11	3,20 \pm 0,28	1,56 \pm 0,13	1,43 \pm 0,09
24h	1,43 \pm 0,05	2,42 \pm 0,38***	2,37 \pm 0,31***	1,59 \pm 0,24	2,20 \pm 0,19*** ^a	1,58 \pm 0,10	1,57 \pm 0,19
48h	1,46 \pm 0,11	2,14 \pm 0,25*	2,49 \pm 0,20**	1,66 \pm 0,22	1,81 \pm 0,16*** ^a	2,00 \pm 0,18*	1,85 \pm 0,18

Tabela 8. Valores de CK ($U.L^{-1}$) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 $mg.kg^{-1}$), I.P. (1 e 3 $mg.kg^{-1}$) e S.C. (1 e 3 $mg.kg^{-1}$). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 $mg.kg^{-1}$)	I.M. (3 $mg.kg^{-1}$)	I.P. (1 $mg.kg^{-1}$)	I.P. (3 $mg.kg^{-1}$)	S.C. (1 $mg.kg^{-1}$)	S.C. (3 $mg.kg^{-1}$)
6h	186,50 \pm 14,00	801,00 \pm	2.880,00 \pm		1.348,00 \pm		579,50 \pm
		161,20***	695,70*** ^a	417,70 \pm 164,80*	577,60*** ^a	330,70 \pm 83,26*	154,90***
24h	195,30 \pm 17,89	183,70 \pm 36,44	201,30 \pm 34,39	183,70 \pm 36,44	512,80 \pm 312,20	178,50 \pm 12,48	430,00 \pm 137,60* ^a
48h	202,50 \pm 11,47	195,10 \pm 68,52	194,00 \pm 54,76	195,50 \pm 56,52	255,80 \pm 80,20	197,00 \pm 27,12	226,20 \pm 38,13

Tabela 9. Contagem de leucócitos ($\cdot 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), I.P. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) e S.C. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.M. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.P. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.P. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	S.C. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	S.C. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
6h	10,94 \pm 0,46	7,32 \pm 0,46***	4,96 \pm 0,32*** ^a	8,40 \pm 0,76*	8,09 \pm 0,68*	6,92 \pm 0,31***	5,45 \pm 0,33***
24h	10,94 \pm 0,48	9,23 \pm 0,31	4,95 \pm 0,32*** ^a	11,13 \pm 0,78	10,93 \pm 1,11	11,08 \pm 0,65	8,88 \pm 1,03* ^a
48h	11,69 \pm 0,54	12,54 \pm 0,67	10,01 \pm 1,11 ^a	11,60 \pm 1,15	11,86 \pm 1,17	13,56 \pm 0,66	11,56 \pm 0,70

Tabela 10. Contagem de eritrócitos ($\cdot 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), I.P. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) e S.C. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.M. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.P. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.P. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	S.C. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	S.C. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
6h	6,75 \pm 0,15	8,11 \pm 0,14***	8,05 \pm 0,16***	6,87 \pm 0,12	6,81 \pm 0,33	7,36 \pm 0,17	7,37 \pm 0,31
24h	6,71 \pm 0,27	6,15 \pm 0,07	6,09 \pm 0,10*	5,48 \pm 0,49	4,94 \pm 0,59**	5,86 \pm 0,20*	5,64 \pm 0,27**
48h	6,04 \pm 0,20	5,97 \pm 0,07	5,80 \pm 0,12	4,97 \pm 0,51	4,62 \pm 0,60*	5,41 \pm 0,30	5,18 \pm 0,35

Tabela 11. Valores de hemoglobina (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg^{-1}), I.P. (1 e 3 mg.kg^{-1}) e S.C. (1 e 3 mg.kg^{-1}). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg^{-1})	I.M. (3 mg.kg^{-1})	I.P. (1 mg.kg^{-1})	I.P. (3 mg.kg^{-1})	S.C. (1 mg.kg^{-1})	S.C. (3 mg.kg^{-1})
6h	12,90 \pm 0,16	15,40 \pm 0,26***	14,99 \pm 0,28***	13,10 \pm 0,19	13,13 \pm 0,49	14,16 \pm 0,27	13,78 \pm 0,60
24h	12,76 \pm 0,32	12,01 \pm 0,09	11,38 \pm 0,15***	10,64 \pm 0,85*	10,30 \pm 0,97*	11,68 \pm 0,26	11,23 \pm 0,42
48h	11,66 \pm 0,25 [#]	11,50 \pm 0,09	11,04 \pm 0,24	9,70 \pm 0,87	9,00 \pm 1,07**	10,76 \pm 0,44	10,17 \pm 0,65

Tabela 12. Valores de hematócrito (%) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg⁻¹), I.P. (1 e 3 mg.kg⁻¹) e S.C. (1 e 3 mg.kg⁻¹). Valores expressos como média ± erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. #*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg⁻¹)	I.M. (3 mg.kg⁻¹)	I.P. (1 mg.kg⁻¹)	I.P. (3 mg.kg⁻¹)	S.C. (1 mg.kg⁻¹)	S.C. (3 mg.kg⁻¹)
6h	41,61 ± 0,69	48,58 ± 0,95***	46,33 ± 0,85**	40,74 ± 0,71	40,16 ± 1,41	44,45 ± 1,05	44,54 ± 1,41
24h	40,57 ± 1,21	36,73 ± 0,38**	35,73 ± 0,54***	32,86 ± 2,91**	33,80 ± 2,28*	35,63 ± 0,99*	34,49 ± 1,48**
48h	36,67 ± 0,77#	36,05 ± 0,36	34,15 ± 0,87	30,79 ± 2,81*	31,28 ± 1,90	33,33 ± 1,58	32,26 ± 1,83*

Tabela 13. Contagem de plaquetas ($\cdot 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), I.P. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) e S.C. (1 e 3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.M. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.P. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	I.P. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	S.C. (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	S.C. (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
6h	923,50 \pm 33,54	1.063,00 \pm 34,43	398,90 \pm 59,82*** ^a	334,00 \pm 35,74***	226,40 \pm 26,76***	715,00 \pm 121,30	546,70 \pm 163,10**
24h	929,30 \pm 54,36	899,30 \pm 46,14	640,80 \pm 59,04*** ^a	482,70 \pm 95,29***	485,30 \pm 127,50***	821,40 \pm 74,10	750,90 \pm 110,20
48h	939,50 \pm 62,42	1.064,00 \pm 21,07	796,80 \pm 92,47 ^a	683,00 \pm 56,91*	755,20 \pm 74,52	1.013,00 \pm 72,58	875,40 \pm 112,00

Tabela 14. Valores de RDW (%) em animais do grupo Controle, I.M. (1 e 3 mg.kg⁻¹), I.P. (1 e 3 mg.kg⁻¹) e S.C. (1 e 3 mg.kg⁻¹). Valores expressos como média ± erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. #*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	I.M. (1 mg.kg ⁻¹)	I.M. (3 mg.kg ⁻¹)	I.P. (1 mg.kg ⁻¹)	I.P. (3 mg.kg ⁻¹)	S.C. (1 mg.kg ⁻¹)	S.C. (3 mg.kg ⁻¹)
6h	12,62 ± 0,18	13,30 ± 0,14	12,76 ± 0,13	13,10 ± 0,32	13,23 ± 0,49	12,40 ± 0,10	12,66 ± 0,24
24h	12,48 ± 0,20	12,54 ± 0,13	12,10 ± 0,22	12,71 ± 0,23	13,05 ± 0,57	12,25 ± 0,11	12,35 ± 0,15
48h	12,94 ± 0,32	13,28 ± 0,17	13,00 ± 0,18	14,80 ± 0,88**	14,02 ± 0,43	12,99 ± 0,30	13,73 ± 0,28

Tabela 15. Valores de glicemia (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg^{-1} , i.m.) e VBj + CA-II ($3 \text{ mg.kg}^{-1} + 1 \text{ mg.kg}^{-1}$, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	82,62 \pm 5,46	80,88 \pm 4,34	71,38 \pm 4,50
24h	100,80 \pm 3,88 [#]	126,30 \pm 3,90**	103,50 \pm 4,37 ^a
48h	100,50 \pm 4,90 [#]	146,50 \pm 6,91***	95,75 \pm 1,42 ^a

Tabela 16. Valores de AST (U.L^{-1}) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg^{-1} , i.m.) e VBj + CA-II ($3 \text{ mg.kg}^{-1} + 1 \text{ mg.kg}^{-1}$, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. # $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	123,60 \pm 4,68	219,60 \pm 7,11***	212,80 \pm 6,75***
24h	130,60 \pm 2,32	258,80 \pm 9,84***	247,70 \pm 7,31***
48h	136,50 \pm 3,28	140,10 \pm 5,95	137,60 \pm 5,31

Tabela 17. Valores de ALT (U.L⁻¹) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg⁻¹, i.m.) e VBj + CA-II (3 mg.kg⁻¹ + 1 mg.kg⁻¹, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. #*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	34,45 \pm 0,77	48,82 \pm 4,59**	33,08 \pm 3,42 ^a
24h	44,25 \pm 3,05 [#]	43,00 \pm 3,70	43,00 \pm 3,81
48h	42,75 \pm 3,01 [#]	34,70 \pm 158	31,33 \pm 1,11*

Tabela 18. Valores de uréia (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg^{-1} , i.m.) e VBj + CA-II ($3 \text{ mg.kg}^{-1} + 1 \text{ mg.kg}^{-1}$, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. # $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	21,63 \pm 1,08	58,63 \pm 3,35***	47,38 \pm 2,39*** ^a
24h	21,96 \pm 0,94	23,25 \pm 0,67	18,17 \pm 1,10
48h	22,80 \pm 1,35	33,13 \pm 2,31***	28,26 \pm 1,26

Tabela 19. Valores de creatinina (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg^{-1} , i.m.) e VBj + CA-II ($3 \text{ mg.kg}^{-1} + 1 \text{ mg.kg}^{-1}$, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	0,40 \pm 0,02	0,80 \pm 0,14***	0,41 \pm 0,01 ^a
24h	0,40 \pm 0,3	0,92 \pm 0,10***	0,40 \pm 0,02 ^a
48h	0,39 \pm 0,03	0,55 \pm 0,03*	0,37 \pm 0,02 ^a

Tabela 20. Valores de ácido úrico (g.dL^{-1}) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg^{-1} , i.m.) e VBj + CA-II ($3 \text{ mg.kg}^{-1} + 1 \text{ mg.kg}^{-1}$, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	1,38 \pm 0,06	1,51 \pm 0,11	1,38 \pm 0,15
24h	1,43 \pm 0,05	2,37 \pm 0,31***	1,95 \pm 0,15**
48h	1,46 \pm 0,11	2,49 \pm 0,20***	1,97 \pm 0,15 ^a

Tabela 21. Valores de creatinoquinase (U.L⁻¹) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg⁻¹, i.m.) e VBj + CA-II (3 mg.kg⁻¹ + 1mg.kg⁻¹, i.m.). Valores expressos como média ± erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#]*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	186,50 ± 14,00	2737,00 ± 747,10***	1017,00 ± 138,50** ^a
24h	195,30 ± 17,89	201,30 ± 34,39	154,90 ± 8,31
48h	202,50 ± 11,47	210,70 ± 50,16	148,80 ± 12,86

Tabela 22. Contagem de leucócitos ($\cdot 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) em animais do grupo Controle, VBj (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.m.) e VBj + CA-II (3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	10,94 \pm 0,46	5,14 \pm 0,29***	7,36 \pm 0,57*** ^a
24h	11,25 \pm 0,55	9,25 \pm 0,54*	8,70 \pm 0,49**
48h	12,69 \pm 0,56 [#]	11,78 \pm 0,44	11,37 \pm 0,92

Tabela 23. Contagem de eritrócitos ($\cdot 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg⁻¹, i.m.) e VBj + CA-II (3 mg.kg⁻¹ + 1 mg.kg⁻¹, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	6,76 \pm 0,16	8,58 \pm 0,22***	7,75 \pm 0,14** ^a
24h	6,18 \pm 0,20	6,39 \pm 0,13	5,98 \pm 0,22
48h	5,84 \pm 0,22 [#]	6,03 \pm 0,11	5,45 \pm 0,14

Tabela 24. Valores de hemoglobina (g.dL⁻¹) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg⁻¹, i.m.) e VBj + CA-II (3 mg.kg⁻¹ + 1 mg.kg⁻¹, i.m.). Valores expressos como média ± erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#]*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	13,21 ± 0,34	15,78 ± 0,35***	14,83 ± 0,15**
24h	12,44 ± 0,30	11,95 ± 0,23	11,52 ± 0,33
48h	11,45 ± 0,31 [#]	11,48 ± 0,22	10,67 ± 0,22

Tabela 25. Valores de hematócrito (%) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg⁻¹, i.m.) e VBj + CA-II (3 mg.kg⁻¹ + 1 mg.kg⁻¹, i.m.). Valores expressos como média ± erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. #*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	41,61 ± 0,69	49,49 ± 1,28***	47,10 ± 0,55**
24h	40,57 ± 1,22	37,22 ± 0,66***	35,22 ± 1,04*
48h	36,67 ± 0,77#	35,15 ± 0,64***	31,25 ± 0,82 ^a

Tabela 26. Contagem de plaquetas ($\cdot 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg⁻¹, i.m.) e VBj + CA-II (3 mg.kg⁻¹ + 1 mg.kg⁻¹, i.m.). Valores expressos como média \pm erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. [#] $p < 0,05$, diferença significativa entre os grupos controle. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a $p < 0,05$, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	923,50 \pm 33,54	548,50 \pm 76,51***	881,50 \pm 56,19 ^a
24h	929,30 \pm 54,36	678,10 \pm 42,56**	704,90 \pm 50,08*
48h	939,50 \pm 62,42	829,20 \pm 60,70	765,20 \pm 58,34

Tabela 27. Valores de RDW (%) em animais do grupo Controle, VBj (3 mg.kg⁻¹, i.m.) e VBj + CA-II (3 mg.kg⁻¹ + 1mg.kg⁻¹, i.m.). Valores expressos como média ± erro padrão e analisados por *two-way* ANOVA e teste *t* de Student. #*p*<0,05, diferença significativa entre os grupos controle. **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001, diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle no mesmo intervalo de tempo. ^a*p*<0,05, diferença significativa dos grupos tratados entre si, no mesmo intervalo de tempo.

Tempo	Controle	VBj	VBj + CA-II
6h	12,62 ± 0,17	12,81 ± 0,10	12,84 ± 0,18
24h	12,48 ± 0,18	12,23 ± 0,13	12,54 ± 0,18
48h	12,94 ± 0,29	12,84 ± 0,13	12,96 ± 0,24

Tabela 28. Valores basais de pressão arterial média e percentuais de redução após tratamento com veneno de *B. jararacussu* em ratos Wistar anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg.kg^{-1}). Resultados expressos como média \pm erro padrão, analisados em relação à dose inferior por ANOVA com $*p < 0,05$.

Grupos	Basal (mmHg)	Redução Máxima		Redução Temporal (%)		
		Valor (%)	Tempo (s)	1'	3'	5'
10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	102,70 \pm 2,81	6,85 \pm 1,79	48,17 \pm 12,97	4,20 \pm 1,47	3,13 \pm 0,61	3,17 \pm 0,46
30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	102,20 \pm 1,54	9,57 \pm 0,83	50,80 \pm 8,39	7,23 \pm 0,74	6,21 \pm 1,41*	5,73 \pm 0,98*
100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	100,80 \pm 1,98	29,62 \pm 2,58*	45,75 \pm 2,02	18,52 \pm 3,46*	12,40 \pm 2,66*	12,19 \pm 4,98
300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	101,30 \pm 2,84	41,44 \pm 6,49	35,17 \pm 2,10*	34,18 \pm 4,62*	21,48 \pm 2,67*	19,30 \pm 3,66

Tabela 29. Valores basais de pressão arterial média e percentuais de redução após tratamento com veneno de *B. jararacussu* e com veneno pré-encubado com CA-II por 15 min a 37°C em ratos Wistar anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg.kg⁻¹). Resultados expressos como média ± erro padrão, analisados por teste *t* de student com **p*<0,05.

Grupos	Basal (mmHg)	Redução Máxima		Redução Temporal (%)		
		Valor (%)	Tempo (s)	1'	3'	5'
VBj 100 µg.kg⁻¹	100,50 ± 1,85	40,73 ± 3,74	32,80 ± 8,26	21,91 ± 3,18	13,77 ± 2,70	11,92 ± 3,17
VBj 100 µg.kg⁻¹ + CA-II 100 µg.kg⁻¹	105,60 ± 1,08	8,42 ± 2,14*	58,00 ± 9,99*	5,44 ± 1,27*	3,56 ± 1,00*	1,74 ± 0,89*

