



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

ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE

INIBIÇÃO DOS EFEITOS LOCAIS DO VENENO DE *Bothrops pauloensis* POR
ALCALÓIDES ESTEROIDAIIS DE *Solanum campaniforme* Roem. & Schult.
(SOLANACEAE).

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

CO-ORIENTADORA: JANAINA SERRA AZUL MONTEIRO EVANGELISTA

Fortaleza

2011

ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE

INIBIÇÃO DOS EFEITOS LOCAIS DO VENENO DE *Bothrops pauloensis* POR
ALCALÓIDES ESTEROIDAIIS DE *Solanum campaniforme* Roem. & Schult.
(SOLANACEAE).

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

ORIENTADORA: HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

CO-ORIENTADORA: JANAINA SERRA AZUL MONTEIRO EVANGELISTA

Fortaleza

2011

J7li Jorge, Roberta Jeane Bezerra

Inibição dos efeitos locais do veneno de *Bothrops pauloensis* por alcalóides esteroidais de *Solanum campaniforme* Roem. & Schult. (Solanaceae) / Roberta Jeane Bezerra Jorge. - 2011.

84 f.: il. Color. Enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós - Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.

Área de Concentração: Farmacologia.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista.

1. Alcalóides de Solanaceas. 2. *Bothrops*. 3. Necrose. 4. Hemorragia.

CDD 615.323952

ROBERTA JEANE BEZERRA JORGE

INIBIÇÃO DOS EFEITOS LOCAIS DO VENENO DE *Bothrops pauloensis* POR
ALCALÓIDES ESTEROIDAIIS DE *Solanum campaniforme* Roem. & Schult.
(SOLANACEAE).

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

Aprovada em: 07/07/2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr^ª. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista (Co-orientadora)
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof^ª. Dr^ª. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais Nádja e Roberto e ao meu irmão Júnior.

AGRADECIMENTOS

A Deus que está sempre ao meu lado abençoando-me.

A minha família pelo constante apoio e incentivo fundamental para minha formação e conquista de mais uma etapa alcançada.

A minha orientadora Dra. Helena Serra Azul Monteiro pela atenção, otimismo e dedicação oferecidas.

A Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista pelo carinho, disponibilidade, apoio e amizade desde minha iniciação científica e monitoria.

Ao meu amigo e companheiro de jornada doutorando Rafael Matos Ximenes pelos conhecimentos compartilhados que foram valiosos para realização deste trabalho e pelo auxílio sempre que precisei.

A profa Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa e a aluna de doutorado Ceiza Menezes por terem cedido as substancias isoladas da planta *Solanum campaniforme* para os testes farmacológicos e a oportunidade de trabalhar em uma nova parceria.

Ao Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama pela contribuição em alguns dos experimentos *in vitro* realizados em seu Laboratório e pelo veneno de *Bothrops pauloensis* cedido.

As companheiras de Jornada Aline Diogo Marinho, Isabel Cristina Oliveira de Moraes e Natacha Teresa Queiroz Alves pela amizade.

Ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra De Menezes pelas análises histopatológicas e amizade.

A todo corpo docente do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, em especial Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, pela atenção fornecida em todos os momentos que busquei.

A Profa Dra Renata de Sousa Alves pela amizade e apoio, em especial ao meu primo e amigo doutorando Antonio Rafael Coelho Jorge pelo companheirismo e apoio.

Aos demais companheiros de jornada do Laboratório de Farmacologia Venenos e Toxinas (LAFAVET), da iniciação científica e pós-graduação que proporcionaram momentos felizes e de crescimento profissional e pessoal.

Aos Funcionários Silvia Helena, Aura Rhanes, Marcia Borges, Jossiê, Bento por toda ajuda.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro

A todos meus amigos pelo companheirismo e presteza.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito”

Martin Luther King

RESUMO

Inibição dos efeitos locais do veneno de *Bothrops pauloensis* por alcalóides esteroidais de *Solanum campaniforme* Roem. & Schult. (Solanaceae). Roberta Jeane Bezerra Jorge e Helena Serra Azul Monteiro. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2011.

Envenenamentos por serpentes são um importante problema de saúde muito difundido em países tropicais. Entre as espécies mais perigosas da América do Sul encontra-se o gênero *Bothrops*. Acidentes ofídicos causados por espécies *Bothrops* podem desenvolver rapidamente dano tecidual local grave, incluindo edema, hemorragia, mionecrose, ulceração de pele e dor. A soroterapia tradicional tem eficácia limitada contra esses efeitos. Compostos naturais isolados de plantas, principalmente a partir de espécies usadas na medicina popular para tratar envenenamentos de serpente, podem ser uma boa alternativa para encontrar novos compostos para melhorar o tratamento do envenenamento e minimizar as sequelas das vítimas. Atividade antiofídica dos novos alcalóides esteroidais: 1 -22,23-epoxi-solanida-1,4,9-trien-3-ona (1), 2-22,23-epoxi-solanida-1,4-dien-3-ona (2) 3-3,9-dihidroxi-22,23-epoxi-9-10-secosolanida-1,3,5(10)-trieno (3) isolados das folhas de *Solanum campaniforme* foram testados através da inibição da atividade fosfolipásica, atividade proteolítica, miotoxicidade, hemorragia e necrose induzidas pelo veneno de *Bothrops pauloensis*. Os três compostos foram capazes de inibir completamente a liberação de creatina quinase de músculos estriados esqueléticos e minimizar as alterações histológicas sem inibir a atividade fosfolipásica A₂ do veneno total de *B. pauloensis*. A inibição da miotoxicidade parece ser independente da atividade catalítica de fosfolipase (PLA₂) e pode estar relacionada à inibição da PLA₂ Lys 49, enzimaticamente inativas, e / ou uma ação indireta sobre metaloproteínas. Houve também, a inibição da atividade proteolítica do veneno em diferentes substratos com os três alcaloides A hemorragia, bem como a necrose de pele, ambas induzidas por metaloproteases presentes no veneno, foram reduzidas na presença dos alcalóides 1 e 2, mas não com o alcalóide 3. A inibição das atividades proteolíticas e a redução dos efeitos hemorrágicos e necrosantes induzidas pelo vBp, principalmente atribuídos aos alcalóides 1 e 2, podem estar associadas com a interação destes compostos com as metaloproteases presentes no veneno e/ou com íons metálicos bivalentes necessários para sua ação.

Palavras-chave: Alcalóides de Solanaceas; *Bothrops*; Necrose; Hemorragia.

ABSTRACT

Inhibition of the local effects of *Bothrops pauloensis* by steroidal alkaloids from *Solanum campaniforme* Roem. & Schult. (Solanaceae). Roberta Jeane Bezerra Jorge and Helena Serra Azul Monteiro. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil, 2011.

Snake envenoming is an important health problem widespread in tropical countries. Among the most dangerous species in South America is the *Bothrops* genus. Snakebites accidents caused by *Bothrops* species quickly develop severe local tissue damage, including swelling, hemorrhage, myonecrosis, skin ulceration and pain. The traditional serum therapy has limited effectiveness against these effects. Natural compounds isolated from plants, mainly from species used in folk medicine to treat snakebite, are a good choice to find new lead compounds to improve the snakebite treatment and minimize the sequelae of the victims. Antiophidic activity of the new steroidal alkaloids: 22-epoxy-solanide-1,4,9-trien-3-one (1), 22-epoxy-solanide-1,4-dien-3-one (2) and 3,9-dihydroxy-22,23-epoxy-9,10-secosolanida-1,3,5(10)-triene (3) isolated from leaves of *Solanum campaniforme* was tested through inhibition of phospholipasic activity, proteolytic activity, myotoxicity, hemorrhage and necrosis induced by *Bothrops pauloensis* venom. The three compounds were able to complete inhibit the creatine kinase release from skeletal muscles and minimize the histological changes, without inhibiting the phospholipasic A2 activity of whole venom. The inhibition of myotoxicity appears to be independent of catalytic activity of phospholipase A2 (PLA2) and may be related to inhibition of PLA2 Lys 49, enzymatically inactive, and / or an indirect action on metalloproteinases. There was also, the inhibition of proteolytic activity of the venom on different substrates with three alkaloids. Hemorrhage as well as skin necrosis, both induced by metalloproteases present in the venom, were reduced in the presence of alkaloids 1 and 2, but not with the alkaloid 3. Inhibition of proteolytic activities and the reduction of hemorrhagic and necrotizing effects induced by vBp, mainly attributed to the alkaloids 1 and 2, may be associated with the interaction of these compounds with the metalloproteases present in the venom and / or divalent metal ions required for their action.

Keywords: Solanaceous Alkaloids; *Bothrops*; Necrosis; Hemorrhage.

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 13 |
| 2.1. | Venenos botrópicos: constituintes, atividades tóxicas e farmacológicas..... | 14 |
| 2.2. | <i>Bothrops pauloensis</i> | 16 |
| 2.3. | Efeitos do envenenamento botrópico e a soroterapia tradicional..... | 19 |
| 2.4. | Plantas e seus compostos isolados antiofídicos para o gênero <i>Bothrops</i> | 22 |
| 2.5. | O gênero <i>Solanum</i> e a espécie <i>Solanum campaniforme</i> | 27 |
| 3. | JUSTIFICATIVA..... | 32 |
| 4. | OBJETIVOS..... | 34 |
| 4.1. | Objetivo Geral..... | 35 |
| 4.2. | Objetivos Específicos..... | 35 |
| 5. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 36 |
| 5.1. | Veneno, substâncias, drogas e reagentes..... | 37 |
| 5.2. | Animais..... | 37 |
| 5.3. | Protocolos experimentais..... | 37 |
| 5.3.1. | Ensaio <i>in vitro</i> | 37 |
| 5.3.1.1. | Atividade da fosfolipase A ₂ | 37 |
| 5.3.1.2. | Atividades Proteolíticas..... | 38 |
| 5.3.2. | Ensaio <i>in vivo</i> | 39 |
| 5.3.2.1. | Atividade miotóxica..... | 40 |
| 5.3.2.2. | Atividade hemorrágica e necrosante..... | 40 |
| 5.4. | Análise Histológica..... | 41 |
| 5.7. | Análise estatística..... | 41 |
| 5.6. | Aspectos Éticos..... | 41 |

6. RESULTADOS

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6.1. | Neutralização das atividades enzimáticas do veneno total de <i>Bothrops pauloensis</i> | 43 |
| 6.2. | Inibição dos efeitos biológicos do veneno total de <i>Bothrops pauloensis</i> | 46 |
| 7. | DISCUSSÃO | 58 |
| 8. | CONCLUSÃO | 68 |
| | REFERENCIAS | 70 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos são um problema de saúde pública em regiões tropicais no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento da América do Sul, África e Ásia, sendo importante causa de morbidade e mortalidade e incluídos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na lista de doenças negligenciadas (HARRISON *et al.*, 2009).

Podem ocasionar sérios problemas à saúde humana, pois 50 a 75% dos 5 milhões de acidentes registrados no mundo por ano, requer tratamento para prevenir a morte, amputações ou sequelas permanentes (OPAS, 2007). Ocasionalmente 50.000 mortes anuais especialmente nas áreas rurais de países tropicais (MOHAPATRA *et al.*, 2011).

No Brasil, ocorrem quatro gêneros de serpentes venenosas, com dezenas de subespécies reconhecidas. Os gêneros *Bothrops* (jararacas) e *Micrurus* (corais) podem ser encontrados em todo o território nacional, enquanto o gênero *Crotalus* (cascavéis) se distribui preferencialmente pelo Sudeste e Sul e as *Lachesis* (surucucus), na região Amazônica e de Mata Atlântica (BÉRNILS, 2009).

Apesar das falhas de notificação, o Sistema Nacional de Notificação de Agravos (SINAN) do Ministério da Saúde calcula que em 2010 ocorreram 29.635 casos de acidentes ofídicos, com uma incidência de 15,5/100.000 habitantes, tendo ocasionado 146 óbitos no país (BRASIL, 2011). A grande maioria destes acidentes é provocada por espécies do gênero *Bothrops* (90,5%), seguido pelo gênero *Crotalus* (7,7%), *Lachesis* (1,4%) e, por fim, as espécies do gênero *Micrurus*, responsáveis por 0,4% dos acidentes notificados (BRASIL, 2001; FRANÇA, 2003).

As serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae, subfamília Crotalinae) são encontradas na América Central e América do Sul, totalizando 28 espécies (BÉRNILS, 2009). Os venenos botrópicos possuem diversas atividades tóxicas, entre elas destacam-se a atividade hemorrágica, proteolítica, coagulante, miotóxica, edematogênica, trombocitopênica e necrosante. As manifestações clínicas podem ser locais e sistêmicas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a; 2009b).

A imunoterapia antiveneno é o único tratamento específico contra o envenenamento por serpentes, sendo eficaz principalmente contra as alterações sistêmicas se administrado em tempo hábil. Todos os anos milhares de pessoas em regiões tropicais são envenenadas, com significativa mortalidade ou morbidade grave ao longo da vida. Infelizmente, o fornecimento de soro antiveneno em muitos países tropicais tem sido extremamente baixo ao longo dos

anos e as trágicas consequências humanitárias e econômicas do tratamento dos envenenamentos representam sérios problemas sobre as comunidades afetadas (BROWN & LANDON, 2010).

Embora a soroterapia seja em geral, clinicamente eficaz no envenenamento sistêmico, existem diversos efeitos adversos do soro antibotrópico, como choque anafilático, reação pirogênica e a doença do soro. Além disso, sua eficácia é limitada contra os efeitos do envenenamento local que se desenvolvem rapidamente após uma mordida, como a dor intensa, edema, hemorragia localizada, e necrose, que muitas vezes resultam em cicatrizes e deformidades permanentes (GOMES *et al.*, 2010).

O uso de plantas medicinais tem sido uma prática eleita ao longo da história humana, cujo conhecimento, reunidos através da experiência de muitas gerações, representa milênios de sabedoria popular, desde os tempos em que a única disponibilidade de recursos medicinais foi obtida a partir do reino vegetal (SOARES *et al.*, 2005). Ainda hoje, indígenas e determinadas comunidades locais utilizam ervas medicinais para curar uma variedade de doenças, incluindo os acidentes ofídicos (GOMES *et al.*, 2010).

Solanum é reconhecido como o maior e o mais complexo gênero da família Solanaceae, que inclui várias espécies de interesse medicinal e econômico (WINK, 2003). Plantas do gênero *Solanum* produzem uma grande variedade de compostos bioativos, sendo os alcalóides esteroidais e glicoalcalóides os mais característicos (NINO *et al.*, 2009). Muitas destas são popularmente conhecidas como “jurubebas”, as quais são largamente utilizadas na medicina popular, especialmente no tratamento de doenças da pele ou doenças relacionadas ao fígado e baço (MATOS, 1999; LORENZI & MATOS, 2008), também como diurético, antiinflamatório, calmante, antiespasmódico e antiepilético, além de terem sido relatadas para o tratamento antiofídico (CHIFUNDERA *et al.*, 1998; LOC & KIET, 2011).

Em vista do exposto, faz-se necessária a busca de agentes alternativos neutralizantes de fontes naturais, bem como de compostos sintéticos, que possam vir a se tornar ferramentas terapêuticas importantes para complementar e melhorar as ações da soroterapia convencional, principalmente frente às alterações locais promovidas pelo envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Venenos botrópicos: constituintes, atividades tóxicas e farmacológicas

Venenos de serpentes são uma mistura complexa de enzimas, glicoproteínas complexas, polipeptídios e componentes não-protéicos sintetizados e armazenados em pares de glândulas altamente especializadas, ligadas as presas por dutos. Os componentes dos venenos permitem que as serpentes possam confinar, imobilizar e digerir suas presas, além de ser um mecanismo de defesa contra predadores (MACKESSY & BAXTER, 2006; CALVETE *et al.*, 2009; ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009).

Após a inoculação, essa mistura de componentes mostra uma rica variedade de ações biológicas, agindo como toxinas e atacando vários sistemas fisiológicos, levando muitas vezes à morte e debilitação da presa ou vítima. As toxinas de serpentes em sua maioria exibem suas atividades farmacológicas por conta própria. No entanto, algumas proteínas formam complexos, covalentes ou não covalentes, com outras proteínas para exibir atividade farmacológica mais potente. Estas interações sinérgicas entre as proteínas do veneno aumentam sua potência letal (DOLEY & KINI, 2009).

Estudos nas últimas duas décadas têm demonstrado que as toxinas dos venenos das serpentes pertencem a superfamílias de proteínas enzimáticas e não-enzimáticas. As proteínas dentro de cada família compartilham semelhanças notáveis em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, mas podem diferir entre si em seus efeitos farmacológicos (ÂNGULO & LOMONTE, 2009; KANG, 2011).

Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade protéica, e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados (BJARNASON & FOX, 1994; KOH, 2006). Em menor proporção, a fração não-protéica dos venenos é composta de substâncias inorgânicas, tais como, cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, colbato e zinco, estando alguns destes componentes relacionados a mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos presentes no veneno. Outros componentes incluem, substâncias orgânicas como aminoácidos livres, pequenos peptídeos, carboidratos, fosfolipídeos e aminas biogênicas (MARKLAND, 1998; WARREL, 2010).

São componentes da fração proteica dos venenos botrópicos as proteínas enzimáticas; Fosfolipase A₂, metaloproteases, serino proteases, L-amino ácido oxidase (LAAO), nucleotidase e fosfodiesterase e as proteínas não-enzimáticas; miotoxinas sem atividade de

fosfolipase, lectinas tipo C, desintegrinas, fatores de crescimento e proteínas secretórias ricas em cisteínas (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009; CAŁKOSINSKI *et al.*, 2010; KANG, 2011).

A superfamília da Fosfolipases A₂ (PLA₂) é composta de muitos grupos diferentes de enzimas que atuam na hidrólise de fosfolípídeos de membrana especificamente na ligação 2-acil éster em uma variedade de fosfolípídeos, resultando na geração de mediadores lipídicos e segundos mensageiros que desempenham funções importantes na regulação das atividades celulares (KINI, 2003; BURKE & DENNIS, 2009).

Encontram-se amplamente distribuídas em tecidos de mamíferos, microorganismos e venenos de répteis e artrópodes. Os venenos das serpentes são abundantes em PLA₂, além de desempenhar um papel digestivo na hidrólise de fosfolípídeos, podem também exercer uma grande variedade de atividades farmacológicas e/ou tóxicas como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorrágica, hemolítica, edema, efeitos pró-coagulantes e anticoagulantes (SOARES & GIGLIO, 2003; SCHALOSKE & DENNIS, 2006; MONTECUCCO *et al.*, 2008).

Venenos de *Bothrops* são ricos em fosfolipases (PLA₂) ácidas e básicas com Asp ou Lys na posição 49 no seu sítio ativo, ambas podem ser encontradas em proporções variáveis, dependendo da espécie (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). PLA₂ Asp49, são assim denominadas por possuírem um resíduo de aspartato na posição 49, estas exibem atividade catalítica. As PLA₂ Lys49 (PLA₂ homólogas), mostram um resíduo de lisina na posição 49 e não exibem atividade catalítica. As PLA₂ enzimaticamente ativas requerem cálcio para a estabilização da conformação catalítica do sítio ligante de cálcio, e o resíduo de Asp na posição 49 é essencial para a ligação do cálcio à proteína, sendo importantes para sua ação de hidrólise dos fosfolípídeos de membrana (LOMONTE *et al.*, 2009).

As isoformas básicas parecem ter adquirido a maior toxicidade, especialmente no caso das enzimas com atividades neurotóxica e miotóxica (FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2010). Todas PLA₂ ácidas purificadas de venenos de serpentes da família Viperidae, até o momento, apresentam um resíduo Asp na posição 49. Estas isoformas ácidas geralmente têm uma maior atividade catalítica do que as PLA₂s básicas Asp49, sobre os substratos convencionais testados *in vitro* (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008). Apesar disso, muitas PLA₂s ácidas não são letais ou mostram uma fraca potência letal em animais experimentais (ARAÚJO *et al.*, DANIELE *et al.*, 1995; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002).

As PLA₂s ácidas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* têm sido pouco exploradas e ainda não estão claramente caracterizadas. Em geral, quando PLA₂ ácidas apresentam atividade miotóxica, esta atividade é reduzida, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em comparação com outras PLA₂ básicas, altamente miotóxicas (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008).

As PLA₂ básicas têm sido comumente referidas como PLA₂ miotóxicas, por mostrarem dano local no músculo esquelético com drásticas alterações degenerativas e mionecróticas dentro de poucos minutos após sua injeção intramuscular em animais experimentais (GUTIERREZ & LOMONTE, 2003).

A neutralização seletiva de PLA₂ básicas pelo uso de anticorpos específicos, quase anula a lesão muscular induzida pelo veneno total de *B. asper*, indicando que estas toxinas são os principais componentes responsáveis pela ação miotóxica do veneno nesta espécie (ÂNGULO & LOMONTE, 2009).

Quando administrados por via endovenosa, as miotoxinas PLA₂ Lys 49 não aumentam os níveis plasmáticos de creatina quinase (CK), uma enzima marcadora de dano muscular esquelético, em contraste com o aumento rápido desses níveis quando injetadas localmente, indicando que elas agem induzindo lesões musculares locais de início rápido (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008).

Agrupamentos de resíduos carregados positivamente (hidrofóbicos) encontrados na superfície de várias proteínas e peptídeos podem interagir com membranas biológicas para formar estruturas com capacidade para penetrar na bicamada lipídica. Nas PLA₂ Lys49, a alça C-terminal apresenta alto conteúdo de resíduos carregados positivamente (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010; MONTECUCCO *et al.*, 2009).

LAAO são flavoenzimas diméricas, glicosiladas, que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de uma vasta gama de L-aminoácidos, para formar alfa-cetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia. O peróxido de hidrogênio parece estar relacionado a toxicidade do veneno (RODRIGUES *et al.*, 2009; NAUMANN *et al.*, 2011). Este grupo de enzimas é responsável pela cor amarela do veneno liofilizado (KANG, 2011).

Os efeitos biológicos destas enzimas durante o envenenamento ainda não estão claramente compreendidos. No entanto, estudos *in vitro* mostram que elas exibem diversas atividades como pró-apoptose, inibição da agregação plaquetária e distúrbios da hemostasia (DOLEY & KINI, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2009; NAUMANN *et al.*, 2011).

As serinoproteases e metaloproteases são complexos da protease que afetam a cascata de coagulação sanguínea e ajudam na digestão das presas, promovendo assim danos teciduais. Embora a maioria delas sejam farmacologicamente ativas por si só, algumas requerem cofatores (Zn^{2+} , Ca^{2+} , fosfolípidos) para exercerem uma atividade ideal (DOLEY & KINI, 2009). Algumas proteases exercem atividade na liberação de cininas que podem contribuir para dor local, vasodilatação e hipotensão sistêmica (CARDOSO *et al.*, 2010).

As desintegrinas são um grupo não-enzimático de moléculas pequenas que se ligam seletivamente a moléculas de integrinas. Possuem domínios ricos em cisteína e lectinas tipo-C, geralmente conjugadas a metaloproteases. Domínios ricos em cisteína são capazes de aumentar o rolamento de leucócitos na microcirculação e inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, contribuindo para os efeitos hemorrágicos. Proteínas com domínios de lectinas tipo C, interagem com receptores destas em plaquetas e estão envolvidas na indução de distúrbios da coagulação como atividades hemaglutinantes, agregação plaquetária e inibição da atividade da trombina (CALVETE *et al.*, 2005).

2.2 *Bothrops pauloensis*

A serpente de *Bothrops pauloensis* (Figura 1) conhecida popularmente como jararaca-pintada pode ser encontrada em todo território brasileiro, principalmente em zonas rurais e periféricas de grandes cidades das regiões Sul e Sudeste, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Bothrops pauloensis foi descrita primeiramente por Amaral (1925) como *Bothrops neuwiedi pauloensis* como uma das 12 subespécies de *B. neuwiedi*. (RODRIGUES *et al.*, 2009). Após uma revisão sistemática do complexo *B. neuwiedi*, as 12 subespécies deste complexo, resultaram em sete subespécies distintas e aceitas pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (BÉRNILS, 2010). Um último estudo realizado por Fenwick *et al.*, (2009) baseados em características morfológicas e moleculares evidenciadas por informações filogenéticas, classificaram a *B. pauloensis* e outras nove espécies do gênero, como *Bothropoides pauloensis*.

O veneno de *Bothrops pauloensis* (*B. pauloensis*), de acordo com os compostos isolados até o momento, tem mostrado uma variedade de fosfolipases, principalmente miotóxicas: BnSP-6 e BnSP-7 (PLA₂ miotóxica Lys49), Bp-PLA₂ (PLA₂ ácida miotóxica

Asp49), BnpTX-I e BnpTX-II (PLA₂ básicas miotóxicas Asp49) e Bp-12 (PLA₂ Lys49), além de outras frações como Bp-LAAO (LAAO), BpSP-I (serinoprotease trombina-like) e neuwiedase (metaloprotease).

Rodrigues e colaboradores, (1998) isolaram e caracterizaram as PLA₂ mitóxicas BnSP-6 e BnSP-7, mostrando alta similaridade com miotoxinas Lys49 de outros venenos botrópicos. A BnSP-7 apresentou atividades anticoagulante, mionecrosante e edematogênica (RODRIGUES *et al.*, 1998), bactericida (contra *Escherichia coli*), bloqueio de contração neuromuscular, ruptura de lipossomas cálcio independentes (SOARES *et al.*, 2000), dano tecidual local e regeneração tardia, com aumento da produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias, além do aumento da expressão de metaloproteinases de matriz do tipo 2 e 9 (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

BnpTX-I mostrou efeitos neurotóxicos e bactericida (contra *E. coli*), além de apresentar atividades anticoagulante, mionecrosante, edematogênica, citotóxica contra mioblastos/miotúbulos, comuns também para a toxina BnpTX-II (RODRIGUES *et al.*, 2004). Em um estudo anterior Borja-Oliveira e colaboradores (2003) haviam mostrado com o veneno total de *B. pauloensis* um efeito neurotóxico com ação pré-sináptica.

A Bp-12, PLA₂ enzimaticamente inativa, apresentou alta homologia com outras fosfolipases de venenos botrópicos contendo lisina na posição 49, e foi responsável tanto diretamente quanto indiretamente, pelo bloqueio na junção neuromuscular em preparação de nervo frênico-diafragma (RANDAZZO-MOURA *et al.*, 2008).

Indução de agregação plaquetária, atividade hemolítica, edema intenso, miotoxicidade com abundante infiltrado leucocitário e dano muscular após 24 horas de injeção, foram reportadas para a fração enzimaticamente ativa Bp PLA₂ (Rodrigues *et al.*, 2007).

A Bp-LAAO, isolada por Rodrigues e colaboradores (2009) exibiu atividades antitumoral contra as linhagens de câncer de mama (SKBR-3), células leucêmicas T agudas (Jurkat) e tumor ascítico de Erlich (ETA), bactericida diante das cepas de *E. coli* (gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (gram positiva) e leishmanicida frente *Leshimania ssp* (*L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. major*) com efeitos dose - dependentes.

Uma alta atividade coagulante e calicreína – símile, foram mostradas para a BpSP-I. Em contrapartida, esta serinoprotease trombina – símile não apresentou atividade hemorrágica e miotóxica, apenas edema moderado em doses mais elevadas (COSTA *et al.*, 2009).

A neuwiedase, caracterizada bioquimicamente por Rodrigues e colaboradores (2000), mostrou alterações hematológicas (aumento ou redução de elementos figurados do sangue periférico) e hemostáticas (fibrinogênólise e atividade coagulante), hemorragia pulmonar na presença de altas doses desta fração e ausência de alterações teciduais locais após envenenamento sistêmico (IZIDORO *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2001).

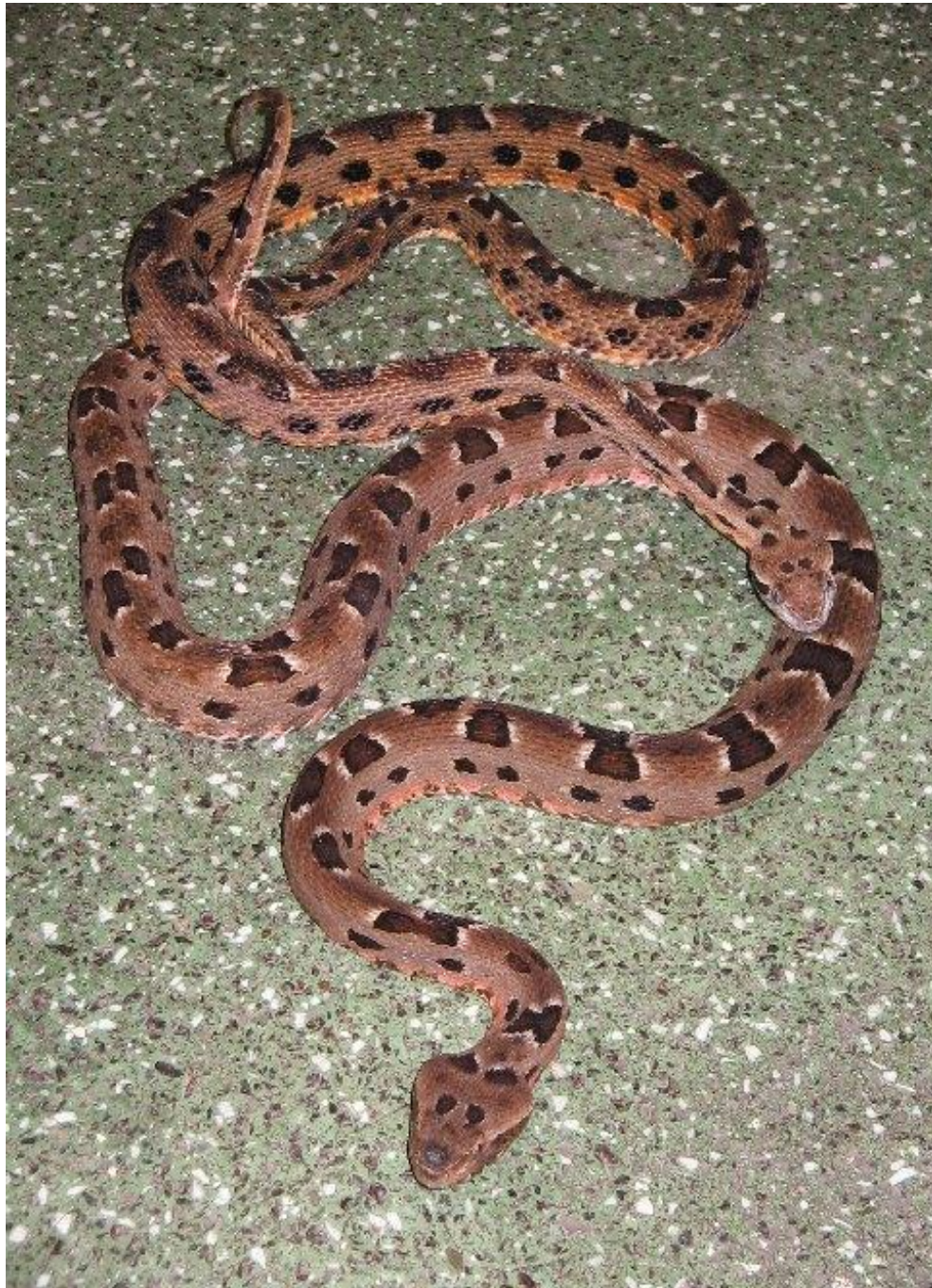


Figura 1. Macho de *Bothrops pauloensis* sobre a fêmea durante a corte

Fonte: <http://www.incttox.com.br/destaque/ciclo-reprodutivo-das-serpentes-fase-i/>

2.3 Efeitos do envenenamento botrópico e a soroterapia tradicional

A peçonha botrópica é extremamente complexa e compreende uma variedade de substâncias farmacologicamente ativas que atuam sinergicamente na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento, responsáveis pelo desenvolvimento de lesões locais e sistêmicas, e alterações no local do acidente que se desenvolvem rapidamente após o envenenamento (GOMES *et al.*, 2010).

Os efeitos locais frequentemente incluem dor, edema, hemorragia local e inflamação. Este quadro clínico na maioria das vezes evolui resultando em necrose tecidual (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). Efeitos sistêmicos resultam em coagulopatia, hipotensão arterial, alterações hemodinâmicas, hemólise intravascular, dano agudo do miocárdio, edema pulmonar, insuficiência renal aguda, falência de múltiplos órgãos e hemorragias distantes dos locais da picada, tais como hemorragia gengival, macrohematúria, hemorragia uterina e gastrintestinal (KAMIGUTI *et al.*, 1996; WARRELL, 2005).

Uma das complicações que traz grande preocupação nos acidentes ofídicos são as alterações renais, como glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda e insuficiência renal aguda (IRA), esta última relacionada aos casos de letalidade pelo envenenamento (SITPRIJA, 2008). A patogênese da IRA ainda não está completamente elucidada. No entanto, sabe-se que as lesões renais podem ser produzidas pela ação isolada ou combinada de diferentes mecanismos isquêmicos e/ou nefrotóxicos desencadeados pelas atividades biológicas dos venenos no organismo (PINHO *et al.*, 2000; GRISOTTO *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2008). Estudos com rim isolado demonstraram que, os venenos de diferentes espécies de *Bothrops* alteram os parâmetros da função renal (HAVT *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2005).

No entanto, a lesão tecidual local é um dos grandes problemas após envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* (Figura 2). A magnitude destes efeitos depende do tipo de peçonha, da quantidade injetada e do hospedeiro. Em muitos casos, o dano tecidual é tão intenso que leva a severas consequências como degeneração vascular e isquemia, as quais podem culminar com a amputação do membro afetado (NISHIOKA *et al.* 1992; WARRELL, 2010).



Figura 2. Alterações locais promovidas por acidentes com *Bothrops*. A: Edema, sangramento e equimose em mão esquerda (OLIVEIRA, 2008); B: Sangramento eritematoso e edema no tornozelo direito (OROPEZA *et al.*, 2000); C: Equimose, bolhas e edema em pé direito; D: necrose tecidual grave em perna direita (WHO, 2007).

Mionecrose e hemorragia induzidas por venenos de *Bothrops* são provavelmente devido, principalmente, à ação direta de toxinas nas células musculares e microvasos, respectivamente. Por outro lado, o edema depende da direta ação dos componentes do veneno na microvasculatura, bem como sobre a liberação de um número de mediadores inflamatórios nos tecidos, tais como eicosanóides, aminas vasoativas, citocinas entre outros (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Mesmo tendo sido feito avanços importantes para o entendimento da patogênese da hemorragia e mionecrose no envenenamento por *Bothrops*, o estudo das alterações

patológicas induzidas por estes venenos na lesão tecidual local tem recebido pouca atenção, apesar de sua relevância clínica (JIMENEZ *et al.*, 2008).

O tratamento eficaz para envenenamento botrópico sistêmico é a administração intravenosa de soro antibotrópico, e em alguns casos, de antiveneno botrópico-crotálico (CORREA-NETTO *et al.*, 2010). Os antivenenos são preparados por hiperimunização de animais, principalmente cavalos e ovelhas (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009). A soroterapia neutraliza de forma eficiente os efeitos tóxicos sistêmicos, impedindo muitas vezes vítimas fatais. Administração imediata de antiveneno adequado para pacientes sistemicamente envenenados melhora a taxa de recuperação da coagulopatia em diversos estudos de pacientes envenenados por *Bothrops* em países sul-americanos e asiáticos (CARDOSO *et al.*, 1993; CARON *et al.*, 2009).

No entanto, os antivenenos apresentam desvantagens, tais como: induzir reações adversas, variando de leves a graves, e ser ineficaz na neutralização do dano tecidual local (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009c). As reações adversas podem variar em 37 a 87% dos casos (CARDOSO *et al.*, 1993; CRUZ *et al.*, 2009) e podem incluir reações anafiláticas leves com náuseas, vômitos e urticária e efeitos mais graves como angioedema, broncoespasmo e hipotensão (BROWN & LANDON, 2010; CARDOSO *et al.*, 1993; CARON *et al.*, 2009), que não podem ser previstos por meio de testes de sensibilidade (FAN *et al.*, 1999; PREMAWARDHENA *et al.*, 1999). A maioria dessas reações pode ser devido à ação de altas concentrações de proteínas presentes em imunoglobulinas hiperimunes disponíveis no antiveneno (GOMES *et al.*, 2010).

Além da administração do antiveneno, o tratamento também pode incluir uma série de intervenções adicionais, tais como a manutenção do líquido corporal, equilíbrio de eletrólitos e bom fluxo urinário; além de administração do toxóide tetânico, diálise, alcalinização precoce da urina por bicarbonato de sódio em pacientes com mioglobínúria ou hemoglobínúria; antibióticos em caso de desenvolvimento de infecção local e intervenções cirúrgicas no debridamento do tecido necrosado (CRUZ *et al.*, 2009).

Outros problemas são a baixa disponibilidade do tratamento em áreas distantes, os atrasos na administração, necessidade de refrigeração, e de alto custo e baixa eficácia (CRUZ *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009c). Além disso, a variabilidade inter e intra-específica na composição do veneno entre as espécies devem também ser consideradas, uma vez que

existem variações entre os períodos de tempo no ano, idade da amostra e distribuição geográfica, que podem afetar a neutralização do antiveneno (CALVETE *et al.*, 2009).

O uso de extratos de plantas como antídoto para venenos de animais é uma opção antiga de muitas comunidades, que não têm acesso rápido a soroterapia. Além disso, dependendo do tempo entre o acidente e o tratamento, a capacidade do anti-soro para neutralizar os efeitos locais do envenenamento pode ser apenas parcial (SOARES *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2010).

Devido a esses fatores, tratamentos alternativos para picada de serpente estão sob investigação, e os extratos vegetais, principalmente os já utilizados na medicina popular, constituem uma rica fonte de moléculas com diversas propriedades farmacológicas (MORS *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2005). Vários estudos têm mostrado que extratos de diferentes plantas são capazes de neutralizar os efeitos tóxicos dos venenos de serpente. Porém, muitos deles ainda carecem do conhecimento do mecanismo de ação de suas propriedades antiofídicas (MORS *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2010).

2.4 Plantas e seus compostos isolados antiofídicos para o gênero *Bothrops*

Várias plantas são usadas popularmente contra os acidentes ofídicos e muitos estudos buscam validar suas propriedades antiofídicas a partir do isolamento e caracterização de componentes que são capazes de inibir as propriedades enzimáticas, farmacológicas e tóxicas dos venenos de diferentes serpentes. Apesar do número considerável de extratos de plantas que foram encontrados para neutralizar o veneno de *Bothrops*, apenas alguns princípios ativos têm sido isolados e caracterizados a nível estrutural e funcional (Tabela 1).

Tabela 1. Fitocompostos ativos contra veneno de serpentes do gênero *Bothrops*

| Fitocompostos | Especies | Atividade Testada | Referências |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| Diterpeno clerodano | <i>Baccharis trimera</i> | PLA ₂ , H, F, Cs, M, E | JANUÁRIO <i>et al.</i> , 2004 |
| Bredemeyeroside B e D | <i>Bredemeyera floribunda</i> | L | DAROS <i>et al.</i> , 1996; PEREIRA <i>et al.</i> , 1998 |
| Edunol | <i>Brongniartia podalyroides</i> | L | REYES-CHILPA <i>et al.</i> , 1994 |

| | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------------|--|
| Derivados do ácido elálgico | <i>Casearia sylvestris</i> | PLA ₂ , M, E | DA SILVA <i>et al.</i> , 2008 |
| Ácido Rosmarínico (CF) | <i>Cordia verbenacea</i> | E, M | TICLI <i>et al.</i> , 2005 |
| Ar-turmerone | <i>Curcuma longa</i> | E, H, N | FONSECA <i>et al.</i> , 2004; MELO <i>et al.</i> , 2005; |
| Wedelolactona e demetilwedelolactona | <i>Eclipta prostrata</i> | PLA ₂ , H, E, M, Cd | DIOGO <i>et al.</i> , 2009; MELO <i>et al.</i> , 1994; MELO <i>et al.</i> , 2010 |
| Harpalicina I | <i>Harpalyce brasiliiana</i> | PLA ₂ , P, M | DA SILVA <i>et al.</i> , 2004 |
| Cabenegrinas A-I e A-II | Cabeça de negro <i>Harpalyce brasiliiana</i> | Cd, L, M, ES | NAKAGAWA <i>et al.</i> , 1982 XIMENES, 2009 |
| Macrolobinas A e B | <i>Pentaclethra maculoba</i> | H, F, C, M | DA SILVA <i>et al.</i> , 2007 |
| 4-nerolidilcatecol | <i>Piper peltatum</i> <i>Piper umbellatum</i> | PLA ₂ , M, E, Cs, P | NÚÑEZ <i>et al.</i> , 2005 |

Nota: C: coagulante; Cd: Cardiotoxica; Cs: Caseinolítica; D:desfibrinante; E: Edema; ES: Efeitos sistêmicos; F: Fibrinogenolítica; PLA₂: fosfolipásica A₂; H: Hemorrágica; L: Letalidade; M: Miotóxica; N: Necrose Pl: Plaquetopenia; P:Proteolítica.

A *Baccharis trimera* (Asteraceae), conhecida como carqueja possui um potencial efeito anti-oxidante, inibindo o efeito hemorrágico, a atividade proteolítica, o edema e a miotoxicidade induzida pelo veneno de algumas espécies do gênero *Bothrops*. Este efeito parece ser pela inativação primária de metaloproteases e miotoxinas presentes nestes venenos (BERNARD *et al.*, 2001).

Posteriormente, Januario e colaboradores (2004) identificaram o diterpeno clerodano, o Bt-CD, nomeado 7 α -hidroxi-3,13-clerodadiene-16, 15:18,19 -diolide, como o componente ativo isolado de *B. trimera* que exibiu propriedades anti-proteolítica e anti-hemorrágica contra venenos de serpentes botrópicas. Bt-CD apresentou inibição completa da hemorragia e proteólise causada por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pirajai*). Este inibidor foi capaz de neutralizar a atividade hemorrágica, fibrinogenolítica e caseinolítica de metaloproteases isoladas de

B. neuwiedi e *B. jararacussu*. Bt-CD também inibiu parcialmente o edema e miotoxicidade induzidas pelo veneno de *B. jararacussu* e suas miotoxinas isoladas (BthTX-I e II).

Uma saponina triterpenóide, nomeada bredemeyeroside B (β -D-xylopyranosyl-(1-4)-[β -D-apiofuranosyl-(1-3)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-3)]- β -D-fucopyranoside), foi isolada das raízes de *Bredemeyera floribunda* (Polygalaceae) e apresentou atividade contra a letalidade de veneno de serpentes botrópicas em camundongos (DAROS *et al.*, 1996). Outra saponina triterpenóide identificada como bredemeyeroside D (β -D-xylopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-3)]- α -D-fucopyranoside), isolada da mesma planta, também mostrou uma significativa redução da letalidade promovida pelo veneno de *B. jararaca* (PEREIRA *et al.*, 1998).

Um pterocarpano prenilado, edunol, isolado de *Brongniartia podalyrioides* e *B. intermédia* (Leguminosae), plantas utilizadas no México contra acidentes ofídicos, reduziu a mortalidade de ratos quando injetado via intraperitoneal imediatamente após a injeção de veneno de *B. asper* pela mesma via (REYES-CHILPA *et al.*, 1994).

A estrutura molecular e propriedades do edunol, isolado de *Brongniartia* são semelhantes aos relatados para cabenegrinas A-I e A-II (DA SILVA *et al.*, 2004), pterocarpanos isolados da planta chamada Cabeça de Negro, não identificada botanicamente pelos fabricantes do extrato utilizado na preparação do antídoto oral fabricado e vendido no norte e nordeste do Brasil e disponível para os trabalhadores das plantações (NAKAGAWA *et al.*, 1982). Ximenes (2009) demonstrou que a Cabenegrina A-II foi eficiente em bloquear a maioria dos efeitos bioquímicos, hematológicos e pressóricos promovidos pelo veneno de *B. jararacussu* em ratos.

O extrato da planta *Harpalyce brasiliiana* Benth, também é usado no nordeste do Brasil contra picadas de serpente e seu composto isolado harpalycina 1 (4'-desidrôxi-cabenegrina A-I), erroneamente chamada de edunol, apresentou propriedades antimiotóxica, antiproteolíticas e antifosfolipásica contra a peçonha de *B. jararacussu* (DA SILVA *et al.*, 2004).

O extrato aquoso das folhas de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), popularmente conhecida no Brasil como "guaçatonga" foi capaz de inibir as atividades anticoagulante, hemorrágica, edematogênica e miotóxica exercidas por vários venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e suas toxinas PLA₂ purificadas (BORGES *et al.*, 2000), além de neutralizar a

atividade hemorrágica, coagulante e proteolítica induzidas por cinco venenos botrópicos (*B. asper*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pirajai*) e três metaloproteínas (BaP1 e BH4 de *B. asper* e Bn2 de *B. neuwiedi*) (BORGES *et al*, 2001).

O extrato hidroalcoólico das folhas *C. sylvestris* inibiu o bloqueio neuromuscular causado pela miotoxina bothropstoxina-I (BthTX-I) de *B. jararacussu* em preparações isoladas de nervo frênico-diafragma em ratos (OSHIMA-FRANCO, 2005). Posteriormente, Cavalcante e colaboradores (2007), identificaram que o extrato aquoso das folhas da mesma planta, também inibiu o dano muscular e as atividades de bloqueio neuromuscular induzidas por serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararacussu*, *B. pirajai* e *B. moojeni*) e suas toxinas PLA₂ Lys49 (BthTX-I, piratoxina-I e miotoxina II) em preparações de nervo frênico-diafragma em camundongos.

Em estudo semelhante, além da inibição da mionecrose e o bloqueio neuromuscular em camundongos através do veneno total de *B. jararacussu* e sua miotoxina Lys49 isolada (BthTX-I), o extrato metanólico das folhas de *C. sylvestris*, potencializou a secreção de acetilcolina, sugerindo uma inibição do bloqueio pré-sináptico da toxina (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al*, 2008).

Da Silva *et al.* (2008), ao buscarem a elucidação do modo de ação da *C. sylvestris* sobre os efeitos dos venenos botrópicos, isolaram o ácido elágico e três de seus derivados (ácido elágico 30-O-metil, ácido elágico 3,30-di-O-metil e ácido elágico 3-O-metil-30, 40 - metilenodioxí) como inibidores da atividade fosfolipásica, edematogênica e miotóxica do veneno de *B. jararacussu* e sua miotoxina BthTX-II (PLA₂ Asp 49).

Ticli e colaboradores (2005) analisaram os possíveis efeitos de neutralização do extrato metanólico *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) sobre o veneno de *Bothrops jararacussu* e suas principais fosfolipases A₂ (BthTX-I e II). Os autores isolaram o ácido rosmarínico como substância mais ativa contra os efeitos edematogênicos e miotóxicos do veneno e suas frações.

Santos e colaboradores (2003) demonstraram o efeito benéfico do extrato aquoso da *Curcuma longa* na prevenção da necrose em cães envenenados com *Bothrops alternatus*. Outros pesquisadores utilizaram a aplicação tópica do extrato concentrado de *C. longa* e *Kalanchoe brasiliensis* em diferentes tempos mostrando bons resultados na redução de edema, halo hemorrágico e prevenção de necrose causada pelo veneno de *B. alternatus* (FONSECA *et al*, 2004).

Estudos com um composto isolado da *C. longa*, o ar-turmerone, mostrou que este foi capaz de abolir a atividade hemorrágica do veneno botrópico em ratos. Segundo os autores, o ar-turmerone age como um inibidor enzimático das enzimas proteolíticas e hemorrágicas de *B. jararaca*, possui ação antitoxinas e promove uma inativação química, estando envolvido também em mecanismos imunológicos (FERREIRA *et al*, 1992). Em outro estudo Melo e colaboradores (2005) mostraram que a aplicação tópica de ar-turmerone em coelhos foi eficaz na inibição da evolução do edema, necrose e hemorragia local após envenenamento com *B. alternatus*.

O extrato aquoso de *Eclipta prostrata* e seu constituinte isolado (wedelolactona) foram capazes de neutralizar as atividades miotóxicas, proteolíticas e hemorrágicas dos venenos de *B. jararacussu*, de *B. jararaca* e suas toxinas isoladas BthTX-I e bothropasina, respectivamente. (MELO *et al*, 1994). Em outro estudo, além da wedelolactona, outro coumestano isolado de *E. prostrata* identificado como demetilwedelolactona inibiram a atividade miotóxica induzida por PLA₂ Asp49 básicas (BthTX-II e BthA-I-PLA₂) isoladas do veneno de *B. jararacussu* (DIOGO *et al*, 2009). Melo e colaboradores (2010) mostraram que um coumestano sintético derivado da wedelolactona inibiu os efeitos cardiotoxicos edematogênicos e miotóxicos dos venenos de *B. jararacussu* e *B. jararaca*.

O extrato aquoso de *Pentaclethra macroloba* (Fabaceae) promoveu inibição total das atividades hemorrágica e nucleolítica e inibição parcial dos efeitos miotóxicos, fosfolipásicos, edematogênicos e letais induzidos por vários venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. asper*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. pirajai*, *B. moojeni* *B. neuwiedi*) e suas toxinas isoladas (DA SILVA *et al*, 2005).

Da Silva e colaboradores (2007), identificaram saponinas triterpenóides chamadas de macrolobinas A e B, como os componentes ativos isolados da *P. macroloba* capazes de neutralizar as atividades hemorrágica, fibrinogenolítica e proteolítica promovidas por metaloproteases de classe PI e P-III isoladas de *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*. Estes componentes também promoveram inibição parcial das atividades coagulantes e fibrinogenolítica induzidas por *B. jararacussu* e sua enzima trombina-símile (BjussuSP-I) e as atividades fosfolipásicas e miotóxicas promovidas pelo veneno de *B. jararacussu* e suas PLA₂ básicas (BthTX-I e BthTX-II).

Preparações de treze plantas da família Piperaceae foram descritas por serem amplamente utilizadas na medicina popular, da Colombia, como neutralizantes de venenos de

serpentes (OTERO *et al* 2000a). Em outro segmento do estudo os autores identificaram que apenas o extrato etanólico das folhas e ramos de *Piper arboreum*, promoveu redução parcial da atividade hemorrágica do veneno de *B. asper* (OTERO *et al*, 2000b).

Núñez e colaboradores (2005) isolaram e identificaram o 4-nerolidilcatecol como componente responsável pelo efeito inibidor dos extratos metanólicos de *Piper umbellatum* L. e da *Piper peltatum* L. frente às atividades fosfolipásica (inibição total), miotóxica e edematogênica (inibição parcial) da miotoxina I (PLA₂ Asp49) isolada do veneno de *B. asper*.

2.5 O gênero *Solanum* e a espécie *Solanum campaniforme*

A família Solanaceae, a qual o gênero *Solanum* pertence, é uma família que contém muitos dos vegetais e frutas essenciais à alimentação, sendo composta por aproximadamente 106 gêneros, contendo 2300 espécies (AGRA *et al.*, 2009). É amplamente distribuída por toda região tropical e de clima temperado no mundo, com centros de diversidade ocorrentes nas Américas Central e do Sul, bem como na Austrália e na África, com menor frequência na Europa e na Ásia (EDMONDS *et al.*, 1997; WINK, 2003). Esta família inclui frutas e legumes de importância econômica, como por exemplo: batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), berinjela (*Solanum melongena*), pimentos, plantas ornamentais, como Petúnia (*Petúnia spp.*) e os jasmims (*Solanum jasminoides*), e outras plantas medicinais como a *Atropa belladonna* L. (beladona), *Datura stramonium* L. (datura), e *Hyoscyamus niger* L. (meimendo negro) (JAIN *et al.*, 2011).

Solanum L. é o maior gênero de Solanaceae, com cerca de 1400 espécies (BOHS, 2005). Este gênero é bem representado no Brasil, sendo amplamente distribuído de Norte a Sul em diversas regiões fitogeográficas (SILVA *et al.*, 2006). O nome genérico *Solanum* é geralmente considerado ser derivado do latim solari – consolar ou aliviar – que se refere aos efeitos calmantes ou sedativos associados a muitas de suas espécies (EDMONDS *et al.*, 1997). No Brasil, são encontradas cerca de 350 espécies, muitas das quais são comumente conhecidas como “jurubeba” e amplamente utilizadas na medicina popular (BRAGA, 2001; SILVA *et al.*, 2008).

Dentre as diferentes espécies da família das Solanaceas, várias do gênero *Solanum* possuem a reputação popular de apresentarem propriedades farmacológicas. Na medicina popular tanto a parte aérea como a raiz são utilizadas em diferentes preparações. Dependendo

da cultura local e das espécies de *Solanum* existem variadas indicações, tais como: afecções do aparelho respiratório (tosse, gripe, bronquite, asma), Doenças Sexualmente Transmissíveis (gonorréia, sífilis), afecções nos olhos (conjuntivite; glaucoma, catarata), afecções de pele (verrugas, queimaduras, micoses, erisipela), verminoses, diabetes, úlcera, febre, dor, inflamação, reumatismo, alergias, hepatite, convulsão, agitação, cólicas abdominais e renais, hemorróidas, aumento da diurese e aumento de fertilidade em mulheres, cicatrização e no tratamento de acidentes com animais peçonhentos (LORENZI, 1991; MATTOS-FILHO, 1997; RODRIGUES, 2001; AMIR & KUMAR, 2004; LORENZI & MATOS, 2008; JAIN *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm relatado importantes atividades biológicas de interesse terapêutico do extrato e de compostos isolados das várias espécies do gênero *Solanum* como, por exemplo: citotóxica (SUN *et al.*, 2010), antitumoral, antiinflamatória, antipirética, antioxidante, hepatoprotetora, diurética (JAIN *et al.*, 2011), antiulcerogênica (MALLIKA; SHYAMALA, 2006), moluscicida (SILVA *et al.*, 2008), anti-helmíntica (JARALD *et al.*, 2008), antifúngica, antiviral, leishmanicida (NINO *et al.*, 2009), antinociceptiva (PANDURANGAN *et al.*, 2010), antimicrobiana (LÔBO *et al.*, 2010), hipoglicemiante (KAR, 2006), anti-dislipidêmica (GONÇALVES *et al.*, 2006), anticonvulsiva e antihipertensiva (RIVERO *et al.*, 2002).

Quimicamente o gênero é caracterizado por produzir uma grande variedade de metabólitos secundários estruturalmente diversificados e complexos, tais como, compostos fenólicos, principalmente flavonas e flavonóis, incluindo seus heterosídeos, saponinas esteroidais, licoalcalóides, glicoalcaloides e alcalóides esteroidais (IKEDA *et al.*, 2003; HALE *et al.*, 2008). Estes últimos, além de serem os principais responsáveis pela resistência natural das espécies em seu ecossistema (FRIEDMAN, 2006), são os principais responsáveis pela maioria dos efeitos terapêuticos encontrados (WINK, 2003; FUKUHARA *et al.*, 2004; DISTL; WINK, 2009).

Solanum campaniforme (*Solanum campaniforme* Roem. & Schult.) é um arbusto popularmente conhecido como “jurubeba brava” (Figura 3), o qual é encontrado em todas as regiões brasileiras, sendo no Nordeste, distribuído nos estados do Maranhão, Ceará, Paraíba e Pernambuco (STEHMANN *et al.*, 2010). As plantas deste gênero destacam-se pela capacidade de biossintetizar esteróides e alcalóides, livres ou na forma de heterosídeos (PINTO *et al.*, 2011).

Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes tipicamente como aminas primárias, secundárias ou terciárias. Isso normalmente confere basicidade ao alcalóide, facilitando seu isolamento e purificação, uma vez que sais solúveis em água podem ser formados na presença de ácidos minerais (WINK, 2003). Os alcalóides esteroidais compartilham em geral das propriedades de outros grupos de alcalóides, ou seja, são compostos naturais básicos, que na sua forma livre são solúveis em solventes orgânicos, e seus sais são solúveis em água (IKEDA *et al.*, 2003; DISTL; WINK, 2009).



Figura 3. *Solanum campaniforme* Roem. & Schult.

Fonte: Prof Dr. Edilberto R. Silveira - Departamento de Química - UFC

O estudo fitoquímico das folhas de *S. campaniforme* permitiu o isolamento e caracterização estrutural de três alcalóides esteroidais de esqueleto solanidano: 1 -22,23-epoxi-solanida-1,4,9-trien-3-ona (1), 2-22,23-epoxi-solanida-1,4-dien-3-ona (2) 3-3,9-dihidroxi-22,23-epoxi-9-10-secosolanida-1,3,5(10)-trieno (3). Embora este tipo de esqueleto seja comum em espécies de *Solanum*, os alcalóides 1-3 estão sendo registrados pela primeira vez na literatura (Figura 4).

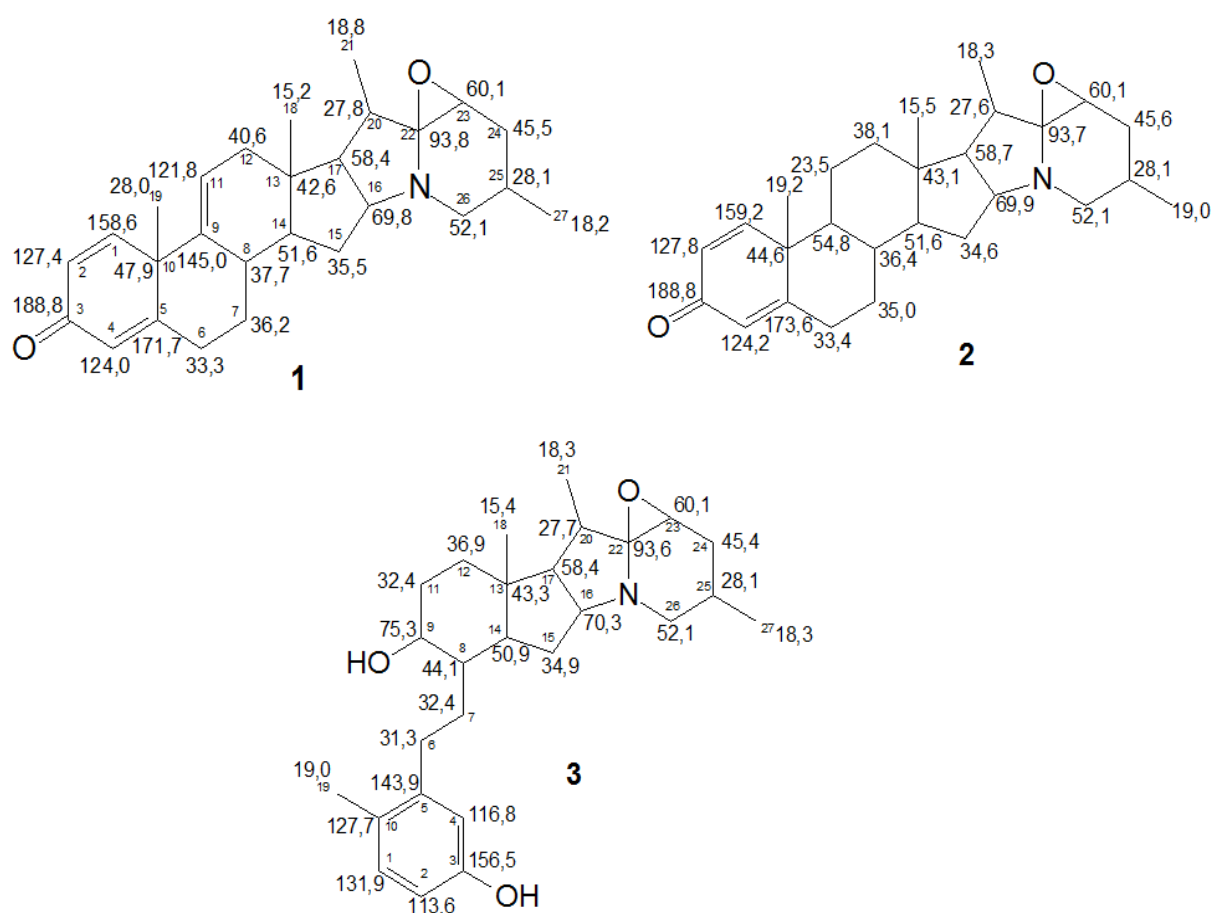


Figura 4. Alcalóides esteroidais isolados da *Solanum campaniforme* (1-3).

Fonte: Prof^ª. Dr^ª Otilia Deusdênia Loiola Pessoa - Departamento de Química - UFC

Alcalóides esteroidais são essencialmente análogos de nitrogênio de saponinas esteróides, como a diosgenina, que é um precursor de hormônios esteróides e antiinflamatórios esteroidais. A estrutura dos alcalóides esteroidais é semelhante ao dos glicocorticóides. Os alcalóides esteroidais de esqueleto solanidano possuem em geral uma cadeia lateral que cicliza-se formando dois anéis fundidos, com um átomo de nitrogênio como cabeça de ponte (MILNER *et al.*, 2011).

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

Apesar do tratamento convencional baseado na soroterapia ser, na maioria dos casos, eficiente na neutralização das alterações sistêmicas, a neutralização do dano tecidual local não é alcançada de maneira eficaz, principalmente por causa do rápido desenvolvimento da lesão tecidual após o envenenamento. Além disso, o atraso em atingir os centros de saúde onde o antiveneno está disponível, contribui muito para a limitação da eficácia do antiveneno.

Em vista disso, é importante a busca de novos inibidores de veneno, seja sintético ou de fonte natural, para complementar a soroterapia tradicional, principalmente a partir de plantas utilizadas na medicina popular.

É reportado o uso popular de espécies do gênero *Solanum* como antiofídico, porém não há estudos que confirmem esta atividade em nenhuma espécie. Portanto são relevantes estudos que possam validar ou não este efeito.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Estudar o efeito inibitório de alcalóides esteroidais isolados da *Solanum campaniforme* frente às alterações locais promovidas pelo veneno da serpente *Bothrops pauloensis* *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos dos alcalóides esteroidais de *Solanum campaniforme* frente as atividade fosfolipásica e proteolítica (*in vitro*) do veneno de *Bothrops pauloensis*;
- Avaliar os efeitos dos alcalóides esteroidais de *Solanum campaniforme* frente às atividades miotóxica, hemorrágica e necrosante (*in vivo*) do veneno de *Bothrops pauloensis*;

MATERIAIS E MÉTODOS

5. Materiais e Métodos

5.1. Veneno, substâncias, drogas e reagentes

O veneno de *Bothrops pauloensis* foi cedido pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama da Universidade Paulista Julio Mesquita (UNESP).

Os três alcalóides esteroidais isolados das folhas de *Solanum campaniforme* foram cedidos pela Profa Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará (UFC). As folhas de *S. campaniforme* foram coletadas no município de Guaramiranga, Ceará - Brasil, em outubro de 2007, e identificadas pelo professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da UFC. Uma exsicata (n ° 41038) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra da UFC.

Todos os substratos e reagentes utilizados neste trabalho foram pró-análise e obtidos de fornecedores credenciados (Sigma[®], EUA).

5.2. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (18-22 g) obtidos no biotério central (BIOCEN) da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Os cuidados com os animais de experimentação estão de acordo com o Guia para Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH, publicações 85-23, revisado em 1996) e com regulamentação brasileira recentemente aprovada.

5.3. Protocolos experimentais

5.3.1. Ensaios *in vitro*

5.3.1.1. Atividade da fosfolipase A₂

A atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) foi mensurada seguindo o protocolo descrito por Cotrim e colaboradores (2011) em placas de 96 poços, utilizando o ácido 4-nitro-3-

octanoiloxi-benzóico (4N3OBA, Biomol, EUA) como substrato. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 2mg/ml tanto de veneno total de *Bothrops pauloensis* (vBp) quanto para os três alcalóides previamente incubados (por 30 minutos a 37 ° C) e não incubados com o veneno. O experimento foi conduzido utilizando uma razão de 1:1 (peso:peso / VBp : Alcalóides 1-3). As amostras foram solubilizadas em dimetil sulfóxido DMSO-PBS a 10%. A curva padrão do ensaio foi composta da adição de 200 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), 20 µL de substrato (4N3OBA), 20 µL de água e 20 µL de amostra para um volume final de 260 µL. Como branco aplicam-se todos os componentes, exceto as substâncias de estudo. A atividade da enzima, expressa como a velocidade inicial da reação (V₀), foi calculada com base no aumento da absorbância após 20 minutos de incubação da reação enzimática. Todos os ensaios foram realizados com absorbância em 425nm, lidos em intervalos de 5 min, usando um leitor de placas Spectramax 340 multiwell (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Uma unidade de atividade enzimática é definida como quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de cromóforo por minuto. A atividade específica é dada pela relação entre a unidade enzimática (em nmol/min) e o teor de proteína (em mg).

5.3.1.2. Atividades Proteolíticas

a) Atividade proteolítica sobre a Azocaseína

Atividade proteolítica foi determinada usando-se a azocaseína (Sigma-Aldrich[®], EUA) como substrato (ESCALANTE *et al.*, 2006). Para o estudo de inibição, utilizou-se uma razão de 1:1 e 1:3 (peso:peso / vBp : Alcalóides 1-3). As substâncias de estudo foram dissolvidas na solução tampão de 25 mM Tris, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, com pH 7,4. Adicionou-se 20 µL da solução do veneno (2 mg/mL) ou do veneno pré-incubado (37°C por 30 min) com cada alcalóide (10 µL da solução do veneno [4 mg/mL] e 10 µL da solução do inibidor [4 ou 12 mg/mL] a 180 µL da solução de azocaseína (5 mg / mL). Após incubação por 90 min a 37 ° C a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 5%. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. O Sobrenadante (150 µL) foi transferido para a placa de 96 poços e logo após, adicionou-se 150 µL de NaOH 0,5M. O branco não conteve as amostras em estudo. A atividade proteolítica foi quantificada em leitora de microplacas para ELISA Asys Hightech, modelo Expert Plus e as absorbâncias foram

medidas a 450 nm. Uma unidade de atividade proteolítica é correspondente a um aumento de 0,2 na absorbância (por quantidade de veneno).

b) Ensaio com N α -benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA)

O substrato cromogênico sintético N α -BENZOIL-DL-ARGININA *p*-NITROANILIDA (DL-BAPNA) foi utilizado para a determinação da inibição da atividade proteolítica dos alcalóides (1-3) pré-incubados com o vBp. Este substrato tem sido empregado para medir a atividade amidásica para enzimas proteolíticas, tais como tripsina, quimiotripsina, fator Xa, calicreína plasmática humana, trombina e plasmina humana. Neste substrato, peptídeos derivados de *p*-nitroanilida, têm sido amplamente utilizados principalmente pela alta sensibilidade fotométrica na absorbância de 410 nm da *p*-nitroanilida liberada após hidrólise enzimática, segundo o método de Erlanger e colaboradores (1961) modificado para leitora de microplacas de 96 poços (PONCE-SOTO *et al.*, 2007).

O DL-BAPNA foi usado em uma solução 0,1 M para dosagem das frações (1 mg/mL); 20 μ L da amostra foram colocados em um meio de incubação que contém 1000 μ L de uma solução de substrato previamente dissolvido em DMSO 1% como solução estoque para ser utilizado na proporção de 1/10 (10 μ L) em tampão (Tris-HCl, 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.8) mais 250 μ L de tampão para um volume final de 1270 μ L. Após 30 minutos, a reação foi bloqueada com ácido acético 30% (500 μ L). O ensaio foi realizado em triplicata e a reação lida a uma absorbância de 410 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Uma unidade de atividade (U) é expressa como μ moles de *p*-nitroanilida liberados por minuto. Os resultados foram expressos em percentual de proteólise.

5.3.2. Ensaio *in vivo*

5.3.2.1. Atividade miotóxica

A atividade miotóxica foi avaliada através da determinação dos níveis de atividade da enzima creatina quinase (CK) plasmática em diferentes tempos e através de análise histológica.

Para realização deste método, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (controle, vBp, vBp + 1, vBp + 2 e vBp + 3) com 30 animais cada para posterior coleta de sangue nos tempos de 2, 4, 8, 24 e 48 horas. Os animais receberam injeções

intramusculares no músculo gastrocnêmio direito de 50 µL de solução contendo 50 µg de veneno de vBp. Estudos de inibição foram realizados injetando-se 50 µL de uma solução mista, composta de 50 µg de vBp e 50 µg de cada alcalóide, dissolvido em DMSO 1% em PBS (pH 7,2). Antes da injeção, as misturas contendo vBp e os inibidores foram previamente incubadas por 30 min a 37 ° C. Os controles negativos receberam apenas 50 µL de 1% DMSO-PBS.

Após os animais serem anestesiados com halotano, as alíquotas de sangue foram colhidas com auxílio de capilares heparinizados através do plexo retro-orbital, em intervalos de 2-48 horas. Após cada coleta de sangue os animais foram eutanasiados. Amostras dos músculos foram retiradas e preparadas para posterior análise histológica.

O plasma foi separado por centrifugação a uma temperatura de 4 °C, a 3500 r.p.m. por 15 minutos. A atividade de CK foi determinada com auxílio de um KIT de dosagem sérica de CK (CK-NAC – Labtest Diagnóstica®), utilizando-se 0,02mL de amostra e 1mL de reagente incubados por 3 minutos a 37°C e realizando-se leituras a 340 nm após 5 minutos.

A atividade foi expressa em U / L, com uma unidade correspondente à produção de 1 µmol de NADH por minuto a 37 ° C. Mede-se fotometricamente a velocidade de redução do NADP⁺ a NADPH, cuja concentração é diretamente proporcional à atividade da CK no plasma.

5.3.2.2. Atividade hemorrágica e necrosante

Camundongos machos Swiss (18-22 g, n = 10) foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg / kg, ip), para terem seu dorso tricotomizado onde foi injetado por via intradérmica 50 µL de uma solução contendo 50 µg de vBp. Para os testes de neutralização, 50 µL de uma solução mista composta de 50 µg de vBp e 50 µg de cada alcalóide, dissolvido em DMSO 1% em PBS (pH 7,2) foram utilizadas. Antes da injeção, as misturas contendo vBp e os inibidores foram previamente incubadas por 30 min a 37 ° C. Controles negativos receberam 50 µL de 1% DMSO-PBS. Após 2 h, cinco animais foram eutanasiados, as peles dorsais removidas e as superfícies internas foram examinadas, fotografadas e separadas para histologia. As imagens foram analisadas utilizando o software Image Tool 3.00 (University of Texas Health Science Center, San Antonio; <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). A intensidade da área hemorrágica foi determinada pela equação: $I = A \times (N - H)$, onde I é a intensidade da área hemorrágica, A a área hemorrágica foi medida em mm², N a intensidade de cor média não-hemorrágico pele e H é a intensidade de cor média na área hemorrágica,

conforme descrito por Esmeraldino e colaboradores (2005). Após 72 h, os outros cinco animais foram eutanasiados e o mesmo procedimento foi feito. Áreas de necrose foram expressas em mm².

5.4. Análise Histológica

Depois da devida fixação dos tecidos (pele e músculo gastrocnêmio) em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas, foram realizados cortes transversais atingindo toda a espessura do fragmento e eleitos dois cortes para serem colocados em cassetes histológicos (PROPHET *et al.*, 1992). O material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser então desidratado em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento, realizou-se a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina foi cortado em 4 µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada pelo patologista Dr. Dalgimar Beserra de Menezes e posteriormente foram registradas através de fotomicrografias.

5.5. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± SEM. A significância das diferenças entre as médias foi avaliada por uma análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, quando os grupos experimentais foram comparados com o grupo controle. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5.6. Aspectos Éticos

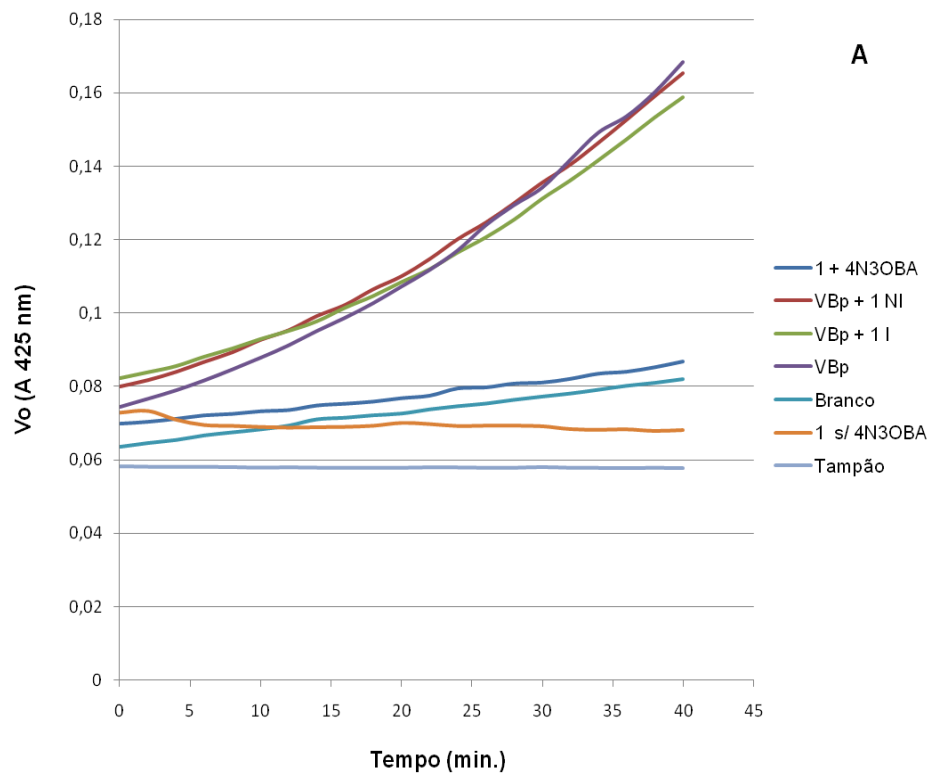
O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará (CEPA).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Neutralização das atividades enzimáticas do veneno total de *Bothrops pauloensis*

A Figura 5 mostra a atividade PLA₂ do veneno total de *Bothrops pauloensis* (vBp) utilizando o ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico (4N3OBA) como substrato diante dos tratamentos com cada um dos alcalóides (1-3). Após incubação com cada alcalóide na razão de 1:1, nenhum deles apresentou inibição da atividade enzimática do veneno.



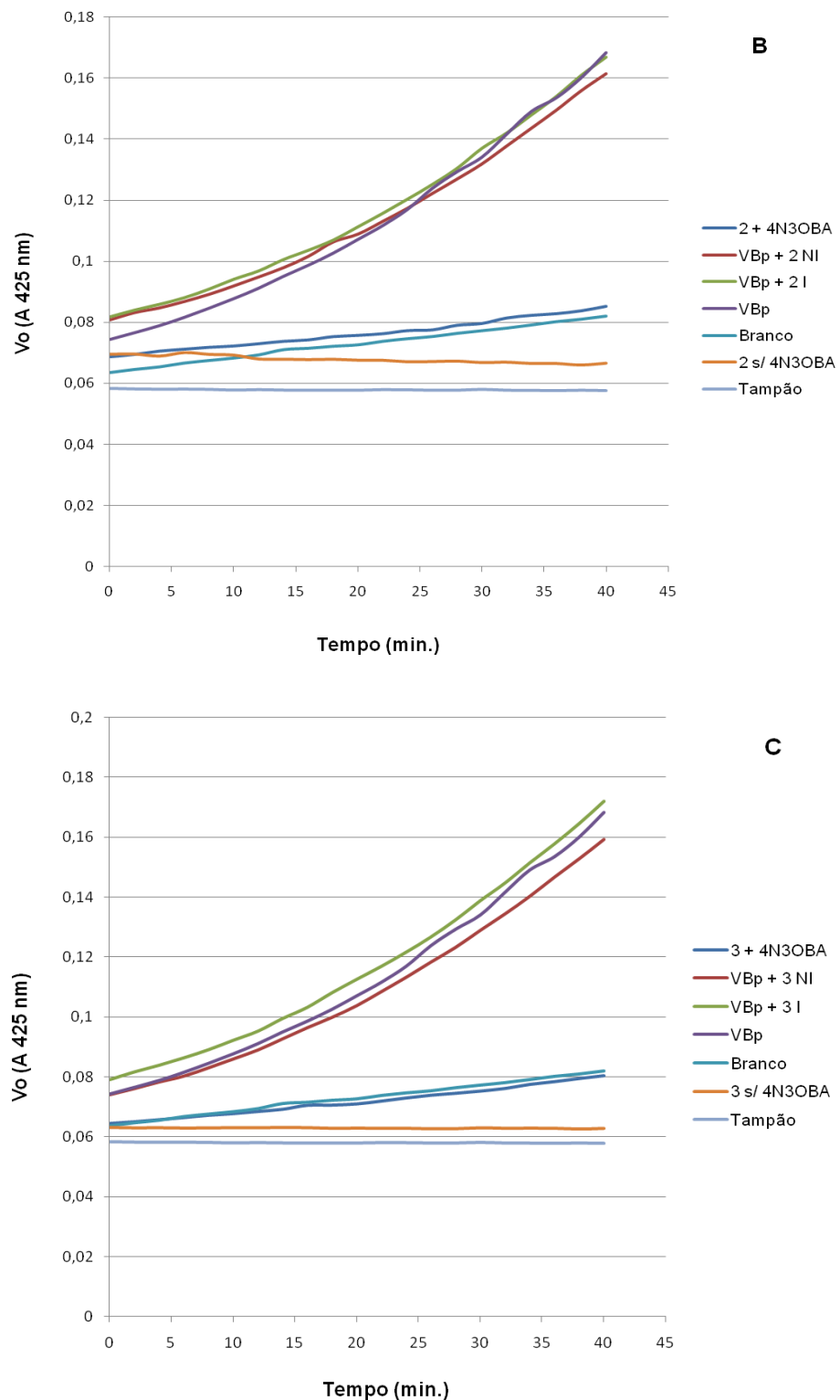


Figura 5. A inibição da atividade enzimática foi analisada utilizando o 4N3OBA como substrato com absorbância em 425 nm e a um intervalo de 5 minutos. VBp : Alcalóides 1, 2 e 3 (Figuras 5A, 5B e 5C) não mostraram diminuição da atividade enzimática do veneno. Nota: Tampão (reação só com a solução tampão sem substrato e alcalóide), Branco: reação só com o substrato 4N3OBA, 1, 2 ou 3 s/4N3OBA (alcalóide sem o substrato 4N3OBA), 1, 2 ou 3 + 4N3OBA (alcalóide com o substrato 4N3OBA), VBp (veneno total de *Bothrops pauloensis*), VBp + 1, 2 ou 3 NI (veneno total de *Bothrops pauloensis* não incubado com o alcalóide), VBp + 1, 2 ou 3 I (veneno total de *Bothrops pauloensis* previamente incubado com o alcalóide).

As atividades proteolíticas induzidas pelo vBp tanto sobre a azocaseína quanto sobre o DL-BApNA, foram inibidas pelos três alcalóides. O vBp teve sua atividade diminuída sobre a azocaseína (Figura 6) em ambas razões (1:1 e 1:3), com dados semelhantes. A atividade proteolítica do veneno de *B. pauloensis* sobre o DL-BApNA (Figura 7) foi de 100%, após incubação os alcalóides 1, 2 e 3 inibiram essa atividade em 92%, 80% e 75% respectivamente.

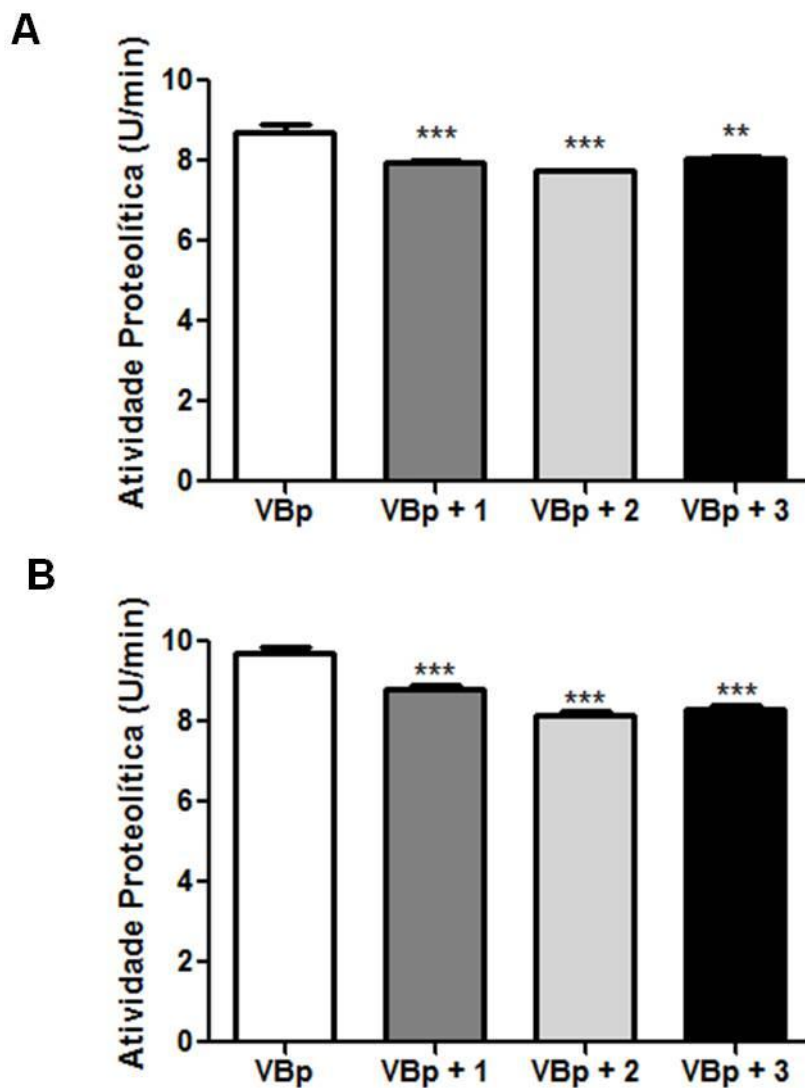


Figura 6. Inibição da atividade proteolítica dos compostos 1-3 isolados da *S. campaniforme* contra o vBp sobre a azocaseína. A e B: Atividade Proteolítica na razão 1:1 e 1:3 respectivamente, calculados em unidades por minuto (U/min). Resultados expressos como média \pm S.E.M. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett com nível de significância de * $p < 0,05$.

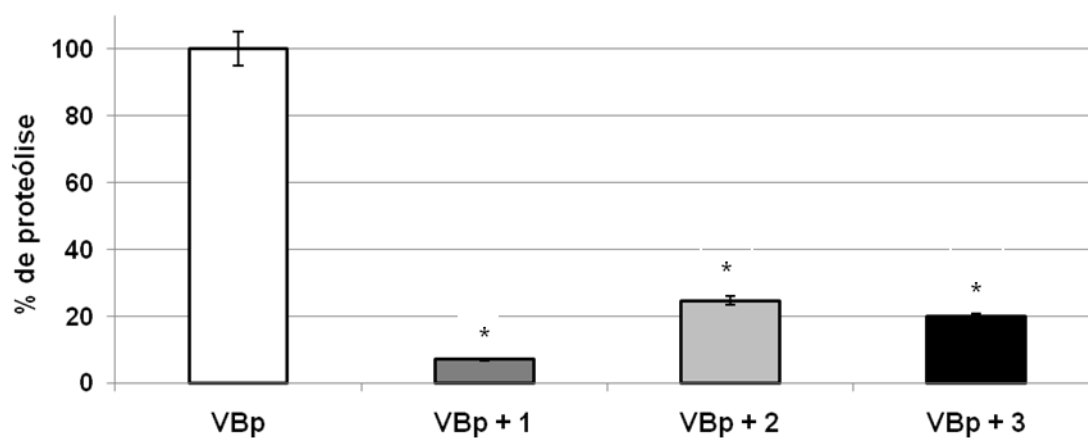


Figura 7. Inibição da atividade proteolítica dos compostos 1-3 isolados da *S. campaniforme* contra o vBp sobre o DL-BAPNA. Atividade Proteolítica na razão 1:1, calculados em percentual de proteólise (%). Resultados expressos como média \pm S.E.M. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett com nível de significância de * $p < 0,05$.

6.2. Inibição dos efeitos biológicos do veneno total de *Bothrops pauloensis*

A atividade antimiotóxica dos compostos 1-3, testadas contra vBp, está mostrado na Figura 8. Quando o veneno foi administrado sozinho, a atividade de creatina quinase (CK) plasmática aumentou após 2, 4 e 8 horas, retornando aos níveis normais após 24 e 48 horas de administração intramuscular (i.m.). Quando o veneno foi pré-incubado com cada alcalóide, a atividade plasmática de CK permaneceu em níveis normais. Realizou-se análise histológica nos tempos em que houve inibição dos níveis de CK alterados com a administração do veneno.

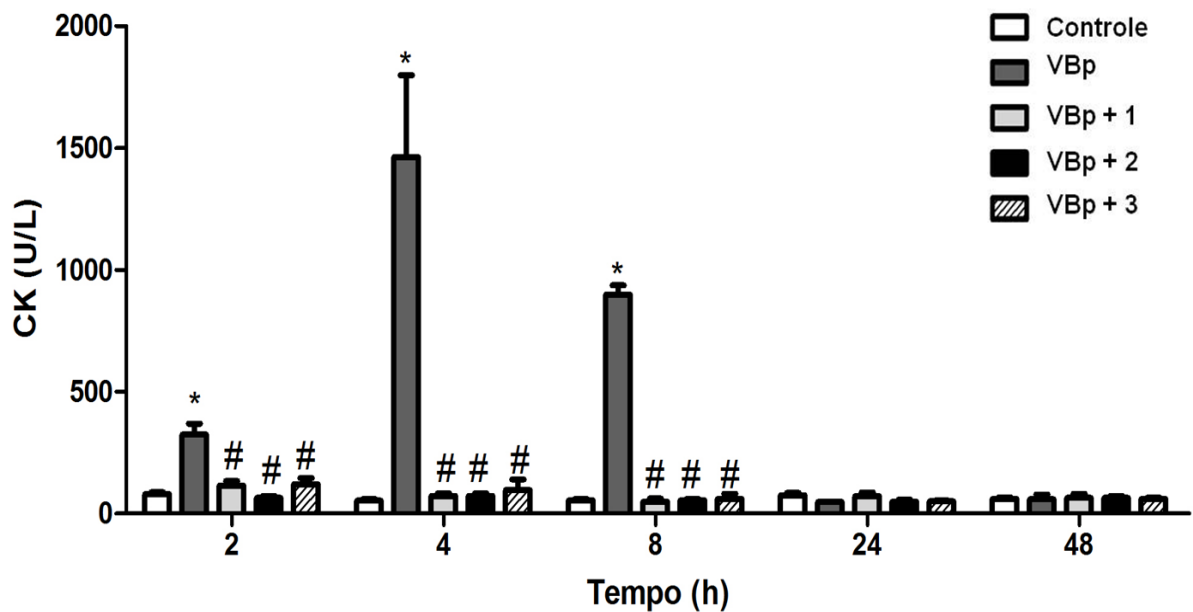


Figura 8. Inibição da atividade miotóxica do vBp pelos compostos 1-3 da *S. campaniforme*. Atividade da creatina quinase (CK) plasmática é mostrada em unidades por litro (U/L). Resultados expressos como média \pm S.E.M. *Significância em relação ao grupo controle, # significância em comparação com o grupo VBp (controle positivo). A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett com nível de significância de * $p < 0,05$.

A análise histopatológica do tecido muscular estriado esquelético coletado nos tempos de 2, 4 e 8 horas, (Figuras 9, 10 e 11) revelou ausência de alterações nos grupos controle (PBS), porém, hemorragia intensa, fibras musculares em degeneração difusa, dissociação das fibras evidenciando a presença de edema e infiltrado inflamatório discreto a moderado nos grupos com o vBp.

Em todos os grupos com o veneno pré-incubado com cada alcalóide (1-3) era presente hemorragia em menor escala, fibras musculares em degeneração e regeneração focal e com infiltrado inflamatório discreto a moderado, as alterações foram menores com o decorrer do tempo.

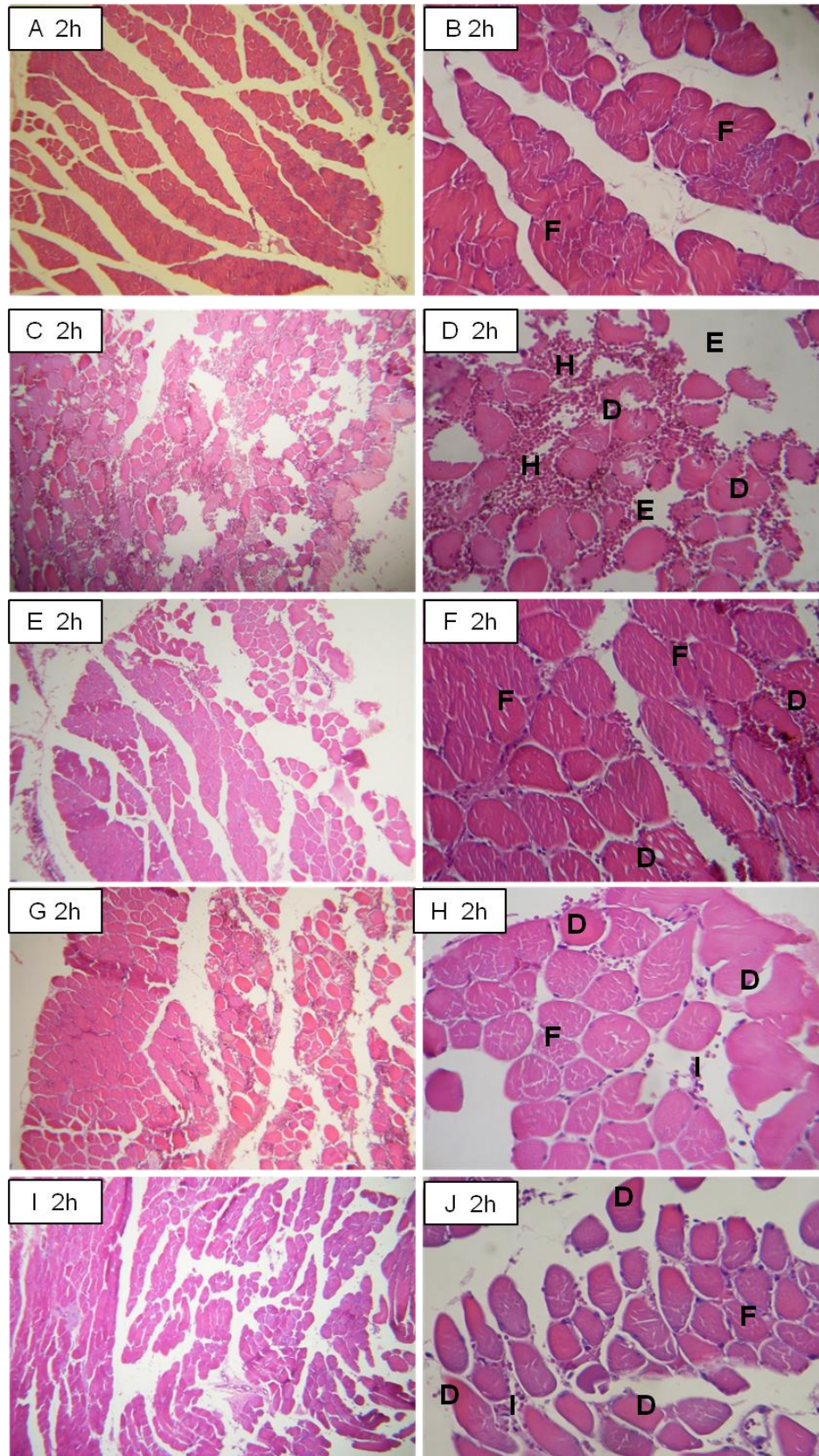


Figura 9: Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 µm de espessura músculo esquelético gratoenemio direito de camundongo Swiss após 2 horas de administração i.m. 50 µL dos tratamentos. A e B: PBS; C e D: VBp (50 µg/ 50 µL); E e F: VBp + 1 (1:1); G e H: VBp + 2 (1:1) e I e J: VBp + 3 (1:1). Aumentos respectivos de 100 X e 400X. **F**= fibra muscular normal, **H**= hemorragia, **E**= edema, **I**= infiltrado inflamatório, **D**= fibras em vários estágios degenerativos. Coloração: H/E.

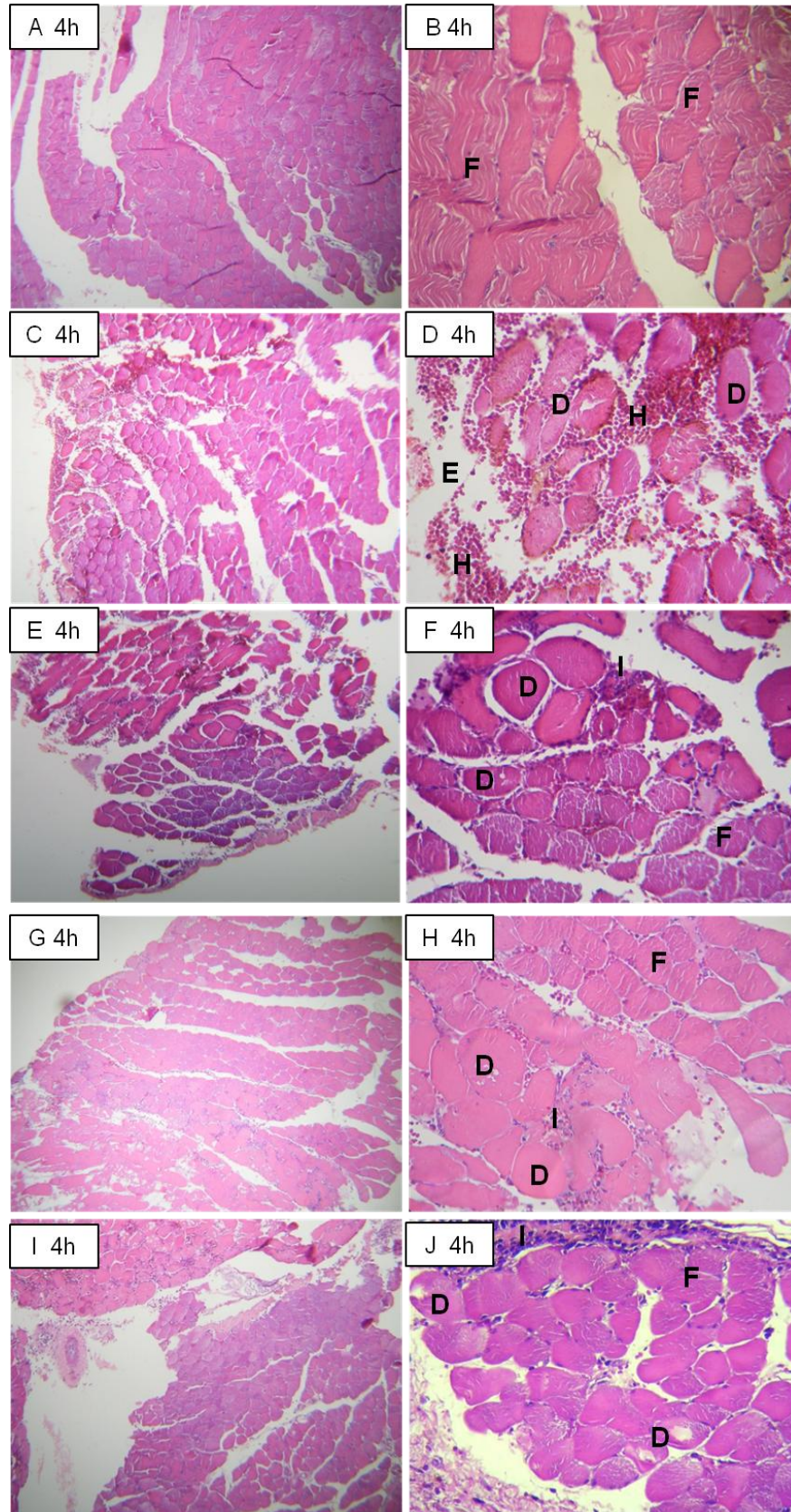


Figura 10: Fotomicrografia de luz de uma seção transversal de 4 μ m de espessura músculo estriado esquelético gratoenemio direito de camundongo Swiss após 4 horas de administração i.m 50 μ L dos tratamentos. A e B: PBS; C e D: VBp (50 μ g/ 50 μ L); E e F: VBp + 1 (1:1); G e H: VBp + 2 (1:1) e I e J: VBp + 3 (1:1). Aumentos respectivos de 100 X e 400X. **F**= fibra muscular normal, **H**= hemorragia, **E**= edema, **I**= infiltrado inflamatório, **D**= fibras em vários estágios degenerativos. Coloração: H/E.

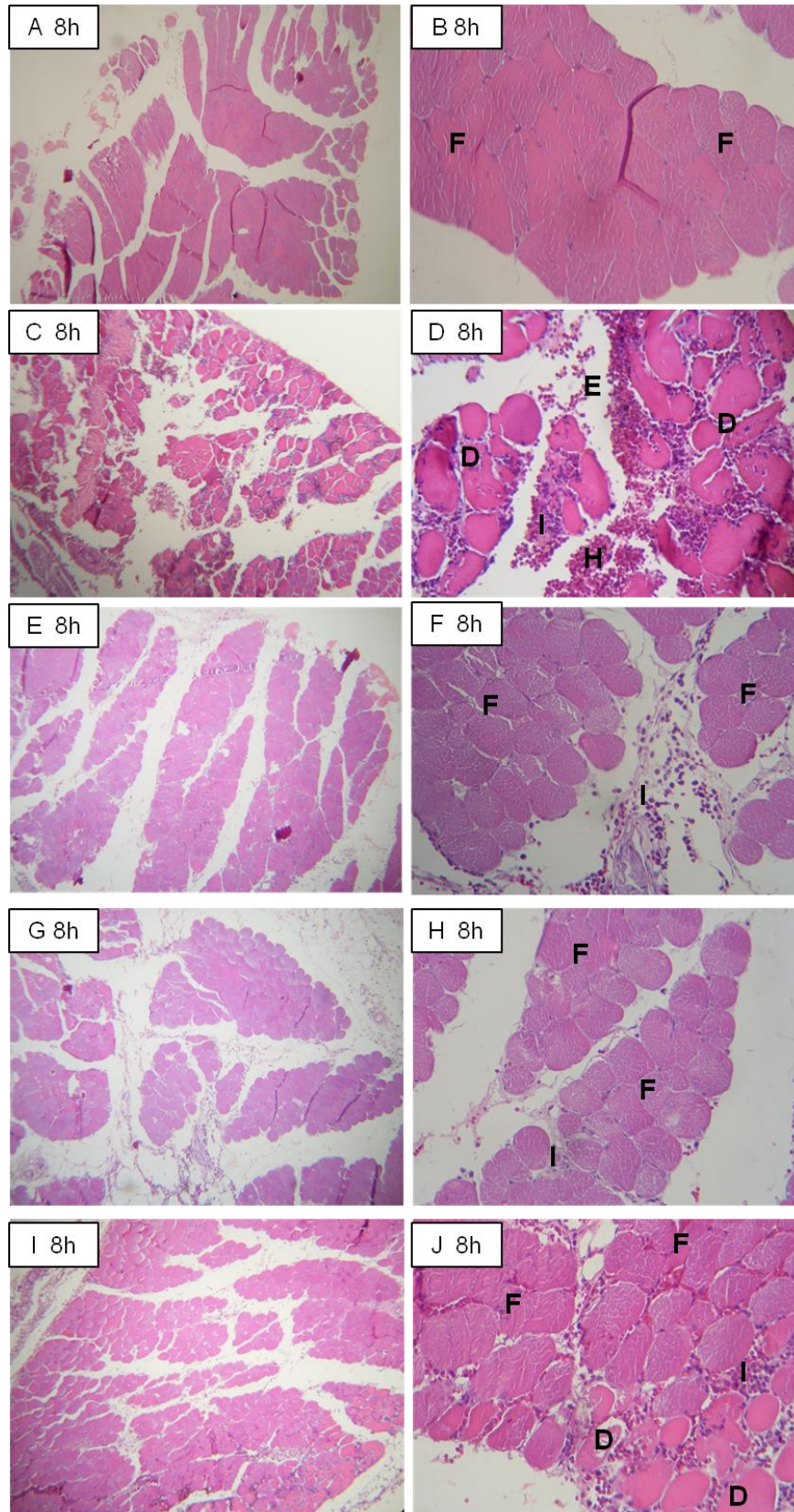


Figura 11: Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 µm de espessura músculo estriado esquelético gratoenemio direito de camundongo Swiss após 8 horas de administração i.m 50 µL dos tratamentos. A e B: PBS; C e D: VBp (50 µg/ 50 µL); E e F: VBp + 1 (1:1); G e H: VBp + 2 (1:1) e I e J: VBp + 3 (1:1). Aumentos respectivos de 100 X e 400X. **F**= fibra muscular normal, **H**= hemorragia, **E**= edema, **I**= infiltrado inflamatório, **D**= fibras em vários estágios degenerativos. Coloração: H/E.

Na figura 12 são mostradas as imagens das superfícies internas da pele dorsal de camundongos, injetadas intradermicamente (i.d.) com os tratamentos, para medição da intensidade e área hemorrágica após 2 horas e área da necrose após 72 horas, para a posterior análise histológica.

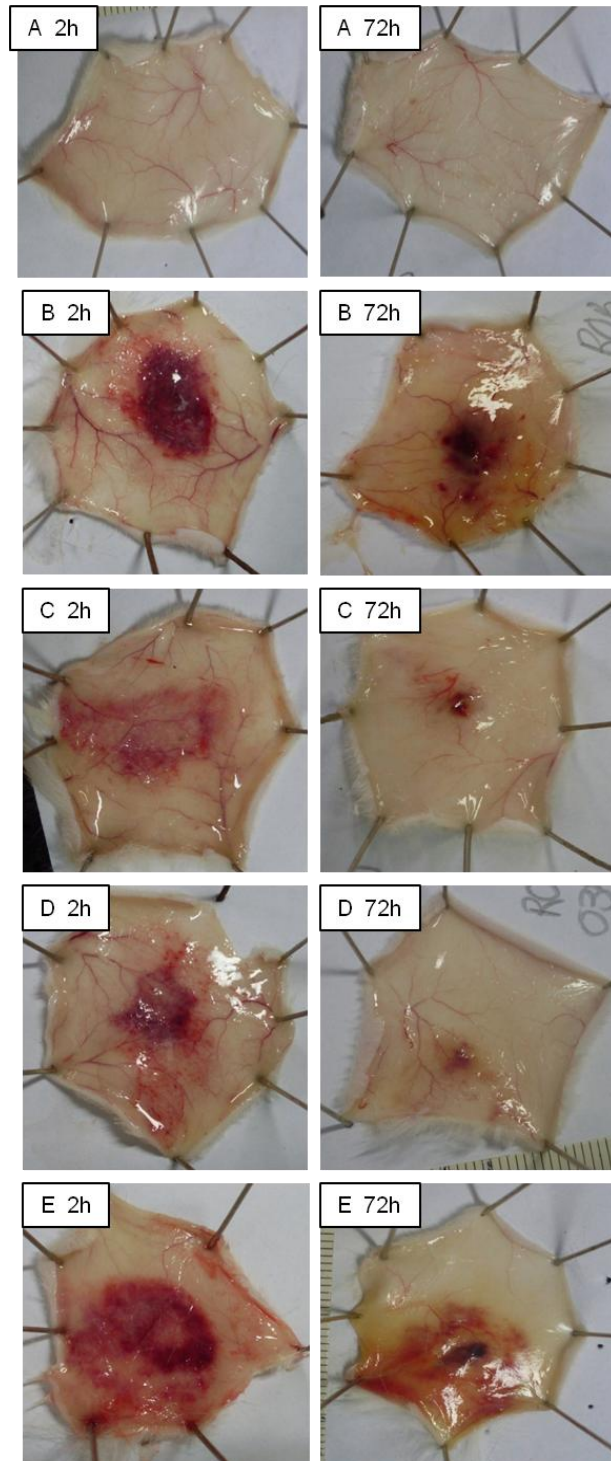


Figura 12: Fotografias das superfícies internas da pele dorsal de camundongos Swiss injetadas intradermicamente após 2 hr e 72 hr com: A: PBS; B: VBp (50 µg/ 50 µL); C: VBp + 1 (1:1); D: VBp + 2 (1:1) e E: VBp + 3 (1:1).

A extensão da área hemorrágica do veneno (Figura 13a) foi reduzida com os três alcalóides, e a intensidade da hemorragia (Figura 13b) diminuiu quando o veneno foi pré-incubado com os alcalóides 1 e 2.

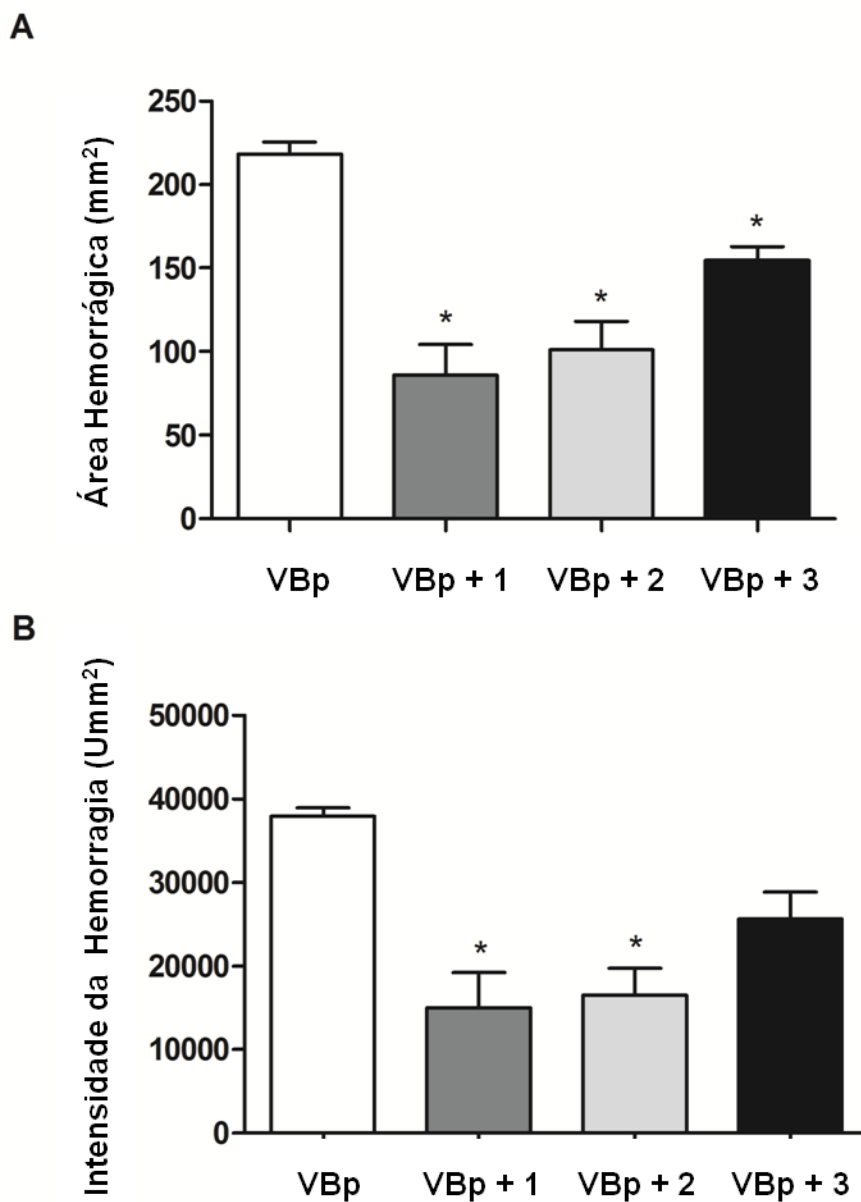


Figura 13. Atividade antihemorrágica dos compostos 1-3 isolados da *S. campaniforme* contra o VBp em pele de camundongo Swiss após 2 horas de administração i.d de 50 μ L dos tratamentos. A: Área Hemorrágica calculado em mm², e B: Intensidade da Hemorragia em units/mm². Resultados expressos como média \pm S.E.M. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett com nível de significância de * p < 0,05.

A análise histopatológica dos tecidos de pele foi realizada com todos os grupos tratados, após duas horas dos testes. Os controles tratados com salina não apresentaram alterações. A análise histopatológica dos cortes de pele que foram tratadas com o vBp mostrou epiderme e derme íntegras, infiltrado inflamatório misto discreto envolvendo derme e o subcutâneo, presença moderada de sangue derramado com hemácias íntegras, em toda a extensão, foco hemorrágico e infiltrado inflamatório discreto perimuscular com fibras musculares destruídas e dissociadas (edema), além de congestão vascular. O tratamento com os três alcalóides revelou epiderme e derme íntegras em toda extensão, presença discreta de sangue derramado em todas as camadas e no tecido muscular subjacente, congestão vascular. Os tratamentos com os alcalóides (1 – 3) evidenciaram um discreto infiltrado inflamatório no derma e subcutâneo e discreto infiltrado inflamatório perimuscular. Com relação às alterações em tecido muscular subjacente o veneno de Bp quando pré-incubado com o alcalóide 1 e 2, mostraram fibras musculares com menos alterações, destruição em menor quantidade, encontrando-se fibras musculares preservadas e poucas fibras alteradas em balonização. Com o alcalóide 3 identificou-se fibras musculares em degeneração, apresentando-se balonizadas (Figura 14).

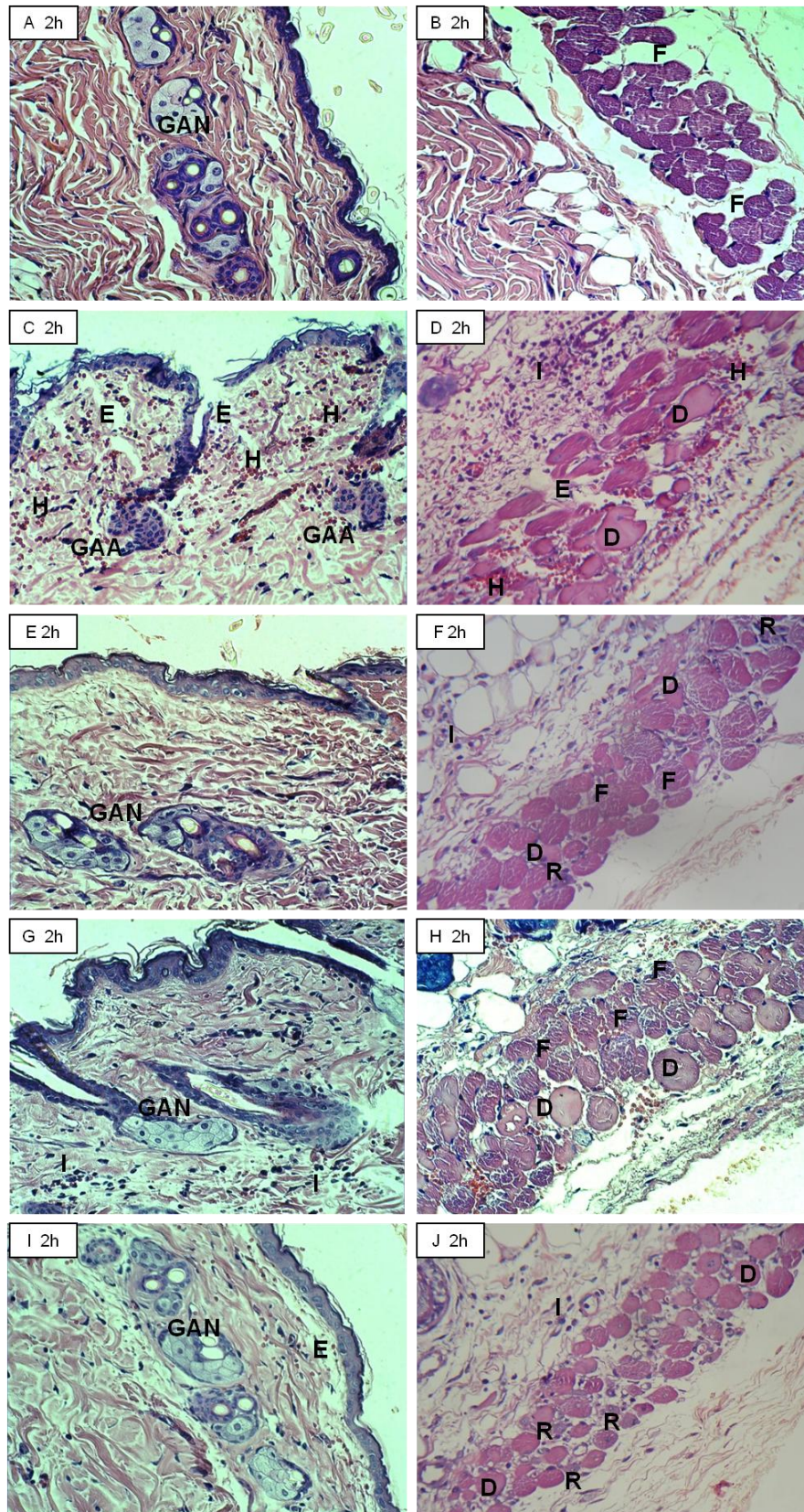


Figura 14. Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 µm de espessura de pele de camundongo Swiss após 2 horas de administração i.d de 50 µL. A e B: PBS; C e D: VBp (50 µg/ 50 µL); E e F: VBp + 1 (1:1); G e H: VBp + 2 (1:1) e I e J: VBp + 3 (1:1). Aumentos respectivos de 100 X e 400X. F= fibra muscular normal, H= hemorragia, E= edema, I= infiltrado inflamatório, D= fibras em vários estágios degenerativos. GAN: Glândula anexa normal. GAA: Glândula anexa alterada. R: fibras musculares em regeneração. Coloração: H/E.

A lesão cutânea necrótica foi significativamente inibida com a presença dos alcalóides 1 e 2, como se pode visualizar na Figura 15.

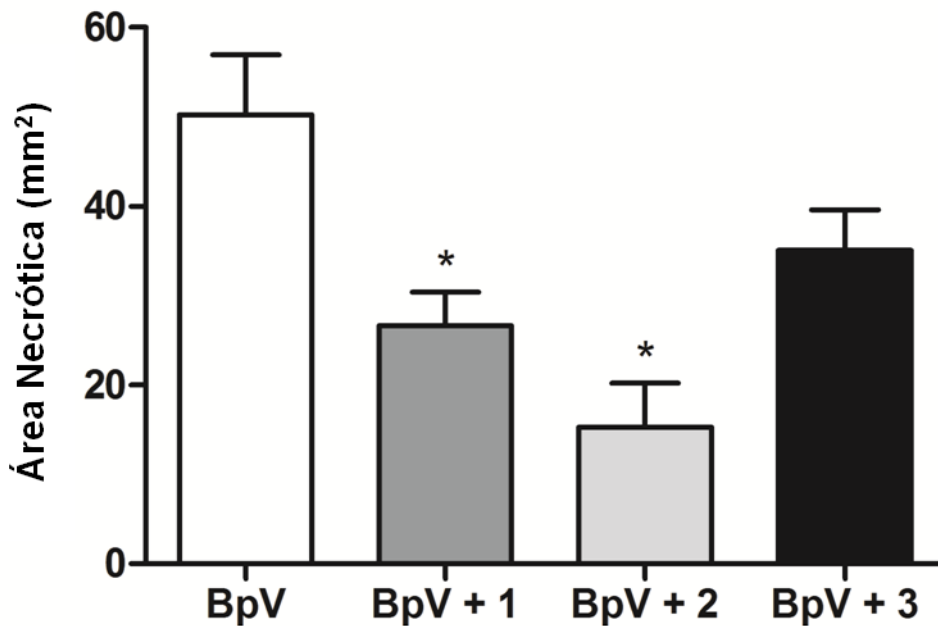


Figura 15. Atividade antinecrosante dos compostos 1-3 isolados da *S.campaniforme* contra o vBp em pele de camundongo Swiss após 72 horas de administração i.d de 50 μ L dos tratamentos. Área da pele necrótica mostrada em mm². Resultados expressos como média \pm S.E.M. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnett com nível de significância de * p <0,05.

Após 72 horas dos tratamentos, a análise histopatológica não mostrou alterações nos controles tratados com salina. Com vBp, a pele revelou epiderme destruída em toda extensão, e formação de crosta com exsudato e sangue (crosta fibrino leucocitária), além de formações vesiculares em toda extensão da epiderme e derme. Exsudato inflamatório agudo envolvendo a derme e o subcutâneo. Destruição muscular mais intensa, sem regeneração, foco hemorrágico e infiltrado inflamatório discreto perimuscular. Presença mais intensa de sangue derramado com hemácias íntegras, em toda a extensão. O tratamento com os alcalóides 1 e 2, a epiderme e a derme apresentaram-se íntegras em toda extensão, em contrapartida o tratamento com o alcalóide 3 mostrou formação de crosta na maior parte da extensão da epiderme. Na derme, subcutâneo e na região perimuscular encontrou-se discreto infiltrado inflamatório misto (polimorfonucleares e mononucleares) discreto sangue derramado com

hemácias íntegras com todos os três alcalóides. No tecido muscular subjacente, apenas com o alcalóide 1 evidenciou-se moderada destruição muscular, com presença de fibras balonizadas e regeneradas e tecido de granulação. Predominância de fibras balonizadas, com algumas em regeneração, além de tecido de granulação, foram evidenciados nos tratamentos com os alcalóides 2 e 3 (Figura 16).

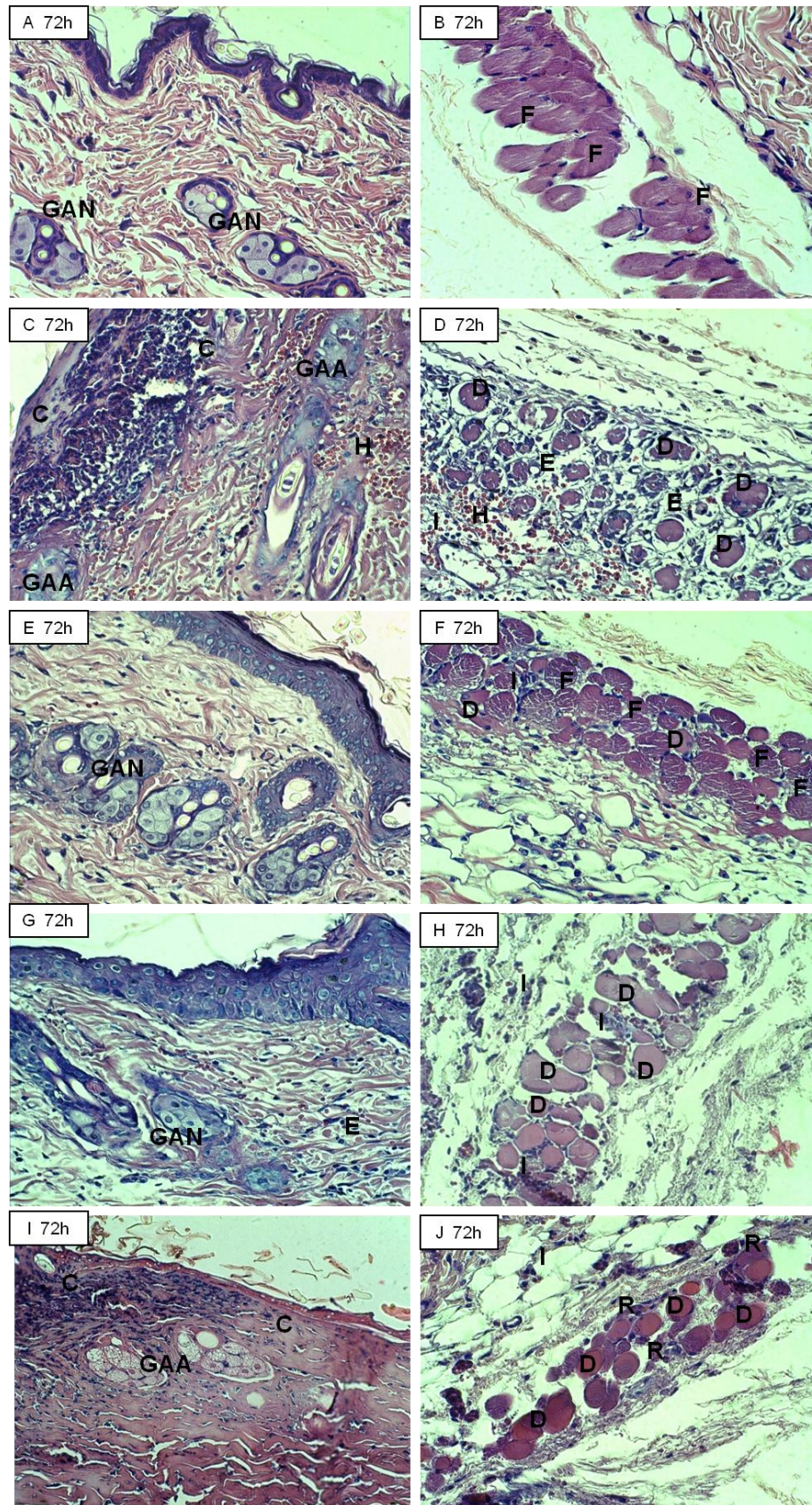


Figura 16: Fotomicrografia de luz de uma secção transversal de 4 µm de espessura pele de camundongo Swiss após 72 horas de administração i.d de 50 µL. A e B: PBS; C e D: VBp (50 µg/ 50 µL); E e F: VBp + 1 (1:1); G e H: VBp + 2 (1:1) e I e J: VBp + 3 (1:1). Aumentos respectivos de 100 X e 400X. **F**= fibra muscular normal, **H**= hemorragia, **E**= edema, **I**= infiltrado inflamatório, **D**= fibras em vários estágios degenerativos. **C**: crosta fibrino leucocitária. **GAN**: Glândula anexa normal. **GAA**: Glândula anexa alterada. **R**: fibras musculares em regeneração. Coloração: H/E.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A fisiopatologia do envenenamento ofídico envolve uma série complexa de eventos que são dependentes de uma ação combinada dos componentes farmacologicamente ativos da peçonha. Envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* são frequentemente associados com complexas e severas alterações patológicas locais, incluindo edema, hemorragia, formações vesiculares na pele, dermonecrose e necrose do músculo esquelético (WARRELL, 2005; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b). Esses efeitos são principalmente o resultado da ação direta de metaloproteases dependentes de zinco (SVMPs) e das fosfolipase A₂ miotóxicas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b; ZAMUNER *et al.*, 2005).

Os níveis de CK induzidos pelo veneno de *Bothrops pauloensis* (vBp) foram inibidos com os alcalóides em estudo. Estes compostos (1-3) não mostraram qualquer efeito sobre a atividade enzimática do veneno bruto. Os resultados sugerem que a miotoxicidade do vBp pode ser atribuída à ação de PLA₂ Lys49 homólogas, que são cataliticamente inativas e que provavelmente exercem sua miotoxicidade com a região C-terminal (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010; MONTECUCCO *et al.*, 2009). Porém não foi elucidado como agem estes compostos na inibição do efeito miotóxico.

O efeito miotóxico pela ação direta de PLA₂ Lys49 na membrana plasmática do músculo pode ser devido às áreas de sua estrutura em reconhecerem sítios de carga negativa do receptor, tanto para áreas de baixa e alta afinidade da membrana muscular, que interagem e penetram na bicamada lipídica promovendo a desestabilização da membrana através de um mecanismo independente da ação catalítica. Esta ação resulta em um influxo de cálcio, que inicia uma série de mecanismos degenerativos, como alterações no citoesqueleto, danos mitocondriais, ativação de proteases e fosfolipases dependentes de cálcio e hipercontração de miofibras, que conseqüentemente, causa mais danos celulares, levando à necrose de fibras musculares (NUÑEZ *et al.*, 2001; LOMONTE *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2010).

As miotoxinas botrópicas induzem lesão muscular grave logo após a injeção intramuscular, a qual é caracterizada principalmente por inflamação, edema e mionecrose. Estas alterações levam a uma série de distintas características bioquímicas e morfológicas no músculo afetado (RUCAVADO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2001, 2007).

A lesão muscular induzida pelo vBp revelou fibras musculares em degeneração, edema, infiltrado inflamatório e hemorragia. Estas alterações, principalmente o efeito

hemorrágico, foram menores quando os animais foram injetados com o veneno previamente incubado com os alcalóides. No entanto, o infiltrado inflamatório permaneceu presente.

As atividades proteolítica, coagulante, fosfolipásica, hemorrágica e miotóxica induzidas pelo veneno de *B.pauloensis* foram neutralizadas com o extrato aquoso das folhas de *Schizolobium parahyba*. O efeito sobre a miotoxicidade mostrou redução dos níveis de CK e das alterações histopatológicas de hemorragia, edema e mionecrose, contudo o infiltrado inflamatório permaneceu proeminente (MENDES *et al.*, 2008). Outros autores mostram em animais experimentais submetidos a injeção intramuscular de veneno de *Bothrops* e suas toxinas isoladas, que a presença de células inflamatórias no local da lesão podem constituir um evento importante para regeneração das fibras musculares esqueléticas (ESCALANTE *et al.*, 2009; MONTECCUCO *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2009; SANT'ANA *et al.*, 2011).

A regeneração muscular esquelética é um processo complexo que envolve a remoção de material necrótico por fagócitos, a ativação de células satélites miogênicas em mioblastos, a replicação dessas células, a sua fusão para formar miotubos, e a maturação final das células musculares em regeneração, juntamente com eventos complexos que ocorrem na microvasculatura. Para que este processo ocorra de modo bem sucedido, vários requisitos devem ser atendidos como o suprimento vascular e inervação adequada, a presença de uma lâmina basal intacta envolvendo as fibras necróticas, e a fagocitose eficiente de restos celulares necróticos (GROUNDS, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

O envenenamento botrópico leva a alterações patológicas em tecidos e vasos e é responsável por um prolongado desequilíbrio dos fluidos intersticiais. Uma vez que, o veneno afeta drasticamente a integridade dos capilares, vênulas e pequenas artérias (ARCE *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1992), sendo a principal causa conhecida de hemorragia (BALDO *et al.*, 2010).

Estudos experimentais têm demonstrado que o edema induzido por veneno de *Bothrops* é de origem inflamatória, mediado principalmente pelos metabólitos do ácido araquidônico (TREBIEN; CALIXTO, 1989; PERALES *et al.*, 1992; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Além disso, outro estudo realizado por Mora e colaboradores (2008) mostrou que miotoxinas PLA₂ homólogas, isoladas do veneno de *B. asper*, promoviam uma rápida e acentuada redução do fluxo e do lúmen nos vasos linfáticos, dose-dependentes, como resultado da contração ou dano direto das células musculares da parede linfática.

Alterações teciduais locais induzidas por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* estão associados a uma reação inflamatória evidente, caracterizado por edema, dor e infiltração leucocitária (CHACUR *et al.*, 2001; CHAVES *et al.*, 1995; FARSKY *et al.*, 1997).

A progressão de uma resposta inflamatória é caracterizada por um significativo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, seguido por células mononucleares. Os neutrófilos são os primeiros polimorfonucleares a migrarem para a área inflamada e desempenham um papel fundamental na eliminação de agentes nocivos (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Neutrófilos também podem contribuir para a resolução de alterações teciduais causadas por vários agentes prejudiciais, tais como venenos, através da remoção de detritos, levando à substituição ordenada de células, reparação e regeneração dos tecidos (TIDBALL *et al.*, 1995).

A possibilidade das células inflamatórias poderem contribuir para patologia local de acidentes por animais peçonhentos do gênero *Bothrops* está relacionada com a ocorrência da ativação de leucócitos nos tecidos envenenados e não apenas porque há um recrutamento de células inflamatórias (ZAMUNÉR *et al.*, 2001).

A depleção de neutrófilos pode comprometer a remoção adequada de restos necróticos e o recrutamento de macrófagos que desempenham um papel fundamental na regeneração muscular (ROBERTSON *et al.*, 1993). Em estudo realizado por Teixeira e colaboradores (2003), o papel destas células foi investigado sobre os efeitos locais promovidos pelo veneno de *B. asper* e sua miotoxina PLA₂ Asp49, sobre ratos neutropênicos. Os autores observaram que a depleção de neutrófilos não afetou a extensão da mionecrose e hemorragia, porém além de reduzir a resposta regenerativa do músculo esquelético, os níveis de CK mantiveram-se elevados.

Os neutrófilos desempenham um papel protetor no envenenamento, constituindo um elemento importante para a regeneração do músculo esquelético necrosado, apesar do infiltrado proeminente de polimornucleares/neutrófilos em tecidos afetados pelos venenos de *Bothrops*, estarem também associados à produção de espécies reativas de oxigênio e derivados de nitrogênio (ZAMUNER *et al.*, 2001).

Apesar das PLA₂ miotóxicas serem capazes de estimularem a produção e liberação de mediadores da inflamação, tais como a IL-1 e IL-6, TNF-alfa, LTB₄, TXA₂, PGE₂ e PGD₂ tanto no sitio de injeção *in vivo* quanto em testes *in vitro* (ZULIANI *et al.*, 2005;. MOREIRA *et al.*, (2008), os efeitos inflamatórios desencadeados por PLA₂ cataliticamente ativas (PLA₂

Asp 49) e inativas (Lys 49) envolvem diferentes sinalizações (CHAVES *et al.*, 1998; ZULIANI *et al.*, 2005a), ainda não completamente esclarecidas.

Com relação aos estudos supracitados, mesmo ocorrendo uma minimização das alterações histológicas no músculo gastrocnêmio com o pré-incubamento de cada alcalóide com o vBp, a permanência do infiltrado inflamatório pode ser importante para desempenhar um papel proeminente no processo de regeneração do músculo esquelético, relacionada com a fagocitose do material necrótico e recrutamento de outras células inflamatórias, eventos diretamente associados com uma resposta muscular regenerativa bem sucedida.

Nesse contexto, a miotoxicidade induzida por venenos de serpentes pode ser induzida pela ação direta de PLA₂ miotóxicas, que levam a ruptura da membrana plasmática das células musculares, afetando assim a integridade e permeabilidade da membrana, refletindo em um aumento rápido dos níveis de CK no plasma e graves alterações teciduais. Contudo a ação indireta de metaloproteases hemorrágicas, que causam lesões nos vasos sanguíneos levando à isquemia e, conseqüentemente, à morte celular das fibras musculares, pode também estar associada (DOURADO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) compreendem uma subfamília de enzimas zinco-dependentes de massas moleculares variáveis, que têm mostrado uma variedade de papéis na patogênese do envenenamento ofídico, muitas das quais estão associadas com coagulopatia e necrose (WHITE, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2005). Elas são agrupadas em três classes e várias subclasses, com base na composição de seu domínio. SVMPs P-I apresenta somente o domínio metaloprotease, com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. SVMPs P-II apresenta além do domínio metaloprotease, um domínio desintegrina, que esta freqüentemente associado à ação proteolítica. SVMPs P-III é considerada como a de maior atividade hemorrágica, apresentando um domínio metaloproteinase, domínio tipo desintegrina e um domínio rico em cisteína. Contudo, algumas SVMPs com domínios tipo desintegrina, rico em cisteína e lectina tipo-C, foram anteriormente classificadas na classe P-IV. Posteriormente identificou-se que as subunidades de sua lectina tipo-C encontravam-se ligadas por pontes de dissulfeto a uma SMVP P-III, e estas agora são classificadas como uma subclasse de enzimas P-III (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009b; BALDO *et al.*, 2010).

Os venenos botrópicos contêm muitas enzimas proteolíticas que degradam uma variedade de substratos naturais tais como caseína, fibrinogênio, colágeno e outros substratos

sintéticos. Toxinas hemorrágicas estão entre estas enzimas que são responsáveis pela degradação proteolítica a partir da matriz extracelular ou alterações na coagulação sanguínea e precisam de um íon metálico bivalente para sua atividade. Sabe-se que as SMVP são as principais toxinas envolvidas no sangramento e necrose da pele, relacionadas com a capacidade destas em degradar as proteínas da matriz extracelular e da membrana basal (ESCALANTE *et al.*, 2011).

Os alcalóides (1-3) promoveram inibição *in vitro* da atividade proteolítica sobre os substratos natural (azocaseína) e sintético (DL-BAPNA) utilizados. Assim foi investigado *in vivo* os efeitos inibitórios destes alcalóides sobre os efeitos da intensidade e área hemorrágica e área necrosante do vBp, que foram melhores inibidos com os alcalóides 1 e 2, refletindo em uma melhora das alterações histológicas promovidas na pele.

O mecanismo da hemorragia induzida por SVMPs tem sido investigado em diversos estudos (KAMIGUTI *et al.*, 1996; JIA *et al.*, 1997; SERRANO *et al.*, 2005; 2006; ESCALANTE *et al.*, 2006). No entanto, os eventos moleculares e celulares precisos associado com o rompimento de microvasos permanecem desconhecidos. A degradação dos componentes da membrana basal vascular tem sido proposta como um evento importante para o aparecimento de perturbações dos capilares (BALDO *et al.*, 2010).

A membrana basal é constituida de lâmina reticular, que é formada por fibras colágenas e lâmina basal, que é o resultado da associação de moléculas de laminina com o colágeno tipo IV, entactina e perlecano, fundamentais para sua estabilidade (KALLURI *et al.*, 2003). A degradação desses componentes por SVMPs pode afetar profundamente a estabilidade do endotélio, resultando em sangramento (LEBLEU *et al.*, 2007). Entretanto, a atividade catalítica é aparentemente semelhante em SVMPs hemorrágicas e não hemorrágicas, indicando que a hidrólise dos componentes da membrana basal não é o único mecanismo que atua no dano vascular induzido pelas toxinas hemorrágicas (ESCALANTE *et al.*, 2011).

As células endoteliais também têm sido investigadas como potenciais alvos de toxinas hemorrágicas. A ancoragem destas células podem ser interrompidas por SVMPs utilizando mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade proteolítica. Pois, tanto SVMPs PI e P-III podem interferir com a adesão dos componentes envolvidos na adesão focal entre as células endoteliais e a matriz extracelular, afetando a organização dos filamentos de actina e culminando em morte celular por apoptose (DÍAZ *et al.*, 2005; TANJONI *et al.*, 2005; BRENES *et al.*, 2010).

Muitas metaloproteases de serpentes induzem apoptose em cultura de células endoteliais (WU & HUANG *et al*, 2003; YOU *et al*, 2003;. DIAZ *et al*, 2005;. TANJONI *et al*, 2005). Jiménez e colaboradores (2008) mostraram que após a injeção de BaP1 (metaloprotease isolada *B. asper*), não houve morte celular por apoptose nas células endoteliais, sugerindo que, a morte celular pode ser mais provável e predominante por necrose, já que as células endoteliais capilares são rapidamente afetadas após a injeção de metaloproteases (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). No entanto, o papel real da apoptose das células endoteliais no envenenamento ofídico não foi elucidado.

Um estudo com a BaP1 (SVMP de classe I) em modelo de orelha de rato, mostrou que os efeitos que são descritos na pele de pacientes envenenados por *Bothrops*, tais como, edema, inflamação, hemorragia e dermonecrose foram completamente anuladas com o inibidor de atividade proteolítica (JIMENEZ *et al.*, 2008). Em outro estudo, Baldo e colaboradores (2011) mostraram que a hemorragia e alterações histológicas fortemente induzidas na pele de camundongos injetados intradermicamente com SVMPs hemorrágica da classe P-III, estava relacionada ao seu acúmulo na membrana basal, levando a sua rápida degradação.

Com base em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, sugere-se que os rápidos efeitos patológicos em vasos capilares e nos complexos juncionais entre epiderme e derme sejam devido à atividade proteolítica das metaloproteases diretamente sobre essas estruturas, por serem capazes de digerir várias proteínas da matriz extracelular, incluindo aquelas que formam as membranas basais (RUCAVADO *et al.*, 1995; ESCALANTE *et al.*, 2006; JIMENEZ *et al.*, 2008), com o conseqüente enfraquecimento da estabilidade dos vasos capilares, seguido pela distensão destes, devido à ação de forças biofísicas que operam normalmente na circulação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; FOX & SERRANO, 2008), um processo que leva danos às células endoteliais, ruptura da parede capilar e extravasamento (ESCALANTE *et al.*, 2006;. JIMENEZ *et al.*, 2008).

O dano agudo dos vasos capilares é um dos mais relevantes efeitos induzidos pelas metaloproteases, uma ação que leva à hemorragia e edema, tem implicações em eventos reparativos e regenerativos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; ESCALANTE *et al.*, 2011).

Nos experimentos de atividade hemorrágica, as alterações histológicas na pele induzidas pelo vBp foram menores quando o veneno foi previamente incubado principalmente com os alcalóides 1 e 2, evidenciando uma menor presença de hemácias nas camadas da pele e fibras musculares subjacente com menores alterações. A análise microscópica da pele após

avaliação da inibição da atividade necrosante, impediu a destruição da epiderme e derme em toda extensão e uma menor presença de hemorragia também com os alcalóides 1 e 2. O tecido muscular subjacente mostrou fibras menos alteradas e em regeneração, principalmente evidenciadas com o alcalóide 1. O infiltrado inflamatório também permaneceu presente em todos os grupos tratados, exceto no controle. A redução destes efeitos principalmente com os alcalóides 1 e 2, pode ser justificada pela semelhança estrutural maior entre eles, do que com o alcalóide 3.

Poucos são os estudos de inibição *in vivo* das alterações de pele com envenenamento por *Bothrops*. Apenas três estudos foram encontrados utilizando os extratos das plantas *Kalanchoe brasiliensis* e *Curcuma longa* que além de mostrarem regressão do halo hemorrágico, também reduziram significativamente a necrose de pele induzidas em vários animais experimentais com injeção intradérmica de veneno de *Bothrops alternatus* (SANTOS *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2005).

A neutralização de venenos de serpentes e/ou suas toxinas isoladas como PLA₂ e SVMP por extratos de plantas e seus princípios ativos identificados têm sido estudadas com o objetivo principal de complementar a soroterapia tradicional (JANUÁRIO *et al.*, 2004). A atividade antiofídica contra veneno botrópico é demonstrada cientificamente por uma variedade de plantas. Entretanto, somente alguns atribuem a atividade a compostos químicos isolados e um percentual muito pequeno propõe um mecanismo de ação para estes compostos (PEREIRA *et al.*, 1994; MORS *et al.*, 2000).

Terpenóides isolados de *Baccharis trimera* (JANUÁRIO *et al.*, 2004), *Curcuma longa* (MELO *et al.*, 2005) e *Pentaclethra maculosa* (DA SILVA *et al.*, 2007) têm exibido atividades antifosfolipásica, antimiotóxica, antiedematogênica, antiproteolítica e antihemorrágica contra vários venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e frações isoladas.

Wedelolactona e demetilwedelolactona são coumestanos isolados de *Eclipta prostrata* que foram capazes de inibir a atividade miotóxica induzida por PLA₂ Asp49 (BthTX-II e BthA-I-PLA₂) e PLA₂ Lys49 (BthTX-I) isoladas do veneno de *B. jararacussu* (DIOGO *et al.*, 2009), atividades proteolíticas e hemorrágicas de uma metaloprotease (bothropasina) isolada de *B. jararaca* também foram inibidas com wedelolactona (MELO *et al.*, 1994).

Pterocarpanos isolados da planta *Harpalyce brasiliensis* Benth apresentaram atividades antiproteolíticas e antifosfolipásica (DA SILVA *et al.*, 2004) e antimiotóxica (DA SILVA *et al.*, 2004; XIMENES, 2009) contra o veneno de *B. jararacussu*. O ácido elágico e seus

derivados são taninos isolados de *Casearia sylvestris* que também mostraram-se eficientes na neutralização das atividades miotóxicas promovidas por PLA₂ Asp49 (BthTX-II) de *B.jararacussu*.

Estudos com os extratos das plantas *Piper umbellatum* L, *Piper peltatum* L. (NÚÑEZ *et al.*, 2005) e *Cordia verbanacea* (TICLI *et al.*, 2005), e seus compostos fenólicos isolados, 4-nerolidilcatecol e ácido rosmarínico, respectivamente, mostraram inibição das atividades fosfolipásica, edematogênica e miotóxica contra o envenenamento experimental por *Bothrops*. O 4-nerolidilcatecol inibiu a ação da miotoxina I (PLA₂ Asp49) isolada do veneno de *B. asper*. O ácido rosmarínico inibiu significativamente o edema e a miotoxicidade promovidas pelo veneno de *B.jararacussu* e suas principais PLA₂ básicas (BthTX-I Lys49 e BthTX-II Asp49). Os autores mostraram a partir de modelagem molecular a interação do ácido rosmarínico com estas PLA₂ miotóxicas, com domínios distintos para estas atividades, porém não foi elucidado o mecanismo de ação (TICLI *et al.*, 2005).

Portanto, a ação dos alcalóides esteroidais isolados de *Solanum campaniforme* no bloqueio dos efeitos miotóxicos do veneno de *Bothrops pauloensis* (vBp), ao reduzirem os níveis de CK e ao minimizarem as alterações histológicas, parecem não depender de atividade catalítica de PLA₂ e podem estar relacionada à inibição de PLA₂ Lys49 e/ou com uma ação indireta sobre SVMP. A inibição das atividades proteolíticas e a redução dos efeitos hemorrágicos e necrosantes induzidas pelo vBp, principalmente atribuídos aos alcalóides 1 e 2, podem estar associadas com a interação destes compostos com as SVMP presentes no veneno e/ou com íons metálicos bivalentes necessários para sua ação.

Contudo, o estudo com outras doses, modelos animais, e estudos de modelagem molecular com as frações isoladas do veneno de *B. pauloensis*, responsáveis pelas alterações locais, serão necessários para esclarecer o mecanismo de ação inibitório.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Os alcalóides isolados de *Solanum campaniforme* não mostraram inibição da atividade catalítica do veneno de *Bothrops pauloensis* com o substrato utilizado, mas promoveram inibição significativa das atividades proteolíticas *in vitro*, além de reduzirem os efeitos miotóxicos, hemorrágicos e necrosantes promovidos pelo veneno total de *B. pauloensis* induzidos em camundongos, mostrando seu potencial antiófidico contra as alterações locais do envenenamento por uma espécie botrópica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BERGER, L. R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 3, p. 826-842, 2009.
- AMIR, M.; KUMAR, S. Possible industrial applications of genus *Solanum* in twenty first century: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 63, n. 2, p. 116-124, 2004.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; CORRÊA, F.M.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v.64, n.4, p.723-732, 2002.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**. v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009.
- ARAÚJO, A. L.; RADVANYI, F.; BON, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: Molecular and enzymatic properties. **Toxicon**. v. 32, n. 9, p. 1069-1081, 1994.
- BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T.M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.6, p. e727, 2010.
- BARBOSA, P.S.; HAVT, A.; FACO P.E.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MONTEIRO, H.S.. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**. V.40, n°10, p.1427-35, 2002.
- BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHON, J. Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A(2) inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, n. 6, p. 865-874, 2001.
- BÉRNILS, R. S. (org.). Brazilian reptiles – List of species. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. 2009. Disponível em:<<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em 23 de maio de 2010.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- BORGES, M. H., SOARES, A .M., RODRIGUES, V. M., ANDRILAO-ESCARSO, S. H., DINIZ, H., HAMAGUCHI, A., QUINTERO, A., LIZANO, S., GUTIERREZ, J. M., GIGLIO, J. R., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127, n. 1, p. 21-31, 2000.
- BORGES, M.H., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., OLIVEIRA, F., FRANSHECHI, A.M., RUCAVADO, A., GIGLIO, J.R., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon**, v. 39, p.1863–1869, 2001.
- BORJA-OLIVEIRA, C.R.; DURIGON, A.M.; VALLIN, A.C.C.; TOYAMA, M.H.; SOUCCAR, C.; MARANGONI, S. RODRIGUES-SIMIONI, L. The pharmacological effect of *Bothrops neuwiedii pauloensis* (jararaca-pintada) snake venom on avian neuromuscular

transmission. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 617-624, 2003.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste**: especialmente do Ceará. Fundação Guimarães Duque. Rio Grande do Norte-RN. 2001, 285p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Relatórios Gerenciais. **Acidentes por animais peçonhentos**: notificação por tipo de serpente segundo ano. 2011. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539>. Acesso em 30 de maio de 2011.

BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, n.3, p.424-432, 2010.

BROWN, N., LANDON, J. **Antivenom**: the most cost-effective treatment in the world? **Toxicon**, v. 55, p. 1405-1407, 2010.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009.

CAŁKOSIŃSKI, I.; SEWERYN, E.; ZASADOWSKI, A.; MAŁOLEPSZA-JARMOŁOWSKA, K.; DZIERZBA, K.; BRONOWICKA-SZYDEŁKO, A.; MIERZCHAŁA, M.; CEREMUGA, I.; ROSIŃCZUK-TONDERYS, J.; DOBRZYŃSKI M.; GAMIAN, A. The composition, biochemical properties and toxicity of snake venoms. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, v. 28, n. 64, p. 262-272, 2010.

CALVETE JJ, MARCINKIEWICZ C, MONLEÓN D, ESTEVE V, CELDA B, JUÁREZ P, SANZ L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, n.8, p.1063-74, 2005.

CALVETE JJ, SANZ L, ANGULO Y, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v.583, n.11, p.1736-43, 2009.

CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANCA, F. O.; JORGE, M. T, LEITE, R. P, NISHIOKA, S. A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C, SANTORO M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. **An International Journal of Medicine**, v. 86, n. 5, p. 315–325, 1993.

CARDOSO, K. C.; SILVA, M. J.; COSTA, G. G. L.; TORRES, T. T. ; DEL BEM, L. E. V. ; VIDAL, R. O. ; MENOSSI, M. ; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605, 2010.

CARON, E. J.; MANOCK, S. R.; MAUDLIN, J.; KOLESKI, J.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; SMALLIGAN, R. D. Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: was it prophylaxis or method of administration?. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 779-83, 2009.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. O.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom

- phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490 - 497, 2007.
- CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y . Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, Grã-Betanha, v. 39, n. 8, p. 1173--1181, 2001.
- CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**. v. 33, n. 1, p. 31-39, 1995.
- CHIFUNDERA, K. Livestock disease and traditional medicine in the bush area, Kivu Province, Democratic Republic of Congo. **African Study Monographs**, v.19, n. 1, p. 13-33, 1998.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M. G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LEITE, G. B.; CRUZ-HÖFLING, M. A. RODRIGUES-SIMIONI, L. OSHIMA-FRANCO, Y. Antibothropic Action of *Casearia sylvestris* Sw.(Flacourtiaceae) Extracts. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 6, p. 784–790, 2008.
- COTRIM, C.A.; DE OLIVEIRA, S.C.; DIZ FILHO, E.B.; FONSECA, F.V.; JR. BALDISSERA, L .; ANTUNES, E.; XIMENES, R.M.; MONTEIRO, H.S.; RABELLO, M.M.; HERNANDES, M.Z.; DE OLIVEIRA, T. D.; TOYAMA, M.H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂. **Chemico-Biological Interactions**, v.189, n. 1-2, p.9-16, 2011.
- CORREA-NETTO, C.; TEIXEIRA-ARAÚJO, R.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE-SIMONE, S. G.; SOARES, M. R.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R. B. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, 2010.
- COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and Functional Characterization of a Thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 725-735, 2009.
- CRUZ, L. S, VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite envenomation and death in developing world. **Ethnicity and disease**, v. 19, n. 1 Suppl 1, p. 42- 46, 2009.
- 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 against snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 2, p. 431-435, 2004.
- 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 metalloproteases snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 283-291, 2007.
- DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; CHAAR, J. S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 655-666, 2008.
- DANIELE, J. J.; BIANCO, I. D.; FIDELIO, G. D. Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 318, n. 1, p.65-70; 1995.

DAROS, M. D. R.; MATOS, F. J. D. A. & PARENTE, J. P. A new triterpenoid saponin, bredemeyeroside B, from the roots of *Bredemeyera floribunda*. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 523-527, 1996.

DE SOUZA, A. L.; MALAQUE, C. M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C.. Loxosceles venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v.51, n.1: p.151-156, 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: 2^a ed. John Wiley & Sons, Ltda, 2002, 507p.

DÍAZ, C.; VALVERDE, L.; BRENES, O.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 94, n. 3, p. 520-528, 2005.

DIOGO, L. C.; FERNANDES, R. S.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D. L.; ROBERTO, P. G.; MATRANGULO, P. V.; PEREIRA, P. S.; FRANCA, S. C.; GIULIATTI, S.; SOARES, A. M.; LOURENCO, M. V. Inhibition of Snake Venoms and Phospholipases A2 by Extracts from Native and Genetically Modified *Eclipta alba*: Isolation of Active Coumestans. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (Print)**, v. 104, n. 4, p. 293-299, 2009.

DISTL, M.; WINK, M. Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber-Bearing *Solanum* Species by HPLC and LC-ESI-MS. **American Journal of Potato Research**, v.52, n.1, p.79-104, 2009.

DOLEY, R, KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

DOURADO, D. M; MATIAS, R; ALMEIDA, M. F; DE PAULA, K. R; VIEIRA, R. P; OLIVEIRA, L. V. F; CARVALHO, P. T. C. The effects of low-level laser on muscle damage caused by *Bothrops neuwiedi* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 3, p. 423-434, 2008.

EDMONDS, J. M.; CHWEYA, J. A. **Black nightshades – *Solanum nigrum* L. and related species**. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.15. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. p. 5-113, 1997.

ERLANGER, B.P.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 95, p.271-278, 1961.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, article in press, p.1-14, 2011.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; PINTO, A.F.; TERRA, R.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; FOX, J.W. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *Journal of Proteome Research*, v.8, n.11, p. 5120-5130, 2009.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIERREZ, J. M.; FOX, J. W. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 455, n. 2, p. 144-153, 2006.

ESMERALDINO, L.E.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v.12, n.8, p. 570-576, 2005.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIANO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

FAN, H. W.; MARCOPITO, L. F.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S.; FERRARI, R. A.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Sequential randomised and double blind trial of promethazine prophylaxis against early anaphylactic reactions to antivenom for *Bothrops* snake bites. **British Medical Journal**, v. 318, n. 29, p: 1451-1453, 1999.

FARSKY, S. H. P.; WALBER, J.; CRUZ, M. C.; CURRY, Y.; TEIXEIRA, C. F.P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 185-93, 1997.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R.L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO. Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE B. Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **An International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 3, p. 273-283, 2010.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; CAMPOS, M. M. C.; HABERMEHL, G. G.; MORAES, V. L. G. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberiaceae). **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1211-1218, 1992.

FONSECA, F. V.; MELO, M. M.; SILVA, J.; PEREIRA, G. P.; DANTAS-BARROS, A. M. Extratos de *Curcuma longa* L. e *Kalanchoe brasiliensis* Camb. No tratamento local do envenenamento por *Bothrops alternatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 01, p. 26-29, 2004.

FONTES, M. R. M. ; SOARES, A. M. ; RODRIGUES, V. M. ; FERNANDES, A. C. ; SILVA, R. J. ; GIGLIO, J. R. . Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1432, n. 2, p. 393-395, 1999.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-30, 2008.

FRANÇA, F.O.S. Causes of deaths in snake bites in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.9, n.2, p.1678-9199, 2003.

FRIEDMAN, M. Potato Glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 54, v. 23, p. 8655-8681, 2006.

- GOMES, A; RINKU DAS, SS; MISHRA, R; MUKHERJEE, SM; BHATTACHARYA, S
GOMES, A. Herbs and herbal constituents active against snake bite. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 865-878, 2010.
- GONÇALVES, M.C.R.; DINIZ, M.F.F.M.; BORBA, J.D.C.; NUNES, X.P.; BARBOSA, J.M.F. Berinjela (*Solanum melongena* L.) mito ou realidade no combate as dislipidemias? João Pessoa: **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 252-257, 2006.
- GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A.. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v.48, n°1, p.44-54, 2006.
- GROUNDS M. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Pathology Research and Practice**, v. 187, n. 1, p. 1-22, 1991.
- GUTIÉRREZ J. M.; NÚÑEZ, J.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom metalloproteinase. **Microvascular Research**, v. 71, n. 1, p. 55-63, 2006.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976-987, 2009a.
- GUTIÉRREZ, J. M.; FAN, H. W.; SILVERA, C. L. M.; ANGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 625-630, 2009c.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-931, 2003.
- GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon**, v.51, n. 1, p.80-92, 2008.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.54, n.7, p.958-975, 2009b.
- 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, n. 8, p. 997-1011, 2005.
- GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom, Memórias do Instituto Butantan, v.33, p. 1405-1474, 1995.
- HALE, A. L.; REDDIVARI, L.; NZARAMBA, M. N.; BAMBERG, J. B.; MILLER, J.C. Interspecific variability for antioxidant activity and phenolic content among solanum species. **American Journal of Potato Research**, v. 85, n. 5, p. 332-341, 2008.
- HARRISON, R.A., HARGREAVES, A., WAGSTAFF, S.C., FARAGHER, B., LALLOO, D.G. Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n.12, p. e569, 2009.
- HAVT, F.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA₂ and PAF. **Toxicon**, v.39, n.12, p.1841-1846, 2001.

- IKEDA, T.; TSUMAGARI, H.; HONBU T.; NOHARA T. Cytotoxic Activity of Steroidal Glycosides from *Solanum* Plants. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 8, p.1198-1201, 2003.
- IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochime**, v. 85, n. 7, p. 669-675, 2003.
- JAIN, R.; SHARMA, A.; GUPTA, S.; SARETHY, I. P.; GABRANI, R. *Solanum nigrum*: current perspectives on therapeutic properties. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 1, p. 78-85, 2011.
- JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. I. R.; SATO, D. N.; ELLENA, I.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-protelolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, n. 3, p. 243-251, 2004.
- JARALD, E. E.; EDWIN, S.; SAINI, V.; DEB, L.; GUPTA V. B, WATE S. P; BUSARI , K. P. Anti-inflammatory and anthelmintic activities of *Solanum khasianum* Clarke. **The Journal of Asian Natural Products Research**, v. 22, n. 3, p. 269-74, 2008.
- JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 20, p. 13094-13102, 1997.
- JIMÉNEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Skin Pathology Induced by Snake Venom Metalloproteinase: Acute Damage, Revascularization, and Re-epithelization in a Mouse Ear Model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2421-2428, 2008.
- KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 422-433, 2003.
- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemical Journal**, v. 320 (Pt 2), p. 635-641, 1996b.
- KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAM, I M. T.; SINHA, M.; KUMAR R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; MANJUNATHA, K. R. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v.6, p.1-33, 2011.
- KAR, D. M., MAHARANA, L., PATTNAIK, S. & DASH, G. K. Studies on hypoglycaemic activity of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. fruit extract in rats, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2 p. 251- 256, 2006.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- KOH, D. C. I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p.3030-3041, 2006.

- LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 9, p. 1121-1129, 2007.
- LÔBO, K. M. S.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, A. M. A.; RODRIGUES, F. F. G.; LÔBO, I. S.; BEZERRA, D. A. C.; COSTA, J. G. M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 227-233, 2010.
- LOC, N. H.; KIET, H.V. Micropropagation of *Solanum hainanense* Hance. **Annals of Biological Research**, v.2, n. 2, p. 394-398, 2011.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p.885-901, 2003.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 307–312, 2003.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. The phospholipase A₂ homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Protein and Peptide Letters**, v.16, n.8, p.860-876, 2009.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Ed. Plantarum, Nova Odessa-SP. p. 392, 1991.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.
- MACKESSY, S.P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, n. 3-4, p. 147-159, 2006.
- MALLIKA, J.; SHYAMALA, D. C. S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 156-163, 2006.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749 - 1800, 1998.
- MARTINS, A. M. C.; SOUSA, F. C. M; BARBOSA, P. S. F et al. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v.46, p.595-599, 2005.
- MATOS, F. J. A. **Plantas da medicina popular do Nordeste**. UFC edições. 2a edição. 1999.
- MELO P. A, DO NASCIMENTO M. C, MORS W. B, SUAREZ-KURTZ G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon**, v.32, n.5, p. 595-603, 1994.
- MELO, M. M.; HABERMEHL, G. G.; OLIVEIRA, N. J. F.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, M. M. B.; LÚCIA, M. Treatment of *Bothrops alternatus* envenomation by *Curcuma longa* and *Calendula officinalis* extracts and ar-turmerone. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 7-17, 2005.
- MELO, P. A.; PINHEIRO, D. A.; RICARDO H. D.; FERNANDES, F. F. A.; TOMAZ, M. A.; EL-KIK, C. Z.; STARUCH, M. A.; FONSECA, T. F.; SIFUENTES, D. N, CALILELIAS, S.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; SILVA A. J. M.; COSTA, P. R. R. Ability of a synthetic coumestan to antagonize *Bothrops* snake venom activities. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 488-496, 2010.

- MENDES, M. M.; OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; VALE, L. H. F.; ALCÂNTARA, T. M. ; IZIDORO, L. F. M. ; HAMAGUCHI, A. ; HOMSIBRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous extract. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 7, p. 859- 866, 2008.
- MILNER, S.E.; BRUNTON, N.P.; JONES, P.W.; O'BRIEN, N.M.; COLLINS, S.G.; MAGUIRE, A.R. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.8, p.3454-3484, 2011.
- MOHAPATRA, B.; WARRELL, D. A.; SURaweera, W.; BHATIA, P.; DHINGRA, N, JOTKAR, R. M.; RODRIGUEZ, P. S.; MISHRA, K.; WHITAKER, R, JHA, P. Snakebite mortality in India: a nationally representative mortality survey. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1018, 2011.
- MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 18, p. 2897-2912, 2008.
- MORA, J.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.10, p.e318, 2008.
- MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; ZAMUNÉR, S.R.; PURGATTO, E.; TEIXEIRA, C.F.P. Secretory phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E(2) and D(2) and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v. 52, n.3, p.428–439, 2008.
- MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-642, 2000.
- 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.
- NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F. F, EBLE, J. A, SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 7, p. 683-694, 2011.
- NIÑO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 566-70, 2006.
- NUNEZ, C.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1587–1594, 2001.
- NÚÑEZ, V.; CASTRO, V.; MURILLO, R; PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1017-25, 2005.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; HAMAGUCHI A, D. E ALCÂNTARA, T. M; CLISSA P. B; RODRIGUES V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-569, 2009.

OLIVEIRA, F. N. **Perfil Clínico e Epidemiológico dos Acidentes Ofídicos atendidos e notificados nos Centros de Assistência Toxicológica da Paraíba**. Monografia Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Brasil, 2008.

OPAS (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD). **Informe final de la Consulta Técnica sobre Accidentes con Animales Ponzosñosos en América Latina**. São Paulo: PANAFTOSA; 2007.

OROPEZA, D. D. L.; GONZAGA, R. A.; VILLAFUERTE, Y. N.; VÁSQUEZ, M. V.; TAPIA, J. C. Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. **Diagnostico**, v.38, n.5, 2000.

OSHIMA-FRANCO Y.; ALVES C. M. V.; ANDRÉO FILHO N.; GERENUTTI M.; CINTRA A. C. O.; LEITE G. B.; RODRIGUES-SIMIONI L.; SILVA M. G. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-i, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 465-478, 2005.

OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; NUÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S. P.; GARCIA, M. E.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R. G.; DIAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE, A.; VÉLEZ, H. N. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 493-504, 2000a.

OTERO, R.; NUÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DIAZ, A. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000b.

PANDURANGAN, A.; KHOSA, R. L.; HEMALATHA, S. Antinociceptive activity of steroid alkaloids isolated from *Solanum trilobatum* Linn. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.12, n.8, p. 691-695, 2010.

PERALES, J.; AMORIM, C. Z.; ROCH, S. L. G.; DOMONT, G. B.; MOUSSATCHÉ, H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by na antiothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Agents actions**, v. 37, n .3-4, p. 250-259, 1992.

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, n. 8, p. 666-669, 1998.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDIMANN, E. A. Atualização em Insuficiência Renal Aguda: insuficiência renal após acidente crotálico. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 22(3), p.162-168, 2000.

PINTO, F. C. L.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonóides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284-288, 2011.

PONCE-SOTO, L.A.; BONFIM, V.L.; NOVELLO, J.C.; NAVARRO OVIEDO, R.; YARLEQUÉ CHOCAS, A.; MARANGONI, S. Isolation and Characterization of a Serine

Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. **The Protein Journal**, v. 26, n.6, p.387-394, 2007.

PREMAWARDHENA, A. P.; SILVA, C. E.; FONSEKA, M. M. D.; GUNATILAKE, S. B.; SILVA, H. J. Low dose subcutaneous adrenaline to prevent acute adverse reactions to antivenom serum in people bitten by snakes: randomized, placebo controlled trial. **British Medical Journal**, v. 318, n. 7190, p. 1041-1043, 1999.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 279p.

RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A(2) homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein Journal**, v. 27, n. 6, p. 355-362, 2008.

REYES CHILPA, R.; GOMEZ-GARIBAY, F.; QUIJANO, L.; MAGOS-GUERRERO G. A.; RÍOS T. Preliminary results on the protective effect of (-)-edunol, a pterocarpan from *Brongniartia podalyrioides* (Leguminosae), against *Bothrops atrox* venom in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, n. 3, p. 199-203, 1994.

RIVERO, S. A.; ATAHUACHI, M.; SAVARIA, E.; LOPEZ, A. Diversidad Florística Medicinal y Potencial Etnofarmacológico de Las Plantas de Los Valles Secos de Cochabamba – Bolivia. **Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental**, v. 12, p. 53-85, 2002.

ROBERTSON, T.A.; MALEY, M.A.L.; GROUNDS, M.D.; PAPADIMITRIOU, J.M. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. **Experimental Cell Research**, v. 207, n.2, p. 321–331, 1993.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J F.; BOLDRINI-FRANCA, J; FONSECA, F. P. P.; HAMAGUCHI, A; MAGRO, A J; BRAZ, A S K.; 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-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie** (Paris), v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, V. E. G. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: Editora UFLA, 2001, p. 62-63.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C ; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic Variations In The Composition Of Myotoxins From *Bothrops neuwiedi* Snake Venoms: Biochemical Characterization And Biological Activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, n. 3, p. 215-222, 1998.

RODRIGUES, V.M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R.S.; DE ARAÚJO, A.L.; MALTANETO, N.R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.

- RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; ANDRILAO-ESCARSO, S.H.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase; a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 6, p. 471-479, 2001.
- RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; D AZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 2, p. 121-128, 2002.
- RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; Local Tissue Damage Induced by BaP1, a Metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) Snake Venom. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 63, n. 3, p.186-199, 1995.
- SANTOS FILHO, N.; SILVEIRA, L.; OLIVEIRA, C.; BERNARDES, C.; MENALDO, D.; FULY, A.; ARANTES, E.; SAMPAIO, S.; MAMEDE, C.; BELETTI, M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908-917, 2008.
- SANTOS, M. M. B. **Avaliação clínica e laboratorial de cães tratados com flunixin meglumine, Curcuma longa L. e soro antibotrópico após envenenamento botrópico experimental (*Bothrops alternatus* Duméril, 1854)**. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias) Escola de Veterinária da UFMG, 86.p. 2002.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.
- SERRANO, S. M. T.; JIA, L. G.; WANG, D.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W. Function of the cysteine-rich domain of the hemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 1, p. 69-76, 2005.
- SERRANO, S. M.; KIM, J.; WANG, D.; DRAGULEV, B.; SHANNON, J. D.; MANN, H. H.; VEIT, G.; WAGENER, R.; KOCH, M.; FOX, J. W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39746-39756, 2006.
- SILVA, T. M. S.; CÂMARA, C. A.; AGRA, M. F.; CARVALHO, M. G.; FRANA, M. T.; BRANDOLINE, S. V. P. B.; PASCHOAL, L. S. & BRAZ-FILHO, R. Molluscicidal activity of *Solanum* species of the Northeast of Brazil on *Biomphalaria glabrata*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 449- 452, 2006.
- SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; FREIRE, K. R. L.; SILVA, T. G.; AGRA, M. F. & BHATTACHARYYA, J. Steroidal Glycoalkaloids and Molluscicidal Activity of *Solanum asperum* Rich. Fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 1048-1052, 2008.
- SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n. 1. p. 45-90, 2008.
- SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v.4, n.11, p.616-627, 2008.
- SOARES, A M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications on phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

- SOARES, A. M.; TICLI, F. K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M. V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 2625-2641, 2005.
- SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a lysine-49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p.201-209, 2000.
- STEHMANN, J. R.; MENTZ, L. A.; AGRA, M. F.; VIGNOLI-SILVA, M. ; GIACOMIN, L. L. **Lista de espécies da flora do Brasil: Solanaceae**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
- SUN, L.; ZHAO, Y.; LI, X.; YUAN, H.; CHENG, A.; LOU, H. A lysosomal-mitochondrial death pathway is induced by solamargine in human K562 leukemia cells. **Toxicology in Vitro**, v.24, n. 6, p.1504-1511, 2010.
- TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-61, 2005.
- TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* Venom. **Toxicon**, v. 54, n.1, p. 67-76, 2009.
- TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003a.
- TEIXEIRA, C. F.; ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.; GUTIERREZ, J. M. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 4, p. 449-459, 2003b.
- TICLI F.K.; HAGE, L.I.; CAMBRAIA, R.S.; PEREIRA, P.S.; MAGRO, A.J.; FONTES, M.R.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. – Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 318-27, 2005.
- TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 27, n. 7, p. 1022-1032, 1995
- TREBIEN, H. A.; CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents actions**, v. 26, n. 3-4, p. 292-300, 1989.
- WARELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.
- WARRELL, D. A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes, **British Medical Journal** v. 26, n. 331, p. 1244-1247, 2005.
- WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951–96, 2005.
- WHO, **Rabies and Envenomings: A Neglected Public Health Issue**, Report of a consultative meeting, WHO, Geneva, Switzerland, 2007.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WU, W.B.; HUANG, T.F. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase induced endothelial cell apoptosis. **Experimental Cell Research**, v.288, n.1, p.143-157, 2003.

XIMENES, R. M. **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**. 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

YOU, W.K.; SEO, H.J.; CHUNG, K.H; KIM, D.S. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. **Journal of Biochemistry**, v.134, n.5, p.739-749, 2003.

ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, A. S.; TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions peritoneal leucocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1505-1513, 2001.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, N. 3, p. 335-346, 2005.