



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

ALCÍNIA BRAGA DE LIMA ARRUDA

**ESTUDO DAS ATIVIDADES DAS CABENEGRINAS A-I E A-II
FRENTE AOS EFEITOS HEMATOLÓGICOS E
HISTOLÓGICOS INDUZIDOS PELO VENENO TOTAL E
FRAÇÕES DA SERPENTE *Bothrops neuwiedi* EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Fortaleza

2011

ALCÍNIA BRAGA DE LIMA ARRUDA

**ESTUDO DAS ATIVIDADES DAS CABENEGRINAS A-I E A-II
FRENTE AOS EFEITOS HEMATOLÓGICOS E
HISTOLÓGICOS INDUZIDOS PELO VENENO TOTAL E
FRAÇÕES DA SERPENTE *Bothrops neuwiedi* EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: **Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro**
Co-orientadora: **Profa. Dra. Iêda Pereira de Souza**

Fortaleza
2011

A817e Arruda, Alcínia Braga de Lima

Estudo das atividades das cabenegrinas A-I e A-II frente aos efeitos hematológicos e histológicos induzidos pelo veneno total e frações da serpente *Bothrops neuwiedi* em camundongos *Swiss* e / Alcínia Braga de Lima Arruda. – Fortaleza, 2011.
167 f. : Il.

Orientador: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2011

1. Bothrops 2. Venenos de Serpentes 3. Histologia 4. Contagem de Células Sanguíneas I. Monteiro, Helena Serra Azul (orient.) II. Título

CDD: 615.942

ALCÍNIA BRAGA DE LIMA ARRUDA

**ESTUDO DAS ATIVIDADES DAS CABENEGRINAS A-I E A-II FRENTE AOS
EFEITOS HEMATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS INDUZIDOS PELO VENENO
TOTAL E FRAÇÕES DA SERPENTE *Bothrops neuwiedi* EM CAMUNDONGOS
SWISS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Iêda Pereira de Souza (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Morais
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Alcibíades de Veras Lima e Antônia Magalhães. Braga de Lima, exemplos de honestidade e sabedoria, que são o meu alicerce de como ser enquanto pessoa e cidadã.

Ao meu sogro, Antônio Arruda Neto, que não desiste de lutar pela vida.

Aos meus filhos: Amanda Arruda, Leonardo Arruda e Alessandra Arruda, por terem suportado a minha ausência e por serem a luz da minha vida.

Ao meu esposo, Esmerino Linhares Arruda, pessoa que amo, que me motiva e fortalece em todos os momentos da minha vida.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- ❖ Primeiramente a DEUS, por tudo!
- ❖ À Prof^ª. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pelo convívio, ensinamentos, estímulo constante e pela realização deste sonho. Mesmo cheia de problemas, sempre estava disponível. Obrigada!
- ❖ À Prof^ª. Dra. Iêda Pereira de Souza pela amizade, dedicação e pela imensurável colaboração na realização dos experimentos. Não tenho como agradecer sua ajuda!
- ❖ À Prof^ª. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves pela amizade, pelos conselhos e valiosas sugestões.
- ❖ À Prof^ª. Dra. Janaína S. A. Monteiro Evangelista pela realização das técnicas histológicas e pela brilhante ajuda na interpretação das lâminas. Foram sábados maravilhosos de conversas e ensinamentos. Espero que a amizade que nasceu dessa convivência seja duradoura.
- ❖ Ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes e a Roberta Jeane Bezerra Jorge pela realização das técnicas histológicas.
- ❖ Às Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes e Profa. Dra. Alice Maria C. Martins por terem aceito o convite de participar da banca examinadora.
- ❖ Ao Prof. Dr. Edilbero R. Silveira. Prof^ª. Dra. Renata M. Araújo e aluna Nayara C. de Aquino pelo isolamento e concessão das amostras de cabenegrinas.
- ❖ Aos Professores Dra. Alice Maria C. Martins, Dra. Maria Goretti R. Queiroz, Dra. Rita de Cássia C. Barbosa e Said G. da Cruz Fonseca por permitir o uso dos equipamentos de seus laboratórios.
- ❖ Aos alunos Renata Maria S. Saraiva, Venúcia M. Pereira, Daniel Freire de Sousa, Jamile Magalhães Ferreira e Claudenio Diogenes Alves pela ajuda com os animais.
- ❖ Ao Técnico Antônio Eduardo Costa Barros pela auxílio constante.
- ❖ A secretaria Áurea Rhanes por estar sempre disponível na hora que precisei.
- ❖ Aos amigos, docentes e funcionários do DACT/FFOE/UFC pelo apoio e amizade. E, em especial, a chefe do DACT, Prof.^a Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho, pelo apoio para eu finalizasse a tese.
- ❖ A Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização deste curso.
- ❖ Ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, na pessoa de seus professores e funcionários pelos ensinamentos e pela convivência.

- ❖ Aos meus irmãos, Graça Fernandes, Alcíades Lima, Alciano Lima, Alciani Saraiva, Alcibíades Lima e Alci Lima pelo carinho, companheirismo, apoio e momentos maravilhosos aos domingos à noite. Amo vocês !!!!
- ❖ Aos meus cunhados, cunhadas e sobrinhos (família Lima) pela força. E, em especial, ao Esiel Paulo Fernandes pela colaboração na tradução.
- ❖ Aos meus sogros, cunhados, cunhadas e sobrinhos (família Arruda) pelas palavras de estímulo.
- ❖ A Karliana A. da Silva, que cuidou dos meus filhos nos momentos de minha ausência.
- ❖ A toda minha família e amigos, que apesar de longe, estiveram sempre torcendo por mim.
- ❖ Aos funcionários do Biotério.
- ❖ Aos animais que cederam suas vidas em prol do avanço científico, em benefício do ser humano.
- ❖ A todos àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desta tese.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.

Não na vitória propriamente dita.”

M. Gandhi

RESUMO

A serpente *Bothrops neuwiedi* possui veneno que tem ação principalmente do tipo pró-coagulante, hemorrágica e proteolítica. O veneno da *Bothrops neuwiedi* quando inoculado, possui ação primariamente local e secundariamente sistêmica. Os efeitos sistêmicos do envenenamento compreendem alterações em diferentes sistemas como: hematológico, cardiovascular, hepático, urinário, respiratório, imunológico, digestório e nervoso. Os mecanismos que ocasionam tais alterações são complexos e os vários componentes tóxicos dos venenos podem agir direta ou indiretamente nas células. Este trabalho teve como objetivo investigar as possíveis alterações hematológicas e histológicas induzidas pelo veneno total e pelas frações fosfolipase A₂ e lectina C da serpente *Bothrops neuwiedi*, nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas em camundongos *Swiss* e avaliar as cabenegrinas A-I e A-II na neutralização das atividades biológicas do veneno total da serpente *Bothrops neuwiedi* analisando seu potencial antiofídico para possível complementação da soroterapia. Foram estudadas as ações do veneno total, fosfolipase A₂ e lectina C sobre o sistema hematológico, avaliando o hemograma, mielograma e esplenograma em diferentes tempos. O hemograma foi realizado pelo contador de células sanguíneas Sysmex-Roche, modelo KX-21N, o mielograma através da contagem diferencial e morfológica das células da medula óssea através de lâminas obtidas após citocentrifugação (centrífuga citológica modelo Incibrás) e o esplenograma através da quantificação e morfologia das células em “imprint” do baço. Após o estudo hematológico, rins, baço, fígado e coração foram submetidos à análise histológica. Todos os parâmetros estudados foram analisados pelo teste de ANOVA e pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$. Os resultados mostraram que as principais alterações quantitativas nas células hematológicas com o uso do veneno total e as frações lectina C e fosfolipase A₂ da serpente *Bothrops neuwiedi* foram: discreto aumento do número de hemácias e no hematócrito, leucocitose e plaquetopenia no sangue periférico; aumento das células eritróides e mielóides no mielograma e aumento das células mielóides no esplenograma. Estas alterações foram mais evidentes nos tempo de duas e quatro horas após o envenenamento. As alterações histológicas no baço, rins, coração e fígado, caracterizaram-se principalmente, por congestão, edema intersticial, hemorragia, degeneração hidrópica e processo inflamatório. Quando os animais foram tratados com as cabenegrinas, foi verificado que estas não conseguiram reverter às alterações quantitativas das células no baço provocadas pelo veneno total. Porém, as cabenegrinas A-I e A-II em todas as diluições utilizadas foram capazes de inibir a plaquetopenia, reduzir o aumento da concentração de células mielóides no mielograma e reverter todas as alterações histológicas encontradas em todos os órgãos estudados. Também foi visto que a cabenegrina A-I na diluição 2,5:1 e as cabenegrinas A-II nas diluições 2,5:1 e 5:1 neutralizaram as alterações na contagem diferencial, ou seja, as referidas cabenegrinas diminuíram o número de neutrófilos segmentados, refletindo também no número de neutrófilos totais. Estes resultados sugerem que as cabenegrinas A-I e A-II poderão no futuro ser utilizadas como coadjuvantes no tratamento do acidente provocado pela serpente *Bothrops neuwiedi*.

Palavras chaves: Bothrops; Venenos de Serpentes; Histologia; Contagem de Células Sanguíneas

ABSTRACT

The venom of the *Bothrops neuwiedi* provokes an action mainly of the hemorrhagic, proteolytic and coagulant type. When inoculated, the venom cause primarily a local action, and secondarily a systemic action. The systemic effects of poisoning include changes in various systems such as hematological, cardiovascular, liver, urinary, respiratory, immune, digestive and nervous. The mechanisms that cause the changes are complex and the various toxic components of the venom may act directly or indirectly on the cells. This study aimed first to investigate possible histological and hematological caused by the whole venom and by the phospholipase A₂ and lectin C fractions from *Bothrops neuwiedi* snake, at 2, 4, 8, 16 and 24 hours intervals in mice, and then evaluate the cabenegrins A-I and A-II in the neutralization of the biological activities of the snake whole venom, analyzing its anti-ophidian potential for possible complementation of serum therapy. We studied the actions of the whole venom and of the phospholipase A₂ and lectin C fractions on the hematological system, evaluating the hemogram, the myelogram and the splenogram, at different times. The hemogram was performed by the Sysmex-Roche blood cell counter model KX-21N; the myelogram was performed through the differential and morphological count of bone marrow cells using slides obtained after cytopsin (using Cytological Centrifuge model Incibrás); and the splenogram, by quantifying and morphology of the cells in "imprint" of the spleen. After the hematological study, the kidneys, spleen, liver and heart were subjected to histological analysis. All studied parameters were analyzed by the ANOVA test and by the nonparametric Kruskal-Wallis exact test, with $p < 0.05$. The results showed that main quantitative changes in the hematological cells, using the whole venom and the phospholipase A₂ and lectin C fractions were: slight increase in erythrocytes and hematocrit, leukocytosis and thrombocytopenia, with repercussion in the peripheral blood; increase of erythroid and myeloid cells in myelogram and increase in myeloid cells in the splenogram. These changes were more evident two and four hours after the poisoning. The histological changes in the kidneys, spleen, liver and heart were characterized mainly by congestion, interstitial edema, hemorrhage, hydropic degeneration and inflammatory process. When animals were treated with cabenegrins it was detected that these could not revert the quantitative changes of the spleen cells caused by the whole venom. However, all dilutions of cabenegrins AI and A-II were able to inhibit the thrombocytopenia and the increase of myeloid cells in the myelogram, and reverse all the histological changes found in all the studied organs. The treatment with cabenegrins also showed that the cabenegrins A-I (in the 2.5:1 dilution) and the cabenegrins A-II (in the 2.5:1 and 5:1 dilutions) neutralized the changes in the differential count, i.e., these cabenegrins decreased the number of segmented neutrophils, reflecting in the total number of neutrophils. These results suggest that the cabenegrins AI and A-II may be used in the future as an adjunctive treatment of treatment of snake accidents caused by *Bothrops neuwiedi*.

Keywords: *Bothrops*; Snake Venoms, Histology, Blood Cell Count

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Presença da fosseta loreal na serpente peçonhenta.....	22
Figura 2 – Tipos de caudas de serpentes peçonhentas.....	22
Figura 3 – Tipos de dentição de serpentes peçonhentas e não peçonhentas.....	22
Figura 4 – Foto da serpente <i>Bothrops neuwiedi</i>.....	27
Figura 5 – Representação esquemática dos principais componentes protéicos e não protéicos do veneno viperídico.....	30
Figura 6 – Foto das diversas partes da <i>Harpalyce brasiliana</i>.....	55
Figura 7 – Estrutura das cabenegrinas I e II.....	56
Figura 8 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas comparados com o grupo controle.....	71
Figura 9 – Estudo da contagem diferencial de leucócitos, através do leucograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas comparados com o grupo controle.....	72
Figura 10 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas comparados com o grupo controle.....	73
Figura 11 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas comparados com o grupo controle.....	74
Figura 12 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	76
Figura 13 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com lectina (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	77
Figura 14 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	78
Figura 15 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase A ₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.....	79
Figura 16 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase A ₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle.....	80

Figura 17 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> , cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas comparados com o grupo controle.....	81
Figura 18 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	83
Figura 19 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com lectina (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	84
Figura 20 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	85
Figura 21 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase A ₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.....	86
Figura 22 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle.....	87
Figura 23 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> , cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.....	88
Figura 24 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	90
Figura 25 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com lectina (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	91
Figura 26 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	92
Figura 27 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase A ₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.....	93
Figura 28 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase A ₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle.....	94
Figura 29 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ e lectina (doses 4,68 e 4,0 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	95

Figura 30 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparado com o grupo controle.....	96
Figura 31 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> , cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.....	97
Figura 32 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	100
Figura 33 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com lectina (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	101
Figura 34 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente <i>B. neuwiedi</i> nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.....	102
Figura 35 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase A ₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.....	103
Figura 36 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total, lectina e fosfolipase A ₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente <i>B. neuwiedi</i> no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle.....	104
Figura 37 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos <i>Swiss</i> tratados com veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> , cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.....	105
Figuras 38 a 41 - Fotomicrografia de rim de camundongo evidenciando os glomérulos e túbulos renais normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A ₂ da serpente <i>B. neuwiedi</i>	107
Figuras 42 e 45 - Fotomicrografia de fígado de camundongo evidenciando os hepatócitos normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A ₂ da serpente <i>B. neuwiedi</i>	108
Figuras 46 a 49 - Fotomicrografia de coração de camundongo evidenciando as fibras cardíacas normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A ₂ da serpente <i>B. neuwiedi</i>	109
Figuras 50 a 53 - Fotomicrografia do baço de camundongo evidenciando a polpa vermelha e a polpa branca normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A ₂ da serpente <i>B. neuwiedi</i>	110
Figuras 54 a 57 - Fotomicrografia de rim de camundongo evidenciando os glomérulos e os túbulos renais normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina da serpente <i>B. neuwiedi</i>	111

Figuras 58 a 61- Fotomicrografia de fígado de camundongo evidenciando os hepatócitos normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina da serpente <i>B. neuwiedi</i>	112
Figuras 62 a 65 - Fotomicrografia de coração de camundongo evidenciando as fibras cardíacas normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina da serpente <i>B. neuwiedi</i>	113
Figuras 66 a 69 - Fotomicrografia do baço de camundongo evidenciando a polpa vermelha e a polpa branca normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina da serpente <i>B. neuwiedi</i>	114
Figuras 70 a 73 - Fotomicrografia de rim de camundongo evidenciando os glomérulos e túbulos renais normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i>	115
Figuras 74 a 77 - Fotomicrografia de fígado de camundongo evidenciando os hepatócitos normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i>	116
Figuras 78 a 81 - Fotomicrografia de coração de camundongo evidenciando as fibras cardíacas normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i>	117
Figura 82 a 85 - Fotomicrografia do baço de camundongo evidenciando a polpa vermelha e a polpa branca normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i>	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

ADP - Adenosina difosfato

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

Arg - Arginina

Asp - asparatato

AST - Aspartato aminotransferase

B - Bothrops

BaspTX-II - Miotoxina-II isolada da *Bothrops asper*

BmTx - Miotoxina da *Bothrops moojeni*

BnSP-6 - Miotoxina isolada da *Bothrops neuwiedi pauloensis*

BnSP-7 - Miotoxina isolada da *Bothrops neuwiedi pauloensis*

BthTX-I - Miotoxina bothropstoxin-I isolada da *Bothrops jararacussu*

BthTX-II - Miotoxina bothropstoxin-II isolada da *Bothrops jararacussu*

Bap1 - Metaloproteinase hemorrágica

C3 - Complemento 3

Cab - Cabenegrinas

Cab A-I e T - Cabenegrina I e tween

Cab A-II e T - Cabenegrina II e tween

Cel - Células

CE - Concentração Efetiva

CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

CIVD - Coagulação intravascular disseminada

CK - Creatina quinase

COBEA - Colégio Brasileira de Experimentação Animal

CRD - Domínio de reconhecimento de carboidrato

CuHL - Lectina da *Agkistrodon contortrix contortrix*

CV - Coeficiente de variação

DL₅₀ - Dose letal 50%

DMC - Dose Mínima Coagulante

DMH - Dose Mínima Hemorrágica
DP - Desvio padrão
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
E.P.M. - Erro padrão da média
F(ab') - Fragmento da molécula de anticorpo de IgG
Fc - Fragmento constante
FOS - Fosfolipase
FUNASA - Fundação Nacional de Saúde
FUNED - Fundação Ezequiel Dias
gD - glândula de Duvernoy
gsd - glândula supralabial
gv - glândula venenosa
Gly – Glicina
GP - Glicoproteína
H.E.- Hematoxilina-eosina
HCM - Hemoglobina corpuscular média
His - Histidina
HISTOVESP - Histologia dos Efeitos Causados pelos Venenos de Serpentes e Plantas
HSP32 - Heat shock protein 32
HSP70 - Heat shock protein 70
IB - Instituto Butantan
i.d.- Intradérmico
IgG - Imunoglobulina G
IL-1 - Interleucina 1
IL-6 - Interleucina 6
IL-8 - Interleucina 8
IRA - Insuficiência renal aguda
i.p. - Intraperitoneal
IVB - Instituto Vital Brasil
Lec - Lectina
LM-TL - *Lachesis muta* thrombin-like enzyme
Lys - Lisina
MjTX-I e II - Miotoxina-I e II isoladas da *Bothrops moojeni*
MS - Ministério da Saúde

NaCl - Cloreto de sódio
NCAM - Molécula de adesão de célula neural
NTA - Necrose tubular aguda
OMS - Organização Mundial da Saúde
PLA₂ - Fosfolipase A₂
PrTX-I - Miotoxina piratoxina-I isolada da *Bothrops pirajai*
rpm - Rotação por minuto
SBH - Sociedade Brasileira de Herpetologia
Ser - Serina
SESA - Secretaria de Saúde do Estado
Sn - Sequentially numbered
SD - Desvio padrão
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TI-Bp - Trombina 1 *Bothrops pauloensis*
TCA - Ácido tricloroacético
TL - Trombolectina
Tween 80 - Polissorbato 80
UI - Unidade internacional
UNESP – Universidade Estadual de São Paulo
v - Volume
VCM - Volume corpuscular médio
Vt - Veneno total

LISTA SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

cm - Centímetro

dL - Decilitro

$^{\circ}\text{C}$ - Grau centígrado

fL - Fentolitro

g - Grama

h - Hora

kDa - Kilodalton

Kg - Kilograma

μ - Mícron

μg - Micrograma

μL - Microlitro

m - Massa

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm^3 - Milímetros cúbicos

pg - Picograma

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Classificação das Serpentes	21
1.2 Epidemiologia	24
1.3 Distribuição e Características das Serpentes do Gênero <i>Bothrops</i>	25
1.4 Características gerais e composição dos Venenos Ofídicos	28
1.4.1 Principais componentes dos venenos viperídicos	31
1.4.1.1 Metaloproteases	31
1.4.1.2 Serinoproteases	33
1.4.1.3 Lectina C	35
1.4.1.4 Fosfolipase A ₂	37
1.5 Alterações Clínicas e Patológicas no Envenenamento Botrópico	41
1.5.1 Alterações histológicas no fígado, baço, coração e rins após envenenamento	43
1.5.2 Alterações hematológicas após envenenamento	45
1.6 Agentes Antiofídicos	48
1.6.1 Soroterapia.	48
1.6.2 Potencial Antiofídico de Extratos Vegetais	51
1.6.3 <i>Harpalyce Brasiliana</i> Benth	54
2 OBJETIVOS	59
2.1 Objetivo Geral	59
2.2 Objetivos específicos.	59
3 MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1 Animais Experimentais	60
3.2 Veneno	60
3.3 Cabenegrinas A-I e A-II	60
3.4 Envenenamento Experimental	61
3.5 Procedimento experimental para neutralização usando as cabenegrinas A-I e A-II	63
3.6 Coleta do material para a realização do hemograma, mielograma, esplenograma e exame histológico	65
3.7 Determinações Laboratoriais	66
3.7.1 Análise Hematológica	66
3.7.1.1 Hemograma	66
3.7.1.2 Mielograma	67
3.7.1.3 Esplenograma	68
3.7.1.4 Critérios para classificação das células hematopoiéticas	68
3.7.1.4.1 Relação mielóide-eritróide	69
3.7.1.4.2 Relação linfóide-eritróide	69
3.8 Análise Histológica	69
3.9 Reagentes Utilizados nos Experimentos	70
3.10 Análise Estatística	70
4 RESULTADOS	71

4.1 Resultados do hemograma, mielograma e esplenograma dos camundongos <i>Swiss</i> tratados com salina, tween, cabenegrina A-I com tween e cabenegrina A-II com tween	71
4.2 Resultados do hemograma dos camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ , lectina C e veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II	76
4.3 Resultados do mielograma dos camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ , lectina C e veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II	90
4.4 Resultados do esplenograma dos camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ , lectina C e veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II	100
4.5 Resultados das análises histológicas dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> tratados com fosfolipase A ₂ , lectina C e veneno total da serpente <i>B. neuwiedi</i> em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II	107
5 DISCUSSÃO	120
5.1 Alterações da série vermelha	120
5.2 Alterações da série branca	123
5.3 Alterações da série plaquetária	125
5.4 Alterações das células da medula óssea	127
5.5 Alterações das células do baço	129
5.6 Alterações histológicas	131
5.7 Tratamento com as cabenegrinas	134
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
7 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
APÊNDICES	160
ANEXO	166

1 INTRODUÇÃO

1.1 Classificação das serpentes

As serpentes são ofídios vertebrados que compõem à classe *Reptila*, subclasse *Lepidosauria*, ordem *Squamata* e subordem Serpentes. No mundo, são conhecidas cerca de 3.000 espécies de serpentes, distribuídas entre 465 gêneros e 20 famílias. Dentre as 3.000 espécies, 10 a 14% são consideradas peçonhentas (PINHO; OLIVEIRA; FALEIROS, 2004).

Serpentes peçonhentas são aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm estruturas apropriadas (ferrões, dentes, espinhos) para inoculá-las, ocasionando intoxicações sérias no homem e em outras espécies animais. Existem algumas características importantes que distinguem as serpentes peçonhentas das não peçonhentas: a presença da fosseta loreal, particularidades da cauda, da cabeça, da dentição e dos olhos (CARDOSO, 2003).

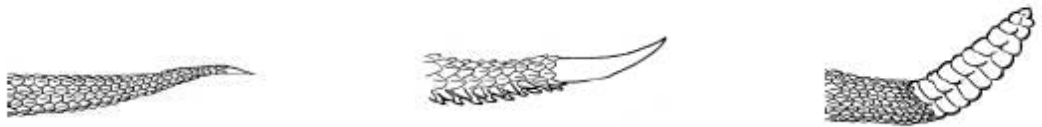
A fosseta loreal, localizada entre as narinas e os olhos, é uma membrana rica em terminações nervosas ligadas ao cérebro, funcionando como um órgão termo sensorial, está presente somente nas serpentes peçonhentas (Figura 1). As serpentes do gênero *Micrurus* são uma exceção, pois, apesar de serem peçonhentas, não apresentam fosseta loreal e possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos. Dentre as serpentes com fosseta loreal, as que possuem cauda lisa são as do gênero *Bothrops*, as com chocalho na cauda são do gênero *Crotalus* e as com cauda com escamas arrepiadas são do gênero *Lachesis* (Figura 2) (PINHO; PEREIRA, 2001).

Com relação à dentição (Figura 3), esta pode ser de quatro tipos; áglifa, opistóglifa, proteróglifa e solenóglifa. A dentição áglifa se caracteriza por um maxilar sem dentes sulcados para inoculação do veneno, podem ou não ter glândulas de veneno enquanto que na dentição opistóglifa os dentes inoculadores estão localizados na região posterior do maxilar (PINHO; PEREIRA, 2001).

A dentição proteróglifa se caracteriza por dentes pequenos e maciços, um par de dentes dianteiros semi-caniculados de tamanho semelhante aos outros e que limita a injeção do veneno. Solenóglifa é um tipo de dentição caracterizada por um par de dentes dianteiros caniculados, maiores que outros dentes e com a capacidade de se movimentarem para frente no momento de injetar o veneno. Tal especialização permite a essa família de serpentes peçonhentas maior eficiência na inoculação da peçonha (YOUNG; KARDONG, 1996).



Figura 1 – Presença da fosseta loreal na serpente peçonhenta
 Fonte: BUONONATO, 2011



Cauda lisa

Cauda em escamas

Cauda em chocalho

Figura 2 – Tipos de caudas de serpentes peçonhentas
 Fonte: BRASIL, 2001

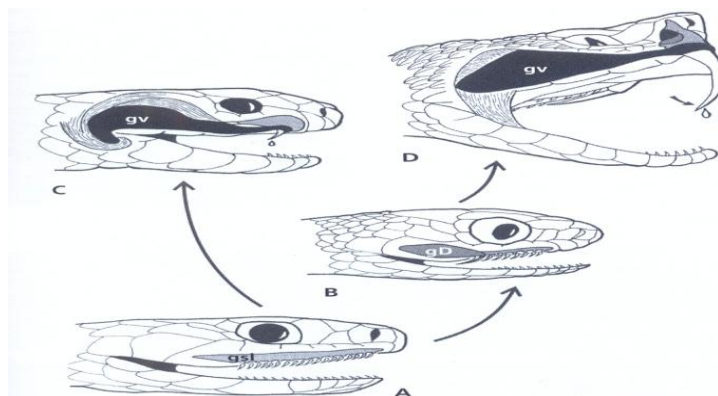


Figura 3 – Tipos de dentição de serpentes peçonhentas e não peçonhentas
 A - dentição áglifa, B - opistóglifa, C - proteróglifa, D - solenóglifa
 gsd - glândula supralabial, gD - glândula de Duvernoy, gv - glândula venenosa
 Fonte: CARDOSO, 2003

As glândulas de peçonha das serpentes derivam das glândulas salivares e estão localizadas atrás dos olhos, na maxila superior. Elas constituem tecido altamente especializado em produzir e armazenar proteínas, secretando-as por meio de contrações musculares no instante da picada. Os mecanismos que regulam a produção de peçonha nestas glândulas são desconhecidos, sabendo-se apenas que sua produção depende da concentração de material protéico armazenado no lúmen glandular (JUNQUEIRA DE AZEVEDO; HO, 2002).

Com relação ao corpo e aos olhos, as serpentes peçonhentas têm o corpo de espessura grossa e não muito alongado, a cauda é curta e afina bruscamente, a cabeça geralmente é triangular e os olhos têm a pupila em fenda vertical. Enquanto que as serpentes não peçonhentas tem o corpo fino e longo, a cauda é longa e afina gradualmente, a cabeça geralmente é arredondada e os olhos têm a pupila arredondada (BARRAVIERA, 1993).

A fauna ofídica no Brasil está representada por aproximadamente 357 espécies, classificadas dentro de 73 gêneros e reunidas em 9 famílias. As espécies de serpentes peçonhentas brasileiras estão reunidas principalmente em duas famílias, Viperidae e Elapidae. A família Elapidae é composta por 18 espécies, todas incluídas no gênero *Micrurus*. As serpentes do gênero *Micrurus* são conhecidas como corais verdadeiras e encontram-se amplamente distribuídas no Brasil. Seu veneno é fortemente neurotóxico, com ação pré e pós sináptica (BRASIL, 2001).

A família Viperidae é composta pelos gêneros *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, dos quais apenas os três últimos adquirem importância epidemiológica. O gênero *Bothrops* ocorre em todo o território nacional enquanto que, o *Lachesis* em áreas úmidas, em regiões de floresta e na região Amazônica. Em contraste, o gênero *Crotalus* não é encontrado nestas regiões e no litoral, sendo encontrado preferencialmente em áreas secas. Os venenos de serpentes da família Viperidae se caracterizam por efeitos proteolíticos intensos, sistêmicos e locais, como hemorragia, edema, necrose e coagulação sanguínea (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

1.2 Epidemiologia

Os acidentes ofídicos representam um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, dada à incidência de casos, a gravidade e as sequelas que causam. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram aproximadamente 5.000.000 de acidentes ofídicos por ano no mundo, ocasionando 50.000 mortes especialmente nas áreas rurais de países tropicais da Ásia, África e América do Sul (CHIPPAUX, 1998). A mortalidade é maior na Ásia e na África. No Brasil, o Ministério da Saúde contabiliza 20.000 acidentes ofídicos por ano, com uma média de 120 vítimas fatais. No período de 2000 a 2009 foram registrados no nosso país 242.128 acidentes ofídicos (SINAN, 2011).

Existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes no mundo das quais 10% a 14% são consideradas peçonhentas. As serpentes peçonhentas foram classificadas de acordo com as suas características morfológicas, em quatro famílias: Vipiridae, Elapidae, Hydrophidae e Colubriadae (BARRAVIERA, 1993).

Como citado anteriormente, em nosso país, duas famílias de serpentes são de interesse em saúde pública, a Elapidea e a Viperidae. A família Viperidae é formada pelos gêneros *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* enquanto que a família Elapidea é formada pelo gênero *Micrurus* (BRASIL, 2001). Dentre os gêneros existentes no Brasil destaca-se o *Bothrops* que é responsável por 90% dos acidentes no país, o gênero *Crotalus* responsável por 9% e os gêneros *Lachesis* e *Micrurus* responsáveis por 1% e 0,5% dos acidentes, respectivamente (BARRAVIEIRA, 1993).

Na América do Sul, o Brasil é o país com maior número de acidentes com cerca de 20.000 casos por ano, seguido pelo Peru (4.500), Venezuela (2.500 a 3.000), Colômbia (2.675), Equador (1.200 a 1.400) e Argentina (1.150 a 1.250) (Brasil, 2001; SINAN, 2001).

Dados epidemiológicos mostram que a ocorrência do acidente ofídico no Brasil está, em geral, relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos no campo, acometendo preferencialmente indivíduos do sexo masculino e com idade variando entre 14 a 49 anos. A parte do corpo mais atingido no acidente são os membros inferiores e superiores com 70,8% e 13,4% dos casos, respectivamente (STRUCHINER; BOCHNER, 2002).

Dentre as regiões do Brasil, a região Nordeste é a que apresenta o menor coeficiente de incidência anual de acidentes ofídicos (7,65 acidentes/100 mil habitantes) quando comparado ao coeficiente nacional, provavelmente devido à subnotificação, tendo em vista as dificuldades de acesso aos serviços de saúde dessa região. Entretanto, segundo o Ministério da

Saúde, é a região Nordeste que detém o maior índice de letalidade (0,81%) em relação às outras regiões do país (Centro-Oeste 0,63%, Norte 0,53%, Sul, 0,33% e Sudeste 0,26%) (BRASIL, 2001).

No Ceará, a notificação dos acidentes ofídicos é realizada pela Secretaria de Saúde do Estado (SESA, 1991), através da Comissão Estadual de Controle de Zoonoses. Entre 1999 a 2003, foram notificados pela Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, 1.203 acidentes ofídicos, resultando em uma incidência média de 3,24 casos de ofidismo a cada 100.000 habitantes. Nesta ocasião, o município de maior incidência de acidentes ofídicos foi Itapiúna, com incidência de 65,13 casos/100.000 habitantes, seguido por Deputado Irapuan Pinheiro (57,24 casos/100.000 habitantes) e Alto Santo (45,47 casos/100.000 habitantes), sendo que a maioria dos acidentes foi provocada por serpentes do gênero *Bothrops*. É importante ressaltar que não foram verificados óbitos neste período (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009).

Dados recentes do Ministério da Saúde, através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação indicaram 22.763 casos de envenenamento no Brasil em 2009, sendo que cerca de 74% foram causados por serpentes do Gênero *Bothrops* (SINAN, 2011).

1.3 Distribuição e características das serpentes do gênero *Bothrops*

O Gênero *Bothrops* pertence à família Viperidae constitui o gênero mais numeroso, com 32 espécies catalogadas. Ocorrem na América Central e América do Sul, ocupando todo território brasileiro. Estas serpentes são conhecidas popularmente como jararaca, caiçara, patrona, combóia, malha de sapo, surucucurana, urutu-cruzeiro e outras denominações. Caracterizam-se por possuírem tamanhos que variam de 40 cm a 2 metros de comprimento, grande variedade de cores e desenhos, a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, cabeça triangular, fosseta loreal que se localiza entre a boca e as narinas e aparelho inoculador do tipo solenóglifo. São consideradas as serpentes mais agressivas do país, quando se sentem ameaçadas, desferem botes sem produzir ruídos. (BARRAVIEIRA, 1993).

São muitas as espécies de serpentes *Bothrops* consideradas de interesse para a saúde pública, com ampla distribuição geográfica. Dentre as espécies destacam-se a *B. atrox* encontradas no Norte do país, *B. erythromelas*, na região Nordeste, *B. jararaca*, na região Sul e Sudeste, *B. jararacussu*, no Cerrado da região Central e em florestas tropicais do Sudeste, *B.*

alternatus, distribuídas no Sul do Brasil e o complexo *B. neuwiedi*, encontradas em todo território nacional, exceto Amazonas (PINHO; PEREIRA, 2001).

O complexo *Bothrops neuwiedi*, assim denominado devido ao grande número de espécies que agrega, distribuiu-se amplamente pela América do Sul. O complexo *B. neuwiedi* era constituído por doze subespécies, a maioria presente no Brasil. Entretanto, com a revisão taxonômica do complexo *B. neuwiedi* realizado por Silva (2000) baseado na análise de múltiplos caracteres morfológicos as doze subespécies passaram a ser consideradas sete espécies distintas: *B. neuwiedi*, *B. diporus*, *B. lutzii*, *B. mattogrossensis*, *B. pauloensis*, *B. pubescens* e *Bothrops marmoratus*. A espécie *B. neuwiedi* reúne, dessa maneira, as antigas *B. n. goyasensis*, *B. n. meridionalis*, *B. n. paranaensis* e *B. n. urutu*, ocorrendo na Bahia, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Paraná. *B. lutzii*, foi elevada à categoria de espécie e sinonimizada com *B. n. neuwiedi*, *B. n. piauyensis* e *B. iglesiasii* com uma ocorrência restrita ao Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia (SILVA; RODRIGUES, 2008). Esta nova classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2005).

Recentemente, Fenwick *et al.* (2009) propuseram uma nova classificação taxonômica para o gênero *Bothrops*, utilizando uma análise combinada de caracteres morfológicos e moleculares de 32 espécies de *Bothrops*, 6 *Bothriopsis* e 5 de *Bothrocophias*. Cada uma das 4 principais linhagens monofiléticas recuperadas foi considerada como um gênero: *Rhinocerophis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* e *Bothropoides*. Dessa forma, o gênero *Rhinocerophis* seria composto pelas espécies do grupo *alternatus* (*B. alternatus*, *B. ammodytoides*, *B. cotiara*, *B. fonsecai*, *B. Itapetinga* e *B. Jonathan*). O gênero *Bothriopsis* ficaria constituído pelas espécies do grupo *taeniatus* (*B. taeniatus*, *B. bilineatus*, *B. medusa*, *B. oligolepis*, *B. peruvianus* e *B. pulcher*). O gênero *Bothrops* ficaria restrito às espécies do grupo *atrox* (*B. atrox*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. colombiensis*, *B. isabele*, *B. asper*, *B. punctatus*, *B. osbornei*, *B. venezuelensis* e *B. moojeni*), às espécies do grupo *jararacussu* (*B. jararacussu*, *B. santaecrucis*, *B. muriciensis*, *B. pirajai* e *B. brazili*) e as espécies do grupo *lanceolatus* (*B. lanceolatus* e *B. caribbaeus*). E, o gênero *Bothropoides* ficaria constituído pelas espécies do grupo *jararaca* (*B. jararaca*, *B. alcatraz* e *B. insularis*) e às espécies do grupo *neuwiedi* (*B. neuwiedi*, *B. pauloensis*, *B. erythromelas*, *B. marmoratus*, *B. mattogrossensis*, *B. diporus*, *B. pubescens* e *B. lutzii*). Assim, a serpente *Bothrops neuwiedi* passaria a ser chamada de *Bothropoides neuwiedi* (FENWICK *et al.* 2009).

Como esta nova classificação taxonômica ainda está em adaptação, optamos neste trabalho, a continuar utilizando a nomenclatura anterior (Silva, 2000), para evitar problemas inerentes à mudança de nomes de espécies.

A serpente *Bothrops neuwiedi* (Figura 4), objeto de estudo neste trabalho, é conhecida popularmente como, jararaca do rabo branco, do rabo de osso, boca de sapo e jararaca pintada, devido ao fato de os jovens e, alguns animais adultos, terem a extremidade da cauda clara, geralmente amarelada. Elas utilizam esta parte branca da cauda para atrair a presa. Elas ficam enrodilhadas movimentando a extremidade clara como se fosse um verme ou uma lagarta, atraindo pequenos lagartos e anfíbios. Estas serpentes chegam a medir 1,60 metros, possuem coloração variável entre cinza, marrom ou pardo de acordo com a subespécie, com manchas triangulares escuras e ventre amarelado. Têm hábitos noturnos ou crepusculares, vivendo preferencialmente em ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores. São encontradas no Brasil, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Argentina. No Brasil, têm distribuição ampla pelo território nacional (com exceção da Amazônia), são encontradas de preferência em lugares secos, pedregosos e até semi-áridos, alimentam-se de pequenos lagartos, pequenos anfíbios e pequenos roedores, têm reprodução vivípara, nascendo de 16 a 20 filhotes no início da estação chuvosa (BELLUOMINI, 1984).

Estas serpentes além de serem muito rápidas no ataque são consideradas espécies das mais perigosas e produzem um bom número de acidentes. Seu veneno possui ação hemolítica, coagulante e proteolítica podendo ocasionar manifestações locais e/ou sistêmicas (BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Em um levantamento realizado por Rojas; Gonçalves; Almeida-Santos (2007) o grupo das serpentes *neuwiedi* foi o terceiro maior responsável pelos acidentes provocados por *Bothrops* no Noroeste do estado de São Paulo, e em algumas regiões chegou a ser o maior responsável, como na região Nordeste.



Figura 4 – Foto da serpente *Bothrops neuwiedi*
Fonte: COSTA, 2011

1.4 Características gerais e composição dos venenos ofídicos

Os venenos das serpentes peçonhentas são produzidos por dois tipos de glândulas: Duvernoy e de peçonha. A glândula Duvernoy é constituída por várias células serosas e não apresenta lúmem para estocagem ou músculo responsável pela liberação de peçonha, sendo a peçonha liberada através da pressão realizada pela mandíbula da serpente no ato da alimentação ou defesa. Por outro lado, a glândula de peçonha possui células de formato triangular e a peçonha produzida é estocada em um grande lúmem. A ejeção e o movimento das presas inoculadoras de peçonha são realizados voluntariamente pelo controle muscular (WEINSTEIN; KARDONG, 1994).

As serpentes do gênero *Bothrops* possuem um par de glândulas exócrinas localizadas junto à margem inferior da mandíbula superior destes animais, sendo estas secreções compostas por uma mistura complexa de moléculas de diferentes naturezas químicas que agem em diversos sistemas biológicos (JUNQUEIRA DE AZEVEDO; HO, 2002). Tais secreções venenosas são produzidas com o objetivo de imobilizar, matar e digerir a presa, acrescido de um efeito defensivo contra predadores (MEBS, 2001).

A peçonha é composta por várias substâncias, cuja proporção e características variam entre famílias, gêneros e espécies e entre as mesmas espécies, a composição do veneno pode variar ainda em função da idade e do sexo do animal, hábitos alimentares, da distribuição geográfica, do caráter individual entre serpentes e sazonalidade. Exemplo disso ocorre nas fêmeas de *B. jararaca*, que produzem cinco vezes mais veneno do que os machos (FURTADO; TRAVAGLIA-CARDOSO; ROCHA, 2006).

É importante ressaltar também, que a intensidade dos sintomas após envenenamento está relacionada com a quantidade de veneno inoculado, que por sua vez, depende do tamanho da serpente, como também, se ela atacou alguma outra presa recentemente (PINHO; PEREIRA, 2001). No caso de serpente do gênero botrópico, há uma diferença entre o veneno do filhote, que é predominantemente coagulante, e do adulto, com maior ação proteolítica e menor ação coagulante (JORGE; RIBEIRO, 1990).

Os componentes do veneno podem ser divididos em uma parte protéica e uma não protéica. A parte protéica representa 90 a 95% do peso seco do veneno e é constituída por uma gama de proteínas com ou sem atividade enzimática e peptídeos, sendo esta responsável por quase a totalidade dos efeitos biológicos do veneno. A parte não protéica do veneno corresponde a cerca de 0,5 a 1% do peso seco do mesmo e é formada por componentes inorgânicos (cálcio, sódio, potássio, fósforo e magnésio e pequenas quantidades de metais

como zinco, ferro, cobre, cobalto e manganês) e componentes orgânicos (aminoácidos livres, citrato, carboidratos, nucleotídeos e aminas biogênicas). Nem todos esses metais são encontrados em todo tipo de veneno e a quantidade de cada metal varia com a espécie de serpente (BJARNASON; FOX, 1994; KARALLIEDDE, 1995).

De acordo com as características estruturais e funcionais, as proteínas enzimáticas presentes nos venenos das serpentes *Bothrops* podem ser divididas em várias classes, como: fosfolipases A₂, nucleotidasas L-aminoácido oxidases, metaloproteases, serinoproteases, hialuronidasas, fosfatases, catalases, etc; agindo de forma isolada ou sinérgica no organismo de suas vítimas (GUTIÉRREZ, 2002). A presença de hialuronidase explica a rapidez da absorção pelo aumento da perfusão através dos tecidos.

As proteínas desprovidas de atividade enzimática dos venenos ofídicos contêm toxinas específicas, que podem afetar funções vitais de nervos, músculos, coração, sangue e permeabilidade das membranas. Merecem destaque as lectinas tipo C, neurotoxinas e cardiotoxinas (GUTIÉRREZ, 2002).

O componente não protéico do veneno botrópico desempenha papel coadjuvante na ação enzimática sendo pouco expressivo em quantidade e em ação biológica. Os constituintes inorgânicos como o cálcio, magnésio e manganês parece ter papel importante na estabilização de certas proteínas do veneno, enquanto que o zinco, cobre, cobalto e ferro possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como as metaloproteases (BRAUD; BON; WISNER, 2000; AIRD, 2002). Dentre os constituintes orgânicos, os aminoácidos se destacam por apresentam atividade biológica. Os venenos contêm somente uma pequena quantidade de aminoácidos livres e 11 desses foram detectados no veneno da *Trimeresurus mucrosquamatus*. Em *Vipera ammodytes* foram encontrados histidina, ácido aspártico, glicina, ácido glutâmico, serina, alanina e espermina (BJARNASON; FOX, 1994).

De forma resumida, a figura 5 a seguir, apresenta os principais componentes protéicos, peptídicos e não-protéicos do veneno viperídico.

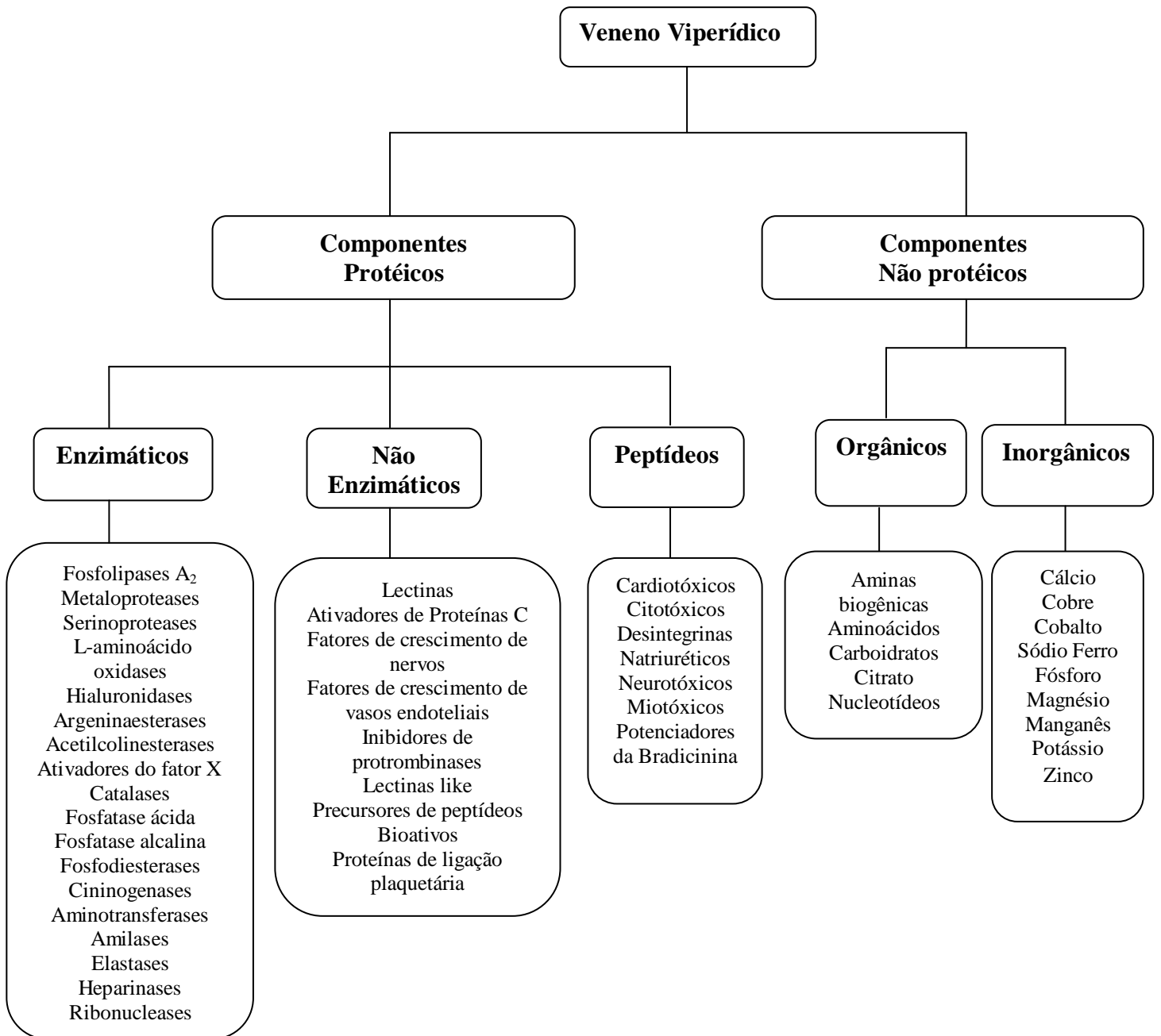


Figura 5 – Representação esquemática dos principais componentes protéicos e não protéicos do veneno viperídico (adaptado de MARKLAND JR, 1998)

1.4.1 Principais componentes dos venenos viperídicos

Entre os componentes presentes nos venenos das serpentes pertencentes à família Viperidae destacam: as fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases e lectina C por apresentarem uma ampla variedade de efeitos biológicos (GUTIÉRREZ, 2002).

1.4.1.1 Metaloproteases

As metaloproteases são proteínas abundantes em venenos de serpentes viperídicas que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico, para manifestação de suas atividades enzimáticas. Elas são importantes na fisiopatologia do envenenamento sendo responsável pela ativação do complemento, edema, hemorragia local e sistêmica e dermonecrose observada nas vítimas. Nos venenos do gênero *Bothrops* estas enzimas provocam hemorragias sérias e, por isso, são classicamente conhecidas por toxinas hemorrágicas ou hemorraginas (SERRANO; FOX, 2005).

No desencadeamento da hemorragia, as metaloproteases agem de duas maneiras inter-relacionadas: por ação direta sobre as células endoteliais dos capilares e degradando a membrana basal. No que se refere à degradação da membrana basal, sabe-se que as metaloproteases atuam degradando proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno do tipo IV, fibronectina e a laminina (KAMIGUTI, 2005). A destruição da membrana basal e da matriz extracelular leva a um conseqüente descolamento e lise das células endoteliais dos capilares, resultando na morte destas células e no extravasamento de plasma e de células sanguíneas para o tecido conectivo, caracterizando um tipo de hemorragia por ruptura (SERRANO; SAMPAIO; MANDELBAUM, 1993).

As metaloproteases são classificadas de acordo com sua massa molecular e organização desses domínios, em quatro grupos: classe P-I, classe P-II, classe P-III e classe P-IV. As proteases da classe P-I apresentam baixo peso molecular (20 a 30 kDa), possuem apenas um domínio metaloprotease e a ação hemorrágica é baixa ou ausente, mas induzem lesão local (GUTIÉRREZ; RUNCAVADO, 2000).

Na classe P-II estão as proteases com massas moleculares variando de 30 a 60 kDa e com alta atividade hemorrágica. Estas proteases possuem além do domínio metaloprotease um domínio tipo “desintegrina” (responsável pela inibição da agregação plaquetária por ligar-se ao receptor GB α Ib/ β III da plaqueta impedindo a ligação com a molécula de fibrinogênio) (GUTIÉRREZ; RUNCAVADO, 2000; FOX; SERRANO, 2008).

As metaloproteases pertencentes à classe P-III possuem massa variando de 60 a 90 kDa, são altamente hemorrágicas e contêm três domínios, “o metaloproteásico”, o tipo “desintegrina e o carboxi-terminal rico em cisteína”, parece que este domínio tem a função de estabilizar o domínio tipo “desintegrina” (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; FOX; SERRANO, 2008).

Na classe P-IV, estão às proteases com massa superior a 90 kDa, mas com pequena atividade hemorrágica. Possuem além dos três domínios anteriormente citados, dois domínios lectina, que atuam como marcador para alvo de proteólise (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Dentre as proteases, existem as enzimas fibrinogenolíticas que clivam preferencialmente as cadeias α da fibrina e do fibrinogênio e mais lentamente a cadeia β destas proteínas, levando a incoagulabilidade sanguínea (MARKLAND JR, 1991). Como exemplos de proteínas dessa classe, destacam-se a Bap1 isolada de *Bothrops asper* e a neuwiedase purificada a partir da *Bothrops pauloensis*.

A neuwiedase é uma metaloprotease dependente de zinco para exercer seu efeito catalítico, representa 4,5% do peso seco do veneno de *Bothrops pauloensis* e sua massa molecular é de aproximadamente 24 a 25 kDa (RODRIGUES *et al.*, 2000). É uma α -fibrinogenase pertencente à classe P-I, que degrada preferencialmente à cadeia A do fibrinogênio, sendo também capaz de degradar a cadeia B β e não interferir com a cadeia γ . Esta protease é isenta de atividade hemorrágica em teste subcutâneo, mas capaz de induzir hemorragia local e pulmonar quando aplicada via intramuscular e intravenosa, respectivamente (BALDO *et al.*, 2008).

A neuwiedase é capaz de degradar alguns componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo IV, laminina e fibronectina agravando a hemorragia. Quando inoculada em altas doses por via intramuscular, a neuwiedase induz reações inflamatórias concomitantes a mionecrose, as quais são caracterizadas pela presença de um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares. Essa protease também induz edema de pata de camundongos cujas bases farmacológicas ainda não foram elucidadas, embora se saiba que essa atividade é inibida por agentes quelantes (RODRIGUES *et al.*, 2000).

Outro grupo de proteases são as inibidoras de agregação plaquetária, denominadas como “desintegrina-like”. Elas atuam interagindo especificamente com as plaquetas, via receptores glicoprotéicos α II β 3 ou α 2 β 1 (GP Iib-IIIa), induzindo o efeito anti-agregante (ANDREWS; BERNDT, 2000). Já as proteínas “lectin-like” são proteases que se ligam a motivos de lactose e induzem aglutinação de eritrócitos e agregação plaquetária. Estas

proteínas são encontradas em peçonhas elapídicas, crotalídicas e viperídicas (OLGIVE; BYL; GARTNER, 1989).

Assakura *et al.* (1985) isolaram uma metaloprotease da *B. moojeni* denominada protease A. Esta metaloprotease tem atividade proteolítica na caseína e a presença de cálcio aumenta a sua atividade. Ocasionalmente hidrolisa a gelatina, colágeno do tipo I, fibrinogênio, fibrina e cadeia- β da insulina oxidada.

A protease A em conjunto com outros componentes do veneno, como peptídeos de baixo peso molecular, lesam o endotélio e a camada muscular das artérias e arteríolas, causando hipotensão e choque hipovolêmico, comum no acidente botrópico (REICHL; MANDELBAUM, 1993; ROODT *et al.*, 1997).

Uma protease bem estudada é a jararhagina-C, isolada da *B. jararaca*. Esta protease além de degradar a matriz extracelular também atua em proteínas plasmáticas da coagulação, antagonizando a ativação plaquetária (KAMIGUTTI *et al.*, 1996; KAMIGUTTI; HAY; ZUZEL, 1996).

As metaloproteases têm sido utilizadas em modelos experimentais para o tratamento de tumores malignos pulmonar, mamário e melanomas em ratos, com redução do número de metástase, interferindo na liberação de fatores de crescimento destes tumores (CORRÊA JR *et al.*, 2002).

1.4.1.2 Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas utilizando mecanismos covalentes de catálise, através de uma tríade de resíduos formada por serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp). Essas enzimas possuem cerca de 30 a 60 kDa, são encontradas em microorganismos, plantas e diversos animais. São muito abundantes nos venenos de serpentes principalmente na família Viperidae, onde constituem aproximadamente 20% do total de proteínas contidas no veneno (SERRANO; MAROUN, 2005). Apresentam diversas funções biológicas e podem estar envolvidas na digestão, ativação do sistema complemento, diferenciação celular, hemostasia, etc. Estas enzimas sozinhas não são letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando associadas com outras proteínas do veneno (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

Existem várias serinoproteases, como a calicreína-símile, que tem ação hipotensora liberando bradicinina e a enzima trombina-símile, que é responsável pela formação do coágulo de fibrina no final da cascata de coagulação sanguínea. Grande parte das enzimas

trombina-símiles já estudadas, são dos venenos de serpentes do gênero *Agkistrodon*, *Trimeresurus*, *Crotalus* e *Bothrops* (CASTRO *et al.*, 2004).

As enzimas trombina-símile ou tipo trombina são serinoproteases que convertem o fibrinogênio em fibrina pela clivagem das cadeias A α e B β do fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A, B ou ambos, são enzimas semelhantes à trombina e por isso recebem esta denominação. Estas enzimas estão presentes nos venenos da família Viperidae e de maneira geral afetam muitos passos na cascata de coagulação, muitas vezes não especificamente através da degradação proteolítica das células ou seletivamente através da ativação ou inativação de fatores envolvidos na coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

De maneira resumida, as enzimas trombina-símile apresentam ações hemostáticas, atuando sobre a molécula de fibrinogênio encontrada no sangue humano, transformando-a diretamente em fibrina. Essas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A ou B, enquanto a trombina sérica ambos. Isto caracteriza a formação de um complexo de fibrina facilmente degradada por plasmina, gerando, assim, um quadro de incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio e diminuição do tempo de coagulação (MAGALHÃES *et al.*, 2003). As enzimas que afetam o sistema hemostático são divididas em 4 grupos: a) coagulantes e pró-coagulantes; b) anticoagulantes; c) inibidores da função plaquetária e d) ativadores do sistema fibrinolítico (MARKLAND JR, 1998; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

Do veneno de *Bothrops alternatus* foi isolada uma enzima trombina-símile denominada Balterobin, da *Bothrops atrox* foi isolada a trombocitina e do veneno da espécie *Bothrops jararacussu* já foram isoladas 3 diferentes enzimas trombina-símiles, uma delas, a Jararacussin-I possui atividade fibrinogenolítica sobre as cadeias A α e B β do fibrinogênio (SMOLKA *et al.*, 1998; PETRESKI *et al.*, 2000; BORTOLETO *et al.*, 2002).

Da peçonha da *Bothrops pauloensis* foi isolada da uma serinoprotease denominada Tl-Bp. Esta enzima corresponde a 3% das proteínas totais da peçonha, consiste de uma cadeia polipeptídica única, com massa molecular de 34 kDa. A Tl-Bp não induz agregação plaquetária, miotoxicidade, hemorragia e não forma edema pronunciado. Essa proteína sozinha possui baixa toxicidade, mas quando associada à peçonha pode contribuir para sua letalidade devido a sua alta atividade proteolítica (COSTA, 2008).

As serinoproteases geralmente não atuam sobre outros fatores da coagulação que não o fibrinogênio. Mas existem algumas exceções. Serinoproteases que ativam o Fator XIII foram descritas nos gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Cerastes* e *Trimeresurus* (PIRKLE, 1998).

Uma serinoprotease que ativa o Fator V foi descrita em *Agkistrodon contortrix* (contortrixobina) (AMICONI *et al.*, 2000), com atividade 250 a 500 vezes menor que a trombina (ROSING *et al.*, 2001). Em *Bothrops jararaca* (botrombina) foi descrita uma serinoprotease que ativa fator VIII (NISHIDA *et al.*, 1994).

Existem serinoproteases totalmente distintas da trombina que possuem atividade sobre o sistema nervoso. Batroxobin, de *Bothrops atrox*, mostrou atividade neuroprotetora em ratos com desordem de memória espacial por isquemia do lobo temporal esquerdo. Mostrou também atividade interferente sobre a expressão de NCAM (neural cell adhesion molecule), HSP32 e HSP70 (WU *et al.*, 2001). LM-TL, uma serinoprotease proveniente de *Lachesis muta*, exibiu uma interessante propriedade: quando injetada na corrente sanguínea de ratos induziu episódio temporários de rotação em torno do eixo longitudinal do corpo do animal (SILVEIRA *et al.*, 1989; DA SILVA *et al.*, 1989).

Outra atividade biológica foi verificada em uma serinoprotease proveniente da serpente *Trimeresurus flavoviridis*, flavoxobina. Esta enzima mostrou atividade sobre o sistema complemento, ativando C3 (atividade de C3 convertase) por clivagem da ligação Arg726-Ser727 (YAMAMOTO *et al.*, 2002).

Devido as suas propriedades, algumas serinoproteases têm sido usadas na prevenção e formação de trombo nas superfícies de prótese, evitando agregação plaquetária e na melhora da circulação sanguínea naquelas alterações vasculares secundárias a redução da viscosidade sanguínea (CASTRO, 2004).

1.4.1.3 Lectinas C

As lectinas são proteínas não imunes com capacidade de se ligarem especificamente, reversivelmente e não-covalentemente a moléculas de carboidratos. Inicialmente, as lectinas de origem animal foram classificadas de acordo com sua necessidade de cálcio para atuar. As lectinas do tipo C são cálcio dependente enquanto que as lectinas do tipo S, também conhecidas como galectinas, apresentam atividade independente de cálcio e possuem grupos tióis livres, pois a oxidação inibe sua atividade (DRICKAMER, 1993).

As lectinas do tipo C têm esta denominação por pertencerem a uma família de lectinas que requerem íons cálcio para a sua interação com glicoconjugados, apresentam solubilidade variável, estão localizadas principalmente no meio extracelular e possuem resíduos de cisteínas ligados formando pontes dissulfeto. Estas proteínas, não enzimáticas, possuem

aproximadamente 30 kDa e consistem de associações covalentes de duas cadeias polipeptídicas idênticas ou homólogas e que podem apresentar um domínio rico em açúcar (KINI; EVANS, 1990; WEISS *et al.*, 1991).

A primeira lectina isolada de veneno de serpente foi a trombolectina (TL), do veneno de *Bothrops atrox*, cuja característica principal foi à presença de atividade hemaglutinante (GARTNER; STOKER; WILLIAMS, 1980).

Drickamer (1999) descreveu que as lectinas de venenos de serpentes eram constituídas de aproximadamente 130 aminoácidos. Possuíam uma estrutura primária homóloga ao domínio de reconhecimento para carboidratos (CRD), mas não apresentavam outros domínios acessórios e as considerou como lectinas que se comportam com um CRD livre.

As lectinas C são divididas em dois tipos. O primeiro tipo tem pontes dissulfetos ligadas ao homodímero $\alpha\beta$ com dois polipeptídios homólogos de 14 kDa, portanto com baixo peso molecular, muito encontradas nos venenos botrópicos, com capacidade de aglutinar eritrócitos e de se ligar a carboidratos produzindo uma gama de efeitos patológicos necrotizantes (CASTRO *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003). O segundo tipo são lectinas que possuem várias pontes dissulfeto ligadas por dois a quatro heterodímero $\alpha\beta$, com alto peso molecular variando entre 50 a 100 kDa, comumente encontradas no veneno crotálico, como a convulxina, agregam plaquetas, porém não conseguem aglutinar eritrócitos (TOYAMA *et al.*, 2001).

Já foram identificadas as estruturas primárias de mais de 80 tipos de lectinas e lectina do tipo C símile, isoladas de veneno de serpentes. Elas são normalmente compostas por duas unidades idênticas ligadas covalentemente, consistindo de 135 a 141 aminoácidos ligados por ponte dissulfídrica. Foram isoladas várias lectinas de vários venenos botrópicos, incluindo as espécies *B. jararaca*, *B. Jararacussu*, *B. godmai*, *B. alternatus*, *B. asper* e *B. pirajai* (LOMONTE *et al.*, 1990; KASSAB *et al.*, 2004; HAVT *et al.*, 2005).

Na hemostasia, as lectinas podem ter uma ampla variedade de ação; podem ligar-se ao fator von Willebrand e induzir sua interação com a glicoproteína plaquetária. Outras ao contrário, ligam-se à glicoproteína plaquetária Ib impedindo o fator von Willebrand de mediar à agregação plaquetária, ou inibem a coagulação por formar complexos não covalentes com os fatores IX e IXa, X e Xa, bloqueando sua participação na cascata da coagulação e algumas lectinas interagem diretamente com a trombina inibindo suas funções de agregação de plaquetas, quebra de fibrinogênio e ativação da coagulação (MONTEIRO *et al.*, 2003).

A botrojaracina (purificada do veneno de *B. jararaca*) é uma proteína de 27 kDa, pertencente à família das lectinas do tipo C e forma um complexo não covalente com a

trombina. A botrojaracina inibe a atividade da trombina sobre fibrinogênio, fator V, plaquetas, a ativação da proteína C, a ligação da trombina com a trombomodulina e o complexo antitrombina-heparina (ZINGALI *et al.*, 1993; AROCAS *et al.*, 1996). Zingali *et al.* (1993) demonstraram que a botrojaracina, foi capaz de inibir 50% da atividade da trombina em agregar plaquetas, numa concentração relativamente baixa (0,06µg/mL), sendo o mais importante inibidor da coagulação sanguínea, proveniente do veneno de serpente estudado até hoje.

Castro *et al.* (1998) isolaram e identificaram, no veneno da serpente *Bothrops alternatus*, um inibidor da coagulação, a botralternina. Esta proteína tem 95% de homologia à botrojaracina nos primeiros 25 aminoácidos analisados, possui uma massa molecular de 27 kDa e é também uma lectina com capacidade de inibir a atividade da trombina, ligando-se ao exossítio da mesma. Contudo, a botralternina mostra-se menos eficiente que a botrojaracina na capacidade de inibir a trombina.

As lectinas dos venenos de serpente parecem ter um papel na defesa ou na captura das presas, devido as suas atividades de agregação plaquetária e estimulação de células periféricas. No entanto, é sabido que algumas lectinas não são capazes de agregar plaquetas, apesar de hemaglutinarem eritrócitos como às lectinas das serpentes *Bothrops atrox* (TL) e *Agkistrodon contortrix contortrix* (CuHL) (OGILVIE; BYL; GARTNER, 1989).

Dentre outras atividades das lectinas dos venenos sabe-se que quando injetadas em outros animais, podem aglutinar hemácias *in vitro*, induzir edema, liberar cálcio dos estoques intracelulares, estimular mitose em linfócitos, induzir inflamação e citotoxicidade e inibir a proliferação de algumas linhagens de células (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000).

As lectinas dos venenos botrópicos têm a capacidade de se ligar a carboidratos e essa propriedade tem permitido o seu uso para detectar carboidratos, glicoproteínas e imunoglobulinas em superfícies celulares, além da identificação de células tumorais (SINGH; TIWARY; KENNEDY, 1999), este reconhecimento de carboidrato em células tumorais tem permitido que estas lectinas sirvam como importante ferramenta para encontrar metástase tumoral (VARKI, 1997).

1.4.1.4 Fosfolipases A₂

Um dos principais constituintes do veneno botrópico é a enzima termoestável fosfalipase A₂ (PLA₂). Fosfalipases A₂ são enzimas dependentes de cálcio, que hidrolisam

glicerofosfolipídeos na posição sn-2 da ligação acil de membranas celulares, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos (BURKE; DENNIS, 2009).

As Fosfolipase A₂ estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas tanto no interior como no exterior da célula. As fosfolipases A₂ encontradas no interior (PLA_{2s} intracelulares ou citosólicas) e aquelas encontradas no exterior das células (PLA_{2s} extracelulares ou secretórias). Fosfolipases A₂ intracelular (cPLA₂), apresentam alta massa molecular (85 kDa) e são encontradas em várias células, geralmente estão associadas às membranas e são cálcio-dependentes. São enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, na sinalização celular e no remodelamento de fosfolipídios (SIX; DENNIS, 2000). Já as PLA_{2s} extracelulares são enzimas abundantes em muitos fluidos particularmente em secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e em venenos de répteis (serpentes e lagartos) e insetos (GLASER *et al.*, 1993; CASTRO *et al.*, 2000). São enzimas pequenas (119 a 143 resíduos de aminoácidos), estáveis, cálcio-dependentes, de baixa massa molecular (12 a 15 kDa) e que atuam sobre substratos lipídicos (principalmente fosfolipídios) hidrolisando a ligação éster sn-2 (“sequentially numbered”) (OWNBY *et al.*, 1999).

As fosfolipases A₂ também são classificadas com base na sequência de resíduos de aminoácidos, peso molecular, número de pontes de dissulfeto, requerimento do íon cálcio, entre outras características (BURKE; DENNIS, 2009). Inicialmente, as PLA_{2s} foram classificadas em dois grupos de acordo com as posições de suas pontes dissulfeto (DUFTON; HIDER, 1983). Em 2000, Six; Dennis propuseram uma nova classificação, em 11 grupos, com base na sequência dos resíduos de aminoácidos e na localização das pontes dissulfeto. Atualmente, a superfamília das PLA_{2s} extracelulares é composta por 15 grupos que, a despeito de suas distribuições e ocorrências variadas, caracterizam-se por apresentarem similaridade sequencial e estrutural, diferenciando-se somente pela localização e quantidade de pontes dissulfeto e pelo comprimento de seus *loops*.

Segundo a classificação de Six; Dennis (2000), as PLA_{2s} ofídicas pertencem aos grupos I e II, são proteínas de baixo peso molecular (aproximadamente 14 kDa) e que apresentam diversos efeitos biológicos, tais como neurotóxico, cardiotoxíco, miotóxico, indutor ou inibidor da agregação plaquetária, hemolítico, anticoagulante, convulsivante e hipotensor (OWNBY *et al.*, 1999; KINI, 2003; MARCUSSI *et al.*, 2007; BURKE; DENNIS, 2009).

No grupo II da classificação geral das enzimas fosfolipases, destacam-se as PLA_{2s} que promovem intensa mionecrose local. Estas proteínas foram inicialmente subdivididas em dois

subgrupos conforme a presença de atividade neurotóxica ou não (SOARES *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008).

As fosfolipases miotóxicas com atividade neurotóxicas são proteínas básicas, multiméricas, possuindo 120 aminoácidos, comumente encontradas nos venenos elapídicos, sendo responsáveis pelo seu efeito letal, agindo em doses muito baixas (abaixo da DL_{50}) na junção neuromuscular, com atividade pré-sináptica, podendo causar lesão muscular esquelética. São encontradas em venenos crotálicos (como exemplo a crotaxina do veneno da *Crotalus durissus cascavella*) e em venenos de algumas serpentes botrópicas, como no veneno da *B. insularis* (COGO *et al.*, 1998; SALVINI *et al.*, 2001).

As fosfolipases miotóxicas sem atividade neurotóxicas são proteínas básicas, diméricas, possuindo 120 aminoácidos, comumente encontradas em venenos crotálicos e botrópicos, mais abundantes, agem em doses mais altas, têm menor participação na mortalidade direta destes venenos e seu potencial mionecrótico é mais fraco do que aquelas fosfolipases com ação neurotóxicas (OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2000; LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

As PLA_2 s miotóxicas por sua vez, foram classificadas em três tipos diferentes com base na seqüência de resíduos de aminoácidos: a) as que apresentam um resíduo de ácido aspártico conservado na posição 49 e são cataliticamente ativas, denominadas de PLA_2 s Asp49, b) as toxinas que apresentam substituição deste resíduo por lisina PLA_2 Lys49, conhecidas como PLA_2 s homólogas e c) variantes de PLA_2 s, com serina ocupando a posição 49, PLA_2 Ser49, as duas últimas são cataliticamente inativas, (KAISER *et al.*, 1990; LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

As PLA_2 s Asp49 em geral não são agentes hemolíticos, possuem alta atividade enzimática, ligando-se a sítios específicos de membrana ou interagindo com seus componentes, causando hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular e provocando sua desorganização (SIX; DENNIS, 2000).

A ação mionecrótica das PLA_2 s Lys49 e PLA_2 Ser49 transcorre por uma via catalítica independente da atividade enzimática, sendo acompanhado, *in vivo*, por edema, hiperalgesia, liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6, além de atividade letal quando injetada por via endovenosa ou intraperitoneal em camundongos (LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

A atividade miotóxica das PLA_2 s Lys49 tornou-se evidente com o isolamento e a caracterização de uma série de fosfolipases homólogas básicas dos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* (bothropstoxin-I [BthTX-I]; *Bothrops asper* (miotoxina-II [BaspTX-II];

Bothrops moojeni (miotoxina-I e II [MjTX-I e II], *Bothrops pirajai* (piratoxina-I [PrTX-I] e *Bothrops neuwiedi* (miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7) (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; MANCUSO *et al.*, 1995; MAGRO *et al.*, 2003).

O alvo primário da PLA₂ Lys49 A₂ está localizado no exterior da célula e sua ação envolve três mecanismos principais. Em primeiro lugar sua atividade catalítica intensa que pode liberar ácidos graxos e lisofosfolipídicos ativos com potente ação biológica. Em segundo lugar a ligação interfacial com as camadas lipídicas das membranas celulares, com ou sem hidrólise de fosfolipídicos, podendo afetar as funções celulares ou integridade das membranas destas células. E finalmente, a ligação às proteínas específicas nas superfícies celulares, que atuam como receptores ligados à membrana (VALENTIN; LAMBEAU, 2000). A região CRD é a zona de ligação da fosfolipase A₂ ao receptor, que se liga também à região de ligação ao cálcio, e com isso tem inibida sua atividade catalítica, mas a atividade endocitária continua e internaliza a fosfolipase. Esse processo permite um influxo descontrolado de íons de cálcio e sódio para o interior da célula, causando alterações intracelulares irreversíveis e morte celular (CHIOATO; WARD, 2003; LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003).

As miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7 isoladas da *Bothrops neuwiedi* são proteínas com peso molecular entre 13.500 e 14.000, podem apresentar-se na forma dimérica e possuem estruturas idênticas às estruturas das PLA₂s Lys49. Produzem necrose de fibras musculares de camundongos, mas não apresentam atividades fosfolipásica ou coagulante (MAGRO *et al.*, 2003).

Diversas fosfolipases com atividade sobre o sistema hemostático também foram isoladas de venenos de serpentes. Elas foram classificadas em três grupos: classe A, aquelas que induzem agregação plaquetária, classe B, fosfolipases que inibem a agregação plaquetária e classe C, fosfolipases que induzem resposta bifásica (pró e anti-agregante) (KIN; EVANS, 1990).

Dentre as ações causadas pelas miotoxinas classificadas como não neurotóxicas foram observadas *in vivo*: miotoxicidade acompanhada de edema utilizando o modelo de edema de pata, liberação de citocina pró-inflamatória, capacidade de atrair leucócitos para cavidade pleural e hiperalgesia (LOMONTE; TARKOWSKI; HANSON, 1993; ANGULO *et al.*, 2000; DE CASTRO *et al.*, 2000; CHACUR *et al.*, 2003). *In vitro* observou-se ação citosólica, destruição de lipossomo, degranulação de mastócitos com conseqüente aumento a permeabilidade vascular e formação de edema, atividade antibactericida de largo espectro, atividade pré-sináptica usando nervo frênico, lesão renal em sistema de rim isolado de rato e diafragma de rato, ação quimiotática com migração de neutrófilos, proliferação, apoptose e

necrose de células da linhagem linfóide B (LANDUCCI *et al.*, 1998; PÁRAMO *et al.*, 1998; DIAZ *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2002; GAMBERO *et al.*, 2002; MORA *et al.*, 2005; OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2005).

Devido à variedade de efeitos tóxicos destas PLA₂s, diversas pesquisas têm sido realizadas em busca de inibidores de fosfolipases A₂.

1.5 Alterações clínicas e patológicas no envenenamento botrópico

Os venenos ofídicos exercem efeitos em quase todas as células e tecidos e a ação do veneno depende de uma série de variáveis, incluindo taxa de administração, absorção, distribuição, acumulação e ação no sítio receptor, metabolismo e excreção (YARLEQUÉ, 1992).

As diferentes toxinas presentes nos venenos podem agir sozinhas apresentando mais de uma atividade biológica ou podem agir em sinergismo, produzindo um efeito único. Essas toxinas alcançam e atuam em diferentes partes do organismo, conduzindo mudanças na homeostasia, ora estimulando ou inibindo processos fisiológicos (MARKLAND JR, 1998).

As alterações causadas pelo veneno das serpentes do gênero *Bothrops* são principalmente do tipo coagulante, hemorrágica e proteolítica (JORGE; RIBEIRO, 1990).

A atividade coagulante do veneno ocorre através de uma ação do tipo trombina. Através dela, o veneno pode transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina. A fração do veneno botrópico, que possui ação coagulante do tipo trombina, ativa a cascata da coagulação de maneira diferente da trombina fisiológica, não sendo neutralizada pela heparina. Além desta ação, a maioria dos venenos botrópicos é capaz de ativar o fator X (fator Stuart-Prower) e o fator II (protrombina) da cascata da coagulação sanguínea. Quando há ativação do fator X, há também consumo dos fatores V, VII e plaquetas, levando à coagulação intravascular disseminada, com formação e deposição de microtrombos na rede capilar. Este quadro seria um dos responsáveis pela síndrome da insuficiência renal aguda (MAGALHÃES *et al.*, 2003; FERREIRA; BARRAVIEIRA, 2004).

A hemorragia no envenenamento botrópico é devido à ação vasculotóxica causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas, que são metaloproteases dependentes de zinco. Estas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando posteriormente sua ruptura. Elas também têm efeito citotóxico em células endoteliais e agem nos componentes do sistema hemostático. O edema no local da picada, que

em geral ocorre minutos após o acidente, é decorrente de lesão tóxica no endotélio dos vasos sanguíneos desse local. A ação das hemorraginas explica muitos casos de hemorragias sistêmicas, algumas vezes fatais, no sistema nervoso central, na ausência de distúrbios da coagulação (GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009). As hemorragias incidem principalmente sobre os órgãos como os pulmões, cérebro e rins (BOFF, 2004/2005).

A ação proteolítica decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno como proteases, hialuronidases e fosfolipases, que induzem a liberação de substâncias vasoativas como a histamina e bradicinina que podem conduzir ao choque. Pode haver liponecrose, mionecrose e lise das paredes vasculares. Essa ação tem relação direta com a quantidade de veneno inoculada. As lesões locais, como rubor, edema, bolhas e necrose são devidas a essa ação, mas também decorrem da presença de hemorraginas, da ação coagulante destes venenos, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, podendo ser potencializadas por infecções secundárias (PINHO; PEREIRA, 2001; CAMEY; VELARDE; SANCHEZ, 2002).

As manifestações clínicas causadas pelo acidente botrópico podem ser localizadas ou sistêmicas. Localmente, a ação do veneno botrópico provoca intensa resposta inflamatória caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação bem como pelo influxo de moléculas com atividade inflamatória e leucócitos no tecido injetado. A participação de mediadores endógenos nesse processo inflamatório tais como prostaglandinas, leucotrienos, cininas, óxido nítrico e componentes neurogênicos, clinicamente se traduz em sangramento, dor, edema e eritema. O edema, inicialmente circunscrito, pode em até 24 horas estender-se a todo o membro devido a extravasamento de líquido para o espaço extravascular. Em poucas horas desenvolve-se linfadenomegalia regional com gânglios aumentados e dolorosos, podendo instalar-se equimose no trajeto dos vasos que drenam a região. Após algumas horas do acidente podem surgir, no local da picada, bolhas em quantidade e proporções variáveis, com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico (RIBEIRO; JORGE, 1990; ROCHA *et al.*, 2000; BORJA-OLIVEIRA *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que a mionecrose é um efeito local que pode levar a perda do membro afetado, desabilitando o acidentado. Sua ocorrência, em um primeiro momento, se deve à ação de miotoxinas, que exercem uma ação direta sobre o músculo esquelético causando rompimento de membrana plasmática e hiperconcentração das miofibrilas, seguida da dissolução dos componentes celulares, levando à degeneração e morte celular (TEIXEIRA *et al.*, 2005). A mionecrose é relevante do ponto de vista clínico, tanto pela sintomatologia

apresentada no envenenamento, quanto pela dificuldade em neutralizá-la "*in vivo*" (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

Ainda como complicação no local da picada pode ocorrer infecção. Essa tem incidência variável com a espécie, entre 1 e 17,2%, e é normalmente provocada por microorganismos gram negativos presentes na boca das serpentes como: *Morganella morganii*, *Echerichia coli*, *Providencia rettgeri*, *Enterobacter*, também pode ser provocada por anaeróbios e em menor frequência por cocos gram positivos (RIBEIRO; MIGUEL; LEBRÃO, 2001).

Os efeitos sistêmicos do envenenamento compreendem alterações em diferentes sistemas como: hematológico, cardiovascular, hepático, urinário, respiratório, imunológico, digestório e nervoso. Os mecanismos que ocasionam tais alterações são complexos e os vários componentes tóxicos dos venenos podem agir direta ou indiretamente nas células (PINHO; PEREIRA, 2001).

Imediatamente após o envenenamento, há fraqueza, falta de apetite e aumento da frequência cardíaca e respiratória. Pequenos sangramentos podem ocorrer nos acidentes leves e moderados, sem repercussão hemodinâmica. São comuns a gengivorragia, hematúria microscópica, púrpuras e sangramentos em feridas recentes (FERREIRA; BARRAVIEIRA, 2004).

A liberação de acetilcolina durante o envenenamento leva ao aumento de secreção lacrimal, salivar, nasal, sudorípara, brônquica e gástrica, ocasiona tremores, espasmos musculares e priapismo, assim como, diminuição da frequência cardíaca (BRASIL, 2001).

1.5.1 Alterações histológicas no fígado, baço, coração e rins após envenenamento

O veneno da serpente *Bothrops neuwiedi* quando inoculado no organismo, possui ação primariamente local e secundariamente sistêmica, provocando também alterações no fígado, baço, coração e rins.

No fígado, o veneno pode alterar o tecido hepático através da ação da fosfolipase A₂ que ativaria a fosfolipase da membrana plasmática dos hepatócitos. Espécies reativas de oxigênio e toxinas poderiam interagir com os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidios da membrana dos hepatócitos, aumentando a degradação destas membranas lipídicas. Outro mecanismo de ação do veneno botrópico seria através das metaloproteases, que atuariam

sobre a membrana basal dos vasos, aumentando a permeabilidade vascular. Esta alteração atuaria como propagador do dano hepático (NISENBOM; SEKI; VIDAL, 1986).

A ação tóxica do veneno sobre os hepatócitos é relevante manifestando-se por alterações das enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além de degeneração hidrópica dos hepatócitos com localização centrolobular (MOHAMED *et al.*, 1981; TOKARNIA; PEIXOTO, 2006).

A ação do veneno botrópico sobre o baço pode ocasionar lesões histopatológicas do tipo degeneração hidrópica e hemorragia. Raposo *et al.* (2000/2001) verificaram após acidente ofídico em um equino (associado à picada por serpente do gênero *Bothrops*), que o baço apresentava lesões caracterizadas por petéquias e sufusões, além de alterações histopatológicas, caracterizadas por congestão e hemorragia acentuada.

Os envenenamentos crotálicos e botrópicos produzem efeitos cardiovasculares semelhantes. Os fenômenos cardiovasculares decorrem de alterações endoteliais provocadas pelos venenos proteolíticos, sequestro periférico de líquido, liberação de bradicinina e outros polipeptídios levando à inibição das enzimas conversoras da angiotensina e outras substâncias vasoativas, podendo chegar ao choque (JORGE; RIBEIRO; O'CONNELL, 1999, PINHO; PEREIRA, 2001; FERREIRA; BARRAVIEIRA, 2004).

A injeção intramuscular da peçonha de *Bothrops asper* (CHAVES *et al.*, 1989) e *B. alternatus* (ACOSTA DE PÉREZ *et al.*, 1996) em camundongos causa pouca ou nenhuma alteração histológica em tecido cardíaco. De modo semelhante, a injeção de uma metaloproteinase hemorrágica (BaP1) de *B. asper* também não causou dano histológico no coração de camundongos (ESCALANTE *et al.*, 2004).

Dentre as manifestações sistêmicas, a insuficiência renal aguda (IRA) evidenciada pela oligúria e anúria (entre outras manifestações), geralmente aparece horas após o envenenamento, sendo a causa mais frequente de morte. A etiopatogenia da IRA ainda não está totalmente definida, parecendo ser multifatorial. A patogênese pode estar relacionada à ação direta do veneno, de efeitos aditivos ou sinérgicos das diferentes toxinas e enzimas presentes nos venenos com a liberação de substâncias vasoativas no rim, ao processo de coagulação intravascular disseminada associado à necrose tubular e ao quadro de mioglobinúria secundário a mionecrose (CASTRO *et al.*, 2004; DE CASTRO, 2006).

O veneno botrópico tem atividade miotóxica intensa, sendo a rbdomiólise capaz de determinar mioglobinúria com efeitos deletérios adicionais para o rim. A mioglobinúria é um achado freqüente no envenenamento ofídico e pode ser uma das causas da insuficiência renal aguda (KOSCINCZUK *et al.*, 2004).

Segundo estudos de Burdmann *et al.* (1989), alterações no interstício renal provocada por fenômenos inflamatórios desencadeados pela própria peçonha ou ainda pelo soro antiofídico podem estar também relacionadas à lesão renal.

1.5.2 Alterações Hematológicas após envenenamento

As manifestações hematológicas causadas pelo envenenamento botrópico constituem preocupações desde a antiguidade e foram constatadas por diversos autores e envolvem tanto as séries vermelha e branca, quanto plaquetária. Vários estudos foram realizados *in vitro* para verificar os diferentes venenos ofídicos, e foi demonstrado que nos acidentes envolvendo o gênero *Bothrops*, a peçonha causava hemólise quando em contato com hemácias de diversos animais, inclusive a do homem (SMITH; FIGGE, 1991; RUIZ DE TORRENT *et al.*, 1999).

Tais achados podem ser justificados através de dois mecanismos. O mecanismo de hemólise direta mediada por ação das hemorraginas, que são potentes metaloproteinases que degradam proteínas da matriz dos vasos e em consequência, rompem os capilares (MANDELBAUM, 1990; MELO *et al.*, 2004). E, o mecanismo por hemólise indireta, mediada pela fosfolipase A₂ que converte a lectina em lisolectina. Este agente vasoativo seria o responsável pela hemólise. Os dois mecanismos podem degradar a membrana do eritrócito e causar liberação de hemoglobina (CADILLO; FERREYRA; ZAVALETA, 1991).

Em bovinos expostos ao veneno de *Bothrops alternatus* foi constatada redução da contagem de eritrócitos, volume globular e concentração de hemoglobina, de 48 horas a 168 horas após a inoculação do veneno, ocorrendo anemia grave, devido à perda sanguínea aguda provocada pela hemorragia local e sistêmica nos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Sano-Martins *et al.* (1995) observaram a presença de hemólise em algumas amostras de sangue, diminuição de hemácias, hematócrito e hemoglobina, leucocitose, neutrofilia, linfopenia e monocitose em cães inoculados experimentalmente com veneno da serpente *Bothrops jararaca* por via intravenosa.

Santos *et al.* (2003) relataram queda significativa nos valores médios da contagem de eritrócitos, na concentração de hemoglobina e no hematócrito, além de hemólise em todas as amostras de sangue, sete dias após o envenenamento experimentalmente de cães com o veneno da serpente *Bothrops alternatus*.

Lemos; Oliveira (2009) inocularam por via intraperitoneal veneno da serpente *Bothrops moojeni* em camundongos *Swiss* e verificaram redução no número de hemácias, porém sem significância estatística.

As alterações na série branca após envenenamento botrópico vão desde discreta leucocitose com neutrofilia até leucocitose moderada com desvio à esquerda.

Santos *et al.* (2003) observaram em cães envenenados experimentalmente com veneno de *Bothrops alternatus* leucocitose com neutrofilia e eosinopenia e sugeriram que tais alterações ocorreram devido à capacidade do veneno botrópico em induzir uma reação inflamatória celular evidente, levando a uma típica resposta de fase aguda (SANO-MARTINS *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2003).

Entretanto, experimentos *in vivo* com ratos da linhagem *Wistar*, inoculados com veneno de serpentes do gênero *Crotalus*, demonstraram a ocorrência de leucopenia 30 minutos após a inoculação da peçonha, seguida de intensa leucocitose com neutrofilia. Segundo Costa; De Lima; Laure (1989), a leucopenia observada inicialmente deve ter ocorrido devido ao efeito do veneno, e a leucocitose que se deu após 30 minutos por reação do próprio organismo do animal.

A inoculação de 100µg de veneno da serpente *B. jararaca*, por via intravenosa em cães, causou leucocitose, neutrofilia, linfopenia e monocitose (SANO-MARTINS *et al.*, 1995). As mesmas alterações foram verificadas por Caldas *et al.* (2008). Segundo estes autores, estas alterações se atribuem ao intenso processo inflamatório local, além da liberação de mediadores inflamatórios

Os leucócitos desempenham papel relevante no desenvolvimento e resolução da reação inflamatória. Durante este processo, os leucócitos são ativados e liberam uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, que amplificam as suas funções imunológicas e, de modo geral, favorecem a regeneração (MARIANI; PANINA-BORDIGNON, 2003). No entanto, em situações particulares, em que há ativação descontrolada ou excessiva, estas células tornam-se lesivas ao hospedeiro. Portanto, no caso do envenenamento ofídico, dependendo do estado de ativação, os leucócitos podem contribuir para a evolução de lesões teciduais e/ou vasculares causadas pelos venenos (TEIXEIRA *et al.*, 2005) ou para a regeneração tecidual (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Desse modo, os leucócitos constituem um alvo importante para a investigação das ações de venenos de serpentes, como da *B. neuwiedi*.

As plaquetas têm um papel importante na fase inicial da hemostasia, por meio da formação do trombo primário e da ativação da coagulação sanguínea, que se dá pela ativação

plaquetária e liberação de importantes mediadores. Por este motivo é importante que as plaquetas estejam numericamente e funcionalmente normais (KAMIGUTTI, 2005).

Sabe-se que no envenenamento botrópico as plaquetas também são células alvo. As alterações encontradas estão relacionadas com o número e com a agregação plaquetária. Com relação ao número, a plaquetopenia pode ocorrer por depleção principalmente devido à coagulação intravascular disseminada (CIVD). A CIVD ocorre por ação do veneno sobre o fator X que transforma a protrombina em trombina e o fibrinogênio em fibrina. Assim, desencadeia a desfibrinação e a CIVD que secundariamente produz uma coagulopatia de consumo com manifestações hemorrágicas (BOFF, 2004/2005).

Outra maneira de ocorrer a trombocitopenia é pela ação direta das serinoproteases ou fosfolipases A₂ sobre as plaquetas ou ao consumo destas devido à ação das metaloproteinases sobre os vasos que os destrói e expõem seus componentes, principalmente colágeno. Com esta ruptura as plaquetas migram para o local lesado e ligam-se à superfície subendotelial formando o tampão hemostático que culmina com o decréscimo do nível de plaquetas circulantes (TENG; KO, 1988; MOUNIER *et al.*, 1994).

Com relação à agregação plaquetária, sabe-se que fatores como a botrocetina e a trombocetina (componentes dos venenos da *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu*, respectivamente) podem atuar sobre as plaquetas, produzindo agregação plaquetária ao mimetizar os componentes ativos da matriz subendotelial, causando a união do fator de von Willebrand com as glicoproteínas plaquetária e a produção de prostaglandina E₂ e tromboxano A₂ pela fosfolipase A₂, que também promovem a agregação plaquetária (SANO-MARTINS, 1990; KAMIGUTI *et al.*, 1991; ROODT; DOLAB; SEGRE *et al.*, 1996).

A trombocitopenia é comum em indivíduos envenenados pela serpente do gênero *Bothrops*, assim como, em animais utilizados como modelos experimentais. Sano-Martins *et al.* (1997) observaram trombocitopenia em 53% das vítimas de acidente provocados por *Bothrops jararaca* enquanto Iuan *et al.* (1995) verificaram uma queda significativa na contagem de plaquetas, que retornou ao normal 48 horas após o tratamento.

Mendes *et al.* (2008) verificaram diminuição do número de plaquetas e da concentração do fibrinogênio plasmático em camundongos inoculados pela via intramuscular com o veneno da serpente *Bothrops pauloensis*.

Oliveira *et al.* (2010) após inocularem experimentalmente veneno da serpente *Bothrops alternatus* por via intramuscular em bovinos, observaram redução significativa de plaquetas após 3 horas do envenenamento, com retorno aos níveis basais somente dez dias após a inoculação, indicando uma resposta medular apropriada nestes bovinos.

Apesar do conhecimento sobre a ação dos venenos ofídicos ser antigo e estar sofrendo grande avanço nos últimos anos, ainda são poucas as informações na literatura a respeito das alterações celulares no mielograma e esplenograma de animais, causadas pelo envenenamento ofídico.

Nogueira *et al.* (2007) realizaram um trabalho para avaliar a medula óssea de cachorros após receberem 1mg/kg de veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* por via subcutânea. Eles observaram que ocorria hipocelularidade na medula com diminuição das séries eritróide e granulocítica e aumento da relação mielóide/eritróide.

Trabalho realizado por Lemos; Oliveira em 2009, quanto ao efeito da peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni* e sua miotoxina, denominada BmTx, sobre a medula óssea de camundongos, mostrou que os animais que receberam peçonha bruta (25µg) e BmTx (48ng e 96ng) apresentaram um aumento significativo de células medulares de 60%, 82% e 62%, respectivamente.

Com relação ao comportamento das células hematológicas no baço após envenenamento ofídico, até o presente momento, não foram encontrados artigos publicados a este respeito. A falta de informações sobre este assunto estimula também a realização deste trabalho.

1.6 Agentes antiofídicos

1.6.1 Soroterapia

O único tratamento específico, cientificamente aceito para os acidentes ofídicos é a administração endovenosa do soro antiofídico nos paciente vitimados, sendo utilizado a mais de 100 anos (HAWGOOD, 1999).

O primeiro estudo que se tem notícia a respeito do soro antiveneno foi realizado por Sewall, em 1887, que utilizou os princípios soroterápicos, quando demonstrou em pombos que a inoculação repetida, com doses altamente diluídas de venenos de *Sistrurus catenatus* (um tipo de cascavel norte-americana), induzia um estado de resistência contra os efeitos da peçonha, sem aparente influência sobre o estado de saúde dos animais (HAWGOOD, 1999).

Em 1894, os médicos franceses Phisalix e Bertrand demonstraram a atividade antiofídica do sangue de animais imunizados contra o veneno de *Vipera aspis*. Simultaneamente, Calmette (1894) verificou que doses repetidas do veneno de *Naja*

tripudians injetadas em cavalos conferiam imunidade aos animais e destes obteve o soro capaz de neutralizar o veneno da espécie de *Naja* que trabalhou. Os resultados experimentais de Calmette foram utilizados como base para produzir em 1896 o primeiro soro antiveneno ofídico para uso médico (HAWGOOD, 1992; HAWGOOD, 1999).

A partir de então, muitos países começaram a desenvolver antivenenos baseados no protocolo de Calmette. No Brasil, esse protocolo de produção de soro antiveneno ofídico foi adotado pelo médico sanitarista Vital Brazil. E, a partir de 1901, a produção do soro antiofídico foi iniciada por este pesquisador no Instituto Butantã, São Paulo. Em 1903, Vital Brazil preparava os primeiros soros antiofídicos e foi o primeiro a demonstrar a especificidade dos soros antivenenos, ao verificar que o soro do animal imunizado contra o veneno da jararaca não tinha ação sobre o veneno da cascavel, bem como o soro ativo contra o veneno crotálico se mostrou inócuo sobre o veneno botrópico. Partindo dessa descoberta, no mesmo ano, o Brasil já possuía antissoros mono e polivalentes para uso médico (HAWGOOD, 1992).

Atualmente, mais de um século depois, com algumas modificações, a soroterapia proposta por Calmette e Vital Brazil, é ainda o único tratamento seguro para o envenenamento ofídico. Desde a introdução do tratamento com antiveneno, observou-se uma redução significativa do número de óbitos causados por acidentes ofídicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981).

O soro antiofídico é uma solução purificada de imunoglobulinas específicas, produzido através da imunização de cavalos inoculados sucessivamente com o antígeno (veneno da serpente). O título de anticorpos (IgG) no sangue é monitorado a cada inóculo, após a obtenção do título adequado é realizada a sangria total nos animais soroprodutores, e os eritrócitos são devolvidos aos mesmos, após hemossedimentação. O plasma é separado e purificado até se obter o anticorpo (IgG). Em seguida é feita a clivagem da molécula IgG com a enzima pepsina, removendo-se a fração Fc (potencialmente alergênica) e utilizando para a terapêutica do acidente ofídico apenas a fração F(ab')₂. Antes do envazamento final e liberação pelos produtores, o soro antiofídico é submetido à cultura bacteriológica em meio apropriado e estudos toxicológicos usando inoculação animal para pirogenicidade (CHIPPAUX; GOYFFON, 1998; LALLO; THEAKSTON, 2003).

O soro antibotrópico é obtido através da imunização de cavalos com um *pool* de antígenos composto pelos venenos provenientes das cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%) e *Bothrops alternatus* (12,5%), pois revelam-se bons imunógenos capazes de neutralizarem a atividade letal dos outros venenos botrópicos.

No Brasil, os laboratórios que produzem esses imunoderivados para a rede pública são: Instituto Vital Brazil (IVB, Niterói, RJ), Instituto Butantan (São Paulo, SP) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG) e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, através da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) para os demais estados (CAMEY; VELAVERDE, SANCHEZ, 2002).

A infusão do soro deve ser integralmente por via endovenosa garantindo maior rapidez e eficiência na neutralização das peçonhas circulantes. A dose de soro baseia-se na identificação da serpente, no tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico, na evolução do quadro clínico e na concentração do soro (KOSCINCZUK; PÉREZ; MAIDANA, 1995; CHIPPAUX; GOYFFON, 1998). A soroterapia deve ser realizada em conjunto com o tratamento de suporte que consiste em estabilizar as funções dos órgãos vitais do paciente envenenado (BRASIL, 2001)

Estes soros, por serem de origem equina podem desencadear reações colaterais graves nas pessoas submetidas à soroterapia. As reações podem ser classificadas em precoces (choque anafilático) ou tardias (doença do soro).

O choque anafilático pode ocorrer imediatamente após a administração do soro no paciente ou nas duas horas subsequentes e os sintomas observados podem limitar-se à pele ou evoluírem para hipotensão e choque (LEÓN *et al.*, 2008). A doença do soro é uma reação tardia que ocorre de 5 a 24 dias após o tratamento soroterápico, podendo os pacientes apresentar febre, urticária, artralgia, linfadermomegalia e proteinúria (BRASIL, 2001; FRY *et al.*, 2003). A maioria desses sintomas é devido à ação de altas concentrações de proteínas que não são imunoglobulinas e que estão presentes no soro hiperimune disponível comercialmente. Contudo, as próprias moléculas de imunoglobulina são capazes de desencadear uma reação alérgica no paciente, pela ativação de seu sistema complemento através da ligação das proteínas deste sistema ao domínio C γ 2 da fração Fc da imunoglobulina G (IgG) do equino (FRY *et al.*, 2003).

A soroterapia reduz os efeitos sistêmicos e a letalidade no envenenamento botrópico, no entanto, a lesão local causada por estes venenos não é neutralizada eficientemente pelo antiveneno. Os efeitos locais das peçonhas de serpentes ocorrem muito rapidamente devido à liberação de mediadores endógenos dos tecidos lesados. Assim, o soro neutraliza o veneno circulante, mas não as lesões já estabelecidas (GONÇALVES; MARIANO, 2000; FRY *et al.*, 2003).

Assim, apesar de a soroterapia reverter com bastante eficácia os efeitos sistêmicos do veneno no organismo da vítima, conseguindo evitar por muitas vezes o óbito, ela apresenta

algumas desvantagens como ineficiência para reverter os efeitos locais do veneno, uma inibição somente parcial da neurotoxicidade, miotoxicidade e atividade hemorrágica da peçonha botrópica, alguns efeitos colaterais na vítima (choque anafilático e doença do soro), a necessidade de assistência médica especializada para acompanhar possíveis reações colaterais, exigência de cuidados com a estocagem do soro e com o prazo de validade, a indisponibilidade do soro para algumas regiões do país e o custo da sua produção (devido à alta toxicidade dos venenos, cerca de 10% dos animais soroprodutores morrem durante a imunização) (ZAMUNER *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2007).

No Brasil, o grande número de acidentes causados pelo ofidismo, particularmente em comunidades de difícil acesso, torna importante a busca por novos tratamentos (termoestáveis, com alta disponibilidade, de baixo custo e com poucas reações adversas) que possam complementar e/ou ser uma alternativa à soroterapia para neutralizar os efeitos tóxicos causados pelos envenenamentos ofídicos.

1.6.2 Potencial antiofídico de extratos vegetais

Ao longo do desenvolvimento da humanidade as plantas inteiras ou suas partes foram utilizadas como alimento, para prevenir doenças e tratar uma miríade de doenças. Existem registros que há cinco mil anos a civilização sumeriana já utilizava plantas medicinais para curar feridas e queimaduras (MARTZ, 1992).

As plantas medicinais constituem uma alternativa para tratar diversas enfermidades. Segundo a OMS, nos países subdesenvolvidos, a pobreza associada à falta de acesso a medicamentos industrializados faz com que 65 a 80% da população desses países dependam da fitoterapia para os primeiros cuidados de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

No Brasil, o uso de planta como antídoto para acidentes ofídicos é uma antiga prática utilizada por populações nativas. Estes povos maceravam as plantas e o líquido obtido era utilizado por ingestão oral ou feito um cataplasma, o qual era aplicado sobre o local da picada. O uso de extratos de plantas também é até hoje uma prática comum em regiões onde o acesso à soroterapia é restrito ou nulo (RIZZINI; MORS; PEREIRA, 1988; RUPPELT *et al.*, 1991; MARTZ, 1992).

A importância médica e econômica das plantas estimulou vários estudos etnofarmacológicos que resultaram na descoberta de interessantes propriedades desses

vegetais. Existem relatos que diversas plantas têm a propriedade de neutralizar vários efeitos locais e sistêmicos induzidos pelos venenos das serpentes através da presença de vários constituintes ativos como os taninos, alcalóides, ligninas, flavonóides e outros (SILVA *et al.*, 2004).

Dessa maneira, extratos vegetais surgem como uma forma alternativa no tratamento de envenenamento ofídico ou como complemento a soroterapia convencional, por conter uma gama de constituintes químicos com uma variedade de propriedades farmacológicas de interesse medicinal (MELO *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 2004).

A literatura reporta a existência de centenas de plantas com ação antiveneno a nível mundial, mostrando a presença de biomoléculas capazes de neutralizar variados efeitos locais e sistêmicos. Mahanta e Mukherjee (2000) relataram a ação antiofídica do extrato de *Mimosa pudica* (Mimosaceae) na Índia. O extrato aquoso da raiz desta mimosácea indiana neutralizou *in vitro* as enzimas tóxicas do veneno de *Naja kauthia* e antagonizou *in vivo* a letalidade e a miotoxicidade deste veneno. Asuzu e Harvey (2003) estudaram a habilidade do extrato metanólico de *Parkia biglobosa* em reduzir os efeitos dos venenos de *Naja nigricollis* e *Echis ocellatus*, serpentes da Nigéria, nos modelos experimentais de ação neurotóxica, citotóxica, hemorrágica e toxicidade aguda. O extrato metanólico desta Mimosaceae neutralizou os efeitos neurotóxicos, hemorrágicos e citotóxicos dos venenos testados. Lovera; Bonilla; Hidalgo (2006), no Peru, estudaram a capacidade do extrato aquoso do caule da *Dracontium lorentense* em neutralizar a atividade letal do veneno de *B. atrox*. Estes pesquisadores observaram que quando o extrato da planta foi incubado previamente com o veneno, este foi capaz de neutralizar a atividade letal do veneno. Mais recentemente, Lobo *et al.* (2010) reportaram que o extrato etanólico das folhas da *Murraya paniculata* inibiu a atividade da fosfolipase A₂ do veneno total da serpente *B. asper*, assim como, inibiu a atividade enzimática das PLA₂ purificadas dos venenos das serpentes colombianas *B. asper* e *Crotalus durissus cumanensis* e a atividade citotóxica induzida pela fosfolipase A₂ do veneno de *B. atrox*.

Nos últimos anos, no Brasil, foram publicados vários estudos sobre as ações de extratos de plantas capazes de inibir os efeitos de venenos de serpentes.

Mors *et al.* (2000) fizeram uma revisão ampla e descreveram o nome de 104 plantas indicadas pela medicina popular como antiofídicas e ainda as várias classes de compostos relacionados com a ação antiofídica, ressaltando a importância das espécies da família Apocynaceae.

Borges *et al.* (2000 e 2001) testaram os efeitos antiofídicos da planta *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) que demonstrou inibição das atividades fosfolipásica, miotóxica, edematogênica, hemorrágica e proteolítica, induzidas por diferentes venenos de serpentes.

Biondo *et al.* (2003) estudando o extrato aquoso de *Mandevilla velutina*, quando incubado com o veneno antes da injeção *in vivo*, verificou que o mesmo foi capaz de inibir a atividade fosfolipase A₂ do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, entretanto percebeu que essa inibição era parcial quando comparada a várias espécies de serpentes do gênero botrópico.

Outra planta capaz de inibir o veneno de serpentes é a *Casearia mariquitensis*, cujo extrato estudado por Izidoro *et al.* (2003) mostrou efeito sobre algumas alterações hematológicas e hemostáticas induzidas pelo veneno da serpente *B. neuwiedi pauloensis* e pela neuwidase, metaloproteína isolada deste veneno.

Veronese *et al.* (2005) encontraram efeito inibitório da ação miotóxica do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* e bothropstoxinas I e II com o extrato aquoso liofilizado da casca da raiz da planta *Tabernaemontana catharinensis*.

Ticli *et al.* (2005) demonstraram que o extrato metanólico de *Cordia verbenácea*, conhecida como baleeira, inibiu o edema induzido pelo veneno de *B. jararacussu* e suas principais fosfolipases A₂ (bothropstoxinas I e II). O princípio ativo isolado da *Cordia verbenácea* foi o ácido rosmarínico, com propriedades antiinflamatórias e antimiotóxicas contra o veneno e suas frações.

Costa *et al.* (2008) verificaram que o extrato das flores de *Peltodon radicans* apresentou eficácia significativa na neutralização da atividade edematogênica do veneno de *B. atrox*. Além disso, mostraram que a ação bloqueadora aumentava de acordo com o tempo de aplicação e que os triterpenos pentacíclicos identificados nos extratos das flores, podiam estar relacionados com o bloqueio da atividade edematogênica pela *Peltodon radicans*.

Nishijima *et al.* (2009) investigaram as atividades anti-hemorrágicas de *Mouriri pusa*, *Byrsonima crassa Niedenzu*, *Davilla elliptica* e *strychnos pseudoquina* contra veneno de *B. jararaca*. Os extratos metanólicos de *Mouriri pusa*, *Byrsonima crassa* e *Davilla elliptica* mostraram total capacidade neutralizante contra a hemorragia local provocada pelo veneno.

Mise; Lira-da-Silva; Casais-e-Silva (2009) verificaram a ação protetora da *Calendula officinalis* sobre a atividade miotóxica do veneno da *Bothrops leucurus*, *in vivo*, em camundongos, através da liberação da creatina quinase (CK) e análise histológica. Eles observaram que a liberação da CK e a lesão histopatológica se mostraram diminuídas em animais tratados com *C. officinalis*, tanto topicamente quanto com a incubação do veneno

previamente com *C. officinalis*. A inoculação do veneno incubado com *C. officinalis* sugere que existe alguma fração anti miotóxica no extrato aquoso, uma vez que este inibiu o aparecimento de lesões musculares após a inoculação do veneno de *B. leucurus* e induziu regeneração muscular.

Estudos etnobotânicos, etnofarmacológicos e ensaios biológicos mostram que cerca de 850 espécies de plantas apresentam ou podem apresentar potencial terapêutico antiofídico (SOARES *et al.*, 2005). Estas espécies estão distribuídas em 94 famílias, principalmente Asteraceae (9%), Leguminosae (7,8%) e Euphorbiaceae (4,5%) (MARCUSSE *et al.*, 2007).

Atualmente, 152 espécies de plantas com potencial terapêutico são utilizadas com foco medicinal no Brasil. Destas, apenas 18 espécies (12%) possuem validação científica mostrando assim, apenas uma pequena fração de plantas documentadas cientificamente (SOARES *et al.*, 2004). Diante disto, são necessárias maiores investigações para o isolamento e caracterização dos princípios ativos presentes nos extratos vegetais, pois no futuro estes extratos podem substituir ou complementar o tratamento tradicional utilizado em envenenamentos humanos e animais, já que para estes últimos o soro antiofídico não está disponível.

1.6.3 *Harpalyce brasiliana* Benth

A espécie *Harpalyce brasiliana* Benth (Leguminosae-Papilionoideae) é um arbusto, algumas vezes uma arvoreta, de 1 a 4 metros de altura, que possui ramos alongados; folhas de coloração verde escura e aveludadas; estipulas pequenas, setáceas e caducas, com 7 a 11 folíolos, breve pecioladas, oblongo elípticos de 2,5 a 3,5 cm de comprimento; flores alaranjadas; legume reto glabro de 5,0 a 7,5 cm de comprimento e 1,2 a 3,0 cm de largura, com sementes escuras ou pálidas, oblongas, transversas (Figura 6) (ARAÚJO, 2008).

A espécie é representada por arbustos silvestres anuais, em todo Nordeste, principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão. No Ceará está presente, especialmente, na Serra de Ibiapaba e Chapada do Araripe, onde é conhecida popularmente como “raiz-de-cobra”, devido suas propriedades antiofídicas (BRAZ-FILHO, 1999).

A preparação fitoterápica hidroalcoólica chamada “Específico Pessoa”, feita a partir de uma planta chamada cabeça de negro, é muito utilizada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil como antídoto oral para envenenamento ofídico. Trabalhadores da região Nordeste do

Brasil bebem essa poção antes de se adentrar nas matas para se prevenir contra a picada de serpentes (MORS *et al.*, 1989).



Figura 6 – Foto das diversas partes da *Harpalyce brasiliana*

A - raiz, B - folhas, C- flor e D – espécime completa

Fonte: SILVEIRA; PESSOA, 2005

O estudo químico deste fitoterápico foi feito por Nakagawa *et al.* em 1982. Eles verificaram a ação antiofídica do extrato hidroalcoólico da raiz de uma planta supostamente amazônica, citada pelo nome popular cabeça-de-negro, mas omitiram a identificação (existem várias espécies de famílias diferentes com este nome popular). Do extrato hidroalcoólico eles isolaram duas substâncias, às quais denominaram cabenegrinas A-I e A-II. O trabalho relata que o extrato inibiu o efeito cardiovascular do veneno da serpente *Bothrops atrox* (Viperidae) em cães e aumentou a sobrevivência dos camundongos envenenados experimentalmente (NAKAGAWA *et al.*, 1982).

O isolamento de vários pterocarpanos, dentre eles, as cabenegrinas A-I e A-II do extrato etanólico das raízes de *Harpalyce brasiliiana* Benth sugeriu que a *H. brasiliiana* poderia ser uma das possíveis espécies utilizadas na preparação do fitoterápico “Específico Pessoa”, citado anteriormente (MORS *et al.*, 1989). De fato, essa planta apresenta registro etnofarmacológico como antiofídica e também é conhecida popularmente como “raiz de cobra”.

O trabalho pioneiro de Nakagawa *et al.* (1982) foi o impulso para o interesse pelos pterocarpanos.

As cabenegrinas A-I e A-II (Figura 7) presentes na *H. brasiliiana* são pterocarpanos prenilados, com rotação ótica negativa indicativa da configuração S nos carbonos quirais 6a e 11a. Estruturalmente, os pterocarpanos possuem um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavonas, mas apresentam uma numeração diferente das isoflavonas (BREYTENBACH *et al.*, 1982).

Os pterocarpanos são produtos naturais pertencentes ao grupo dos flavonóides, mais especificamente ao subgrupo dos isoflavonóides e atuam como fitoalexinas, ou seja, substâncias de defesa das plantas às invasões por bactérias, fungos e vírus. Outras atividades biológicas atribuídas aos pterocarpanos incluem atividades antitumoral, antimetabólica, anti-HIV, antiinflamatória e antiparasitária (SELVAM *et al.*, 2004; SALEM; WERBOVETZ, 2006; MILITÃO *et al.*, 2007).

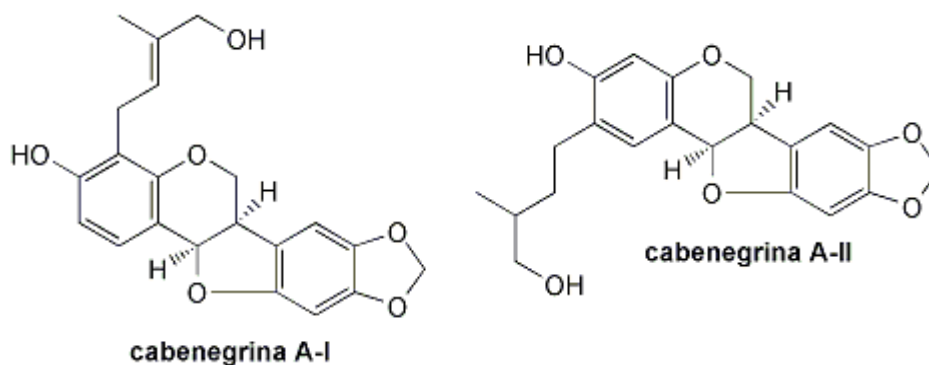


Figura 7 – Estrutura das cabenegrinas I e II
Fonte: REYES-CHILPA; ESTRADA, 1995

Os pterocarpanos têm sido encontrados em um grande número de espécies de plantas pertencentes a diversas subfamílias das leguminosas (Fabaceae). Os pterocarpanos ocorrem principalmente nas espécies de plantas dos gêneros *Erythrina*, *Swartzia*, *Glycine* e *Sophora* (AL-HAZIMI; ALKHATHLAN, 2000).

Além das cabenegrinas, estudos fitoquímicos preliminares com a raiz de *H. brasiliana* possibilitaram o isolamento de mais 6 pterocarpanos: harpalycina-I, leiocarpina, maackiaina, medicarpina, (-)- 4', 5'- dihidroxi - edunol e da chalcona 3, 4, 2', 4'- tetra-hidroxi-3'- (3'', 7''- dimetil-octadi-2'', 6''- enoil) chalcona (ARAÚJO; LIMA; SILVEIRA, 2009).

Os pterocarpanos harpalycina-I e leiocarpina foram estudados quanto à atividade citotóxica em três linhagens de células humanas (leucemia promielocítica, carcinoma de cólon e carcinoma de mama) e apresentaram resultados satisfatórios (MILITÃO *et al.*, 2007).

Em diversas culturas do mundo o uso de plantas contendo pterocarpanos é conhecido por neutralizar os efeitos de envenenamento por serpentes e aranhas (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Também da planta *Harpalyce brasiliana* foi isolado o edunol, este composto apresenta propriedades antimictótica e antiproteolítica contra a peçonha da serpente *B. jararacussu*, além de importante atividade inibitória da fosfolipase A₂ (DA SILVA *et al.*, 2004).

Um trabalho realizado sobre o efeito protetor do (-)-edunol, um pterocarpano isolado de *Brongniartia podalyrioides* mostrou redução na mortalidade de camundongos envenenados com o veneno da serpente *B. atrox*. O (-)-edunol possui estrutura e propriedades similares às cabenegrinas A-I e A-II (REYES-CHILPA *et al.*, 1994).

As cabenegrinas A-I e A-II e o edunol guardam uma estrita semelhança do ponto de vista químico e biológico. Os dois compostos mostram efeito protetor contra veneno botrópico. Suas estruturas químicas (um esqueleto isoflavonóide, funcionalidade dioxigenada e natureza ácida) são relevantes para este tipo de atividade biológica (REYES-CHILPA; ESTRADA, 1995).

Muitos outros pterocarpanos prenilados considerados bioativos foram encontrados em plantas do gênero *Erythrina*. Dentre estas, a casca de *E. barteroana* que mostrou poder neutralizante contra o veneno das serpentes da Guatemala (MITSCHER *et al.*, 1987).

Ximenes, 2009, demonstrou que a cabenegrina A-II foi capaz de bloquear totalmente alguns efeitos do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* em ratos *Wistar*, como a hiperglicemia, o aumento da creatinina e do aspartato aminotransferase, servindo como indicativo da melhoria da função renal desses animais.

A despeito da propriedade terapêutica atribuída as cabenegrinas A-I e A-II, esses pterocarpanos não foram investigados quanto sua atividade biológica contra o veneno da serpente *Bothrops neuwiedi*. Além do mais, como dito anteriormente, as informações contidas na literatura a respeito das alterações celulares na medula óssea e no baço de animais envenenados experimentalmente são restritas. Portanto, este trabalho propõe verificar se ocorrem alterações celulares no sangue periférico, na medula óssea e no baço de animais, causadas por envenenamento pela serpente *Bothrops neuwiedi* e se as cabenegrinas A-I e A-II exercem ação protetora sobre os possíveis efeitos hematológicos e histológicos causados pelo veneno total, na perspectiva de elucidação de um tratamento complementar que possa ser usado com o intuito de diminuir a gravidade das alterações clínicas observadas e a incidência de complicações secundárias ao acidente, e desta forma diminuir o índice de letalidade provocado pelo envenenamento por esta serpente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar as cabenegrinas A-I e A-II na neutralização das atividades biológicas do veneno total da serpente *Bothrops neuwiedi* analisando seu potencial antiofídico para possível complementação da soroterapia.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar as possíveis alterações hematológicas, no que se refere ao hemograma, mielograma e esplenograma causadas pelo veneno total e pelas frações fosfolipase A₂ e lectina C da serpente *Bothrops neuwiedi*, nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas em camundongos.
- Analisar a capacidade das cabenegrinas A-I e A-II em inibir as alterações hematológicas causadas pelo veneno total da serpente *Bothrops neuwiedi* pela via intraperitoneal em camundongos, no tempo 2 horas.
- Avaliar as possíveis alterações histológicas provocadas pelo veneno total e pelas frações fosfolipase A₂ e lectina da serpente *Bothrops neuwiedi* nos rins, coração, baço e fígado de camundongos.
- Analisar a capacidade das cabenegrinas A-I e A-II em inibir as alterações histológicas causadas pelo veneno total da serpente *Bothrops neuwiedi* nos rins, coração, baço e fígado de camundongos, no tempo duas horas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos adultos, machos, da linhagem *Swiss*, pesando entre 25 e 30g, oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, sob controle de luminosidade, temperatura e com acesso livre a água e alimento.

Os animais foram tratados conforme normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e Código de Ética no Uso Científico de Animais (COBEA, 1991). O protocolo deste estudo foi aprovado sem restrições pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará em 09/09/2010 sob o protocolo de número 032/10 (Anexo 1).

3.2 Veneno

O veneno total e frações fosfolipase A₂ (PLA₂) e lectina C da serpente *Bothrops neuwiedi* foram fornecidos pelo pesquisador Marcos Hikari Toyama da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Unidade de Jaboticabal. O veneno liofilizado foi acondicionado em frascos hermeticamente fechados e armazenados a - 20⁰ C até o momento dos ensaios biológicos. O veneno total e as frações fosfolipase A₂ e lectina foram pesados e solubilizados em solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% (massa/volume) no momento do uso e administrados por via intraperitoneal.

De acordo com cada experimento, grupo de camundongos recebeu 60% da DL₅₀ do veneno total (DL₅₀=1,66mg/kg), ou 60% da DL₅₀ da PLA₂ (DL₅₀=7,8mg/Kg) ou 4mg/Kg de lectina C (SOARES *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003).

3.3 Cabenegrinas A-I e A-II

As raízes da *Harpalyce brasiliiana* Benth. foram coletadas na Serra de Ibiapaba-CE e identificadas pelo Professor Afrânio Gomes Fernandes (Universidade Federal do Ceará). A

exsicata (n^o de registro 14841) foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará.

A partir do extrato etanólico das raízes de *Harpalyce brasiliiana* Benth. as cabenegrinas A-I e A-II foram isoladas e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Orgânica, Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

As cabenegrinas A-I e A-II foram armazenadas a 4^oC até o momento dos ensaios biológicos. No momento do experimento foram pesadas e suspensas em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80 (tween 80).

3.4 Envenenamento Experimental

Grupo I- (controle negativo)

Um grupo composto por 06 camundongos foi inoculado apenas com solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. Cada animal recebeu 0,1 mL de cloreto de sódio 0,9% por via intraperitoneal e, após duas horas do envenenamento os animais foram anestesiados levemente por via inalatória com éter dietílico, momento em que foi coletado 1 mL sangue do plexo retro-orbital em microtubos contendo 20µL de heparina 50UI/mL para análise hematológica.

Imediatamente após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos, medula, baço, rins, fígado e coração foram retirados. Enquanto que o rim, coração e fígado foram retirados para análise histológica, a medula foi retirada para fazer o mielograma, uma metade do baço foi utilizada para fazer o esplenograma e a outra metade para análise histológica.

Grupo II – (controle positivo) Veneno total

Uma amostra de 30 camundongos foi inoculada com o veneno total da serpente *B. neuwiedi* na dose de 0,996mg/Kg, diluído em 0,1 mL de solução de NaCl 0,9%, por via intraperitoneal. Estes animais foram subdivididos em 05 grupos, cada um com 6 animais:

Grupo 2 horas (n=06) duas horas após a inoculação do veneno total foi colhido o sangue e retirado os órgãos;

Grupo 4 horas (n=06) quatro horas após a inoculação do veneno total foi colhido o sangue e retirado os órgãos;

Grupo 8 horas (n=06) oito horas após a inoculação do veneno total foi colhido o sangue e retirado os órgãos;

Grupo 16 horas (n=06) dezesseis horas após a inoculação do veneno total foi colhido o sangue e retirado os órgãos;

Grupo 24 horas (n=06) vinte e quatro horas após a inoculação do veneno total foi colhido o sangue e retirado os órgãos;

Grupo III – (controle positivo) Fosfolipase A₂

Uma amostra de 30 camundongos foi inoculada com a fosfolipase A₂ do veneno da serpente *B. neuwiedi* na dose de 4,68 mg/Kg, diluído em 0,1 mL solução de NaCl 0,9%, por via intraperitoneal. Estes animais foram subdivididos em 05 grupos:

Grupo 2 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos duas horas após a inoculação da fosfolipase A₂;

Grupo 4 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos quatro horas após a inoculação da fosfolipase A₂;

Grupo 8 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos oito horas após a inoculação da fosfolipase A₂;

Grupo 16 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos dezesseis horas após a inoculação da fosfolipase A₂;

Grupo 24 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos vinte e quatro horas após a inoculação da fosfolipase A₂.

Grupo IV – (controle positivo) Lectina C

Uma amostra de 30 animais foi inoculada com a lectina do veneno da serpente *B. neuwiedi* na dose de 4,0mg/Kg, diluído em 0,1 mL solução de NaCl 0,9%, por via intraperitoneal. Estes animais foram subdivididos em 05 grupos:

Grupo 2 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos duas horas após a inoculação da lectina;

Grupo 4 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos quatro horas após a inoculação da lectina;

Grupo 8 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos oito horas após a inoculação da lectina;

Grupo 16 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos dezesseis horas após a inoculação da lectina;

Grupo 24 horas (n=06) colhido o sangue e retirado os órgãos vinte e quatro horas após a inoculação da lectina.

Após envenenamento com veneno total, fosfolipase A₂ e lectina C (grupos II, III e IV) e, observado os horários pré-fixados, os animais foram anestesiados levemente por via inalatória com éter dietílico, momento em que foi coletado 1 mL de sangue pelo plexo retro-orbital em microtubos contendo 20µL de heparina 50UI para análise hematológica. Imediatamente após a coleta sanguínea, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos, medula, baço, rins, fígado e coração foram retirados. O rim, coração e fígado foram retirados para análise histológica, a medula para realização do mielograma, a metade do baço foi utilizada para fazer o esplenograma e a outra metade para análise histológica.

3.5 Procedimento experimental para neutralização usando as cabenegrinas A-I e A-II

Para os ensaios de neutralização, 0,996 mg/Kg do veneno total da serpente *B. neuwiedi* foram misturados previamente ou com a cabenegrina A-I ou com a cabenegrina A-II diluídas em solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80.

Todos os ensaios de neutralização foram feitos usando uma relação veneno: planta de 2,5:1 e 5:1, com uma pré-incubação de 30 minutos a 37°C em Banho-Maria. A via de administração utilizada foi a intraperitoneal.

Grupo V - (controle negativo) 1% de polissorbato 80 (tween 80)

Um grupo composto por 06 camundongos foi inoculado apenas com a solução 1% de polissorbato 80 (tween 80). Cada animal recebeu 0,1mL da solução por via intraperitoneal e após 2 horas do envenenamento os animais foram anestesiados levemente por via inalatória com éter dietílico, momento em que foi coletado 1 mL de sangue do plexo retro-orbital em microtubos contendo 20µL de heparina 50UI/mL para análise hematológica.

Grupos VI e VII - (controle negativo) utilizando apenas a cabenegrina A-I ou apenas a cabenegrina A-II

Foram feitos dois grupos compostos por 06 camundongos cada. O primeiro grupo (n=06) foi inoculado pela via intraperitoneal apenas com cabenegrina A-I suspensa em solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80.

O segundo grupo (n=06) foi inoculado pela via intraperitoneal apenas com cabenegrina A-II suspensa em solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80. Ambas cabenegrinas foram inoculadas na dose de 0,996 mg/kg.

Após 2 horas do envenenamento os animais dos grupos V, VI e VII foram anestesiados levemente com éter dietílico, momento em que foi coletado 1 mL de sangue do plexo retro-orbital em microtubos contendo 20µL de heparina 50UI para análise hematológica. Imediatamente após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos, medula, baço, rins, fígado e coração foram retirados. Enquanto que o rim, coração e fígado foram retirados para análise histológica, a medula foi retirada para fazer o mielograma, uma metade do baço foi utilizada para fazer o esplenograma e a outra metade para análise histológica.

Grupos VIII e IX- (controle positivo veneno e cabenegrina A-I nas diluições 2,5:1 e 5:1)

Um grupo composto por 06 animais foi inoculado pela via intraperitoneal com 0,996 mg/Kg de veneno total da serpente *B. neuwiedi* e 0,398mg/kg de cabenegrina A-I, dissolvidos em 0,1mL de solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80 e previamente incubados por 30 minutos a 37°C em Banho-Maria.

Um segundo grupo composto por 06 animais foi inoculado pela via intraperitoneal com 0,996 mg/Kg de veneno total da serpente *B. neuwiedi* e 0,199mg/kg de cabenegrina A-I, dissolvidos em 0,1mL de solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80 e previamente incubados por 30 minutos a 37°C em Banho-Maria.

Grupos X e XI- (controle positivo veneno e cabenegrina A-II nas diluições 2,5:1 e 5:1)

Um grupo composto por 06 animais foi inoculado pela via intraperitoneal com 0,996 mg/Kg de veneno total da serpente *B. neuwiedi* e 0,398mg/kg de cabenegrina A-II, dissolvidos em 0,1mL de solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80 e previamente incubados por 30 minutos a 37°C em Banho-Maria.

Outro grupo composto por 06 animais foi inoculado pela via intraperitoneal com 0,996 mg/Kg de veneno total da serpente *B. neuwiedi* e 0,199mg/kg de cabenegrina A-II, dissolvidos em 0,1mL de solução de NaCl 0,9%, contendo 1% de polissorbato 80 e previamente incubados por 30 minutos a 37°C em Banho-Maria.

Após 2 horas, os animais dos grupos VIII, IX, X e XI foram anestesiados levemente com éter dietílico, momento em que foi coletado 1 mL de sangue do plexo retro-orbital em microtubos contendo 20µL de heparina 50UI para análise hematológica. Imediatamente após a coleta, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os órgãos, medula, baço, rins, fígado e coração foram retirados. Enquanto que o rim, coração e fígado foram retirados para análise histológica, a medula foi retirada para fazer o mielograma, uma metade do baço foi utilizada para fazer o esplenograma e a outra metade para análise histológica.

3.6 Coleta do material para a realização do hemograma completo, mielograma, esplenograma e exame histológico

Considerando que o éter etílico é relativamente atóxico para os órgãos vitais, promovendo anestesia por ação depressora no sistema nervoso central e tendo sido aplicado em diversos trabalhos nos quais se estudou as células sanguíneas, foi adotado como anestésico de escolha para a realização deste experimento (LOMONTE; TARKOWSKI; HANSON, 1993; IZODORO *et al.*, 2003, XIMENES, 2009)

Utilizou-se um sistema fechado de câmara anestésica contendo éter etílico para indução anestésica por inalação. Todas as precauções recomendadas para manuseio de produto inflamável foram seguidas durante o experimento (COBEA, 1991).

Os camundongos foram anestesiados em câmara anestésica saturada de éter etílico, por um período de 30 a 60 segundos. Os sinais de anestesia dos animais foram monitorados através de sinais clínicos como frequência respiratória, respostas reflexas e relaxamento da mandíbula e musculatura abdominal (COBEA, 1991).

Imediatamente após a anestesia foram colhidas amostras de sangue do plexo retro-orbital dos animais, com auxílio de capilares heparinizados. Foi coletado 1 mL de sangue do plexo retro-orbital em microtubos contendo 20 μ L de heparina 50UI/mL para análise hematológica. O hemograma completo foi realizado imediatamente após a coleta.

Ainda sob efeito anestésico, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Após a eutanásia o sacrifício, os animais foram colocados em posição supina sobre prancha para iniciar o procedimento cirúrgico. Com uma tesoura de ponta romba foi realizada uma incisão curta na linha longitudinal mediana com o prolongamento do final da parede abdominal à borda posterior do esterno. Em seguida foi realizada de cada lado uma incisão transversal, ao longo da borda posterior da caixa torácica, através da qual efetuou-se a retirada dos órgãos rim esquerdo, coração, fígado e baço. O fêmur foi coletado após secção cutânea dos membros inferiores e retirada dos músculos anteriores e posteriores. As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade de um dos fêmures com 1 mL de solução salina 0,9% contendo heparina (Liquemine[®] – Roche).

A partir da obtenção do fêmur foi realizado o mielograma. E, os órgãos rim esquerdo, coração, fígado foram utilizados para o exame histológico. O baço obtido foi seccionado transversalmente, sendo uma metade utilizada para análise histológica e outra para o esplenograma.

3.7 Determinações Laboratoriais

3.7.1 Análise Hematológica

3.7.1.1 Hemograma

As análises quantitativas do hemograma foram processadas pelo contador de células sanguíneas Sysmex-Roche, modelo KX-21N. Este analisador hematológico utiliza o princípio de impedância/DC para contagem e classificação das células sanguíneas. Os parâmetros

determinados por ele foram: a contagem do número total de eritrócitos, de leucócitos e de plaquetas; a concentração de hemoglobina; o hematócrito e as constantes corpusculares (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média).

A análise qualitativa (contagem diferencial de leucócitos, morfologia de hemácias, leucócitos e plaquetas) foi realizada em extensões de sangue sem anticoagulante, obtida da primeira gota de sangue coletado, proveniente do plexo retro-orbital e colhido em lâmina. Estas lâminas foram identificadas e coradas utilizando o kit Instant-Prov (Newprov) composto por ciclohexadienos a 0,1%, azobenzenosulfônicos a 0,1% e fenotiazinas a 0,1%. O procedimento de coloração, reagentes utilizados e períodos de incubação foram realizados conforme recomendação do fabricante

As lâminas foram examinadas ao microscópio de luz (Olympus), sob objetiva de imersão (100x). Para a determinação da concentração relativa (percentual) e absoluta (por milímetro cúbico de sangue) dos diferentes tipos de leucócitos, um número mínimo de cem leucócitos por amostra foram analisados. Quinze ou mais campos microscópicos foram examinados para análise morfológica e tintorial de eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

3.7.1.2 Mielograma

Após exposição do fêmur removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade de um dos fêmures com solução de NaCl 0,9%, contendo heparina 20UI/mL (Liquemine[®] – Roche). A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos e cuidadosamente homogeneizada. Uma alíquota da suspensão foi utilizada para determinação do número de células nucleadas. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, após diluição em líquido de Turk - diluente composto por uma solução de 1% de ácido acético glacial.

Para avaliação morfológica e contagem diferencial das células da medula óssea foram confeccionadas lâminas obtidas após citocentrifugação (centrífuga citológica modelo Incibrás, Brasil) de 50µl da suspensão celular, por 5 minutos a 1000rpm e submetidas à coloração, utilizando o kit Instant-Prov (Newprov) composto por ciclohexadienos a 0,1%, azobenzenosulfônicos a 0,1% e fenotiazinas a 0,1%. O procedimento de coloração, reagentes utilizados e períodos de incubação foram realizados conforme recomendação do fabricante.

Para identificação morfológica e quantificação dos diferentes tipos celulares foram analisadas 500 células por lâmina por animal. Os valores absolutos de cada série foram determinados através da multiplicação das porcentagens relativas pelo número de células nucleadas de cada animal.

3.7.1.3 Esplenograma

Após a retirada, o baço foi seccionado transversalmente e com o pedaço cortado, através do contato da superfície em questão com a lâmina de vidro foram feitas impressões na lâmina “imprint”. Em seguida, a lâmina contendo o imprint foi corada utilizando o kit Instant-Prov (Newprov) composto por ciclohexadienos a 0,1%, azobenzenosulfônicos a 0,1% e fenotiazinas a 0,1%. O procedimento de coloração, reagentes utilizados e períodos de incubação foram realizados conforme recomendação do fabricante.

Para identificação morfológica e quantificação dos diferentes tipos celulares foram analisadas 300 células por lâmina por animal.

3.7.1.4 Critérios para classificação das células hematopoiéticas

A classificação das células da linhagem granulocítica nos órgãos hematopoiéticos de camundongos foi baseada na relação núcleo-citoplasma, afinidade tintorial do citoplasma, na presença ou não de granulações primária e secundária no citoplasma, no padrão de cromatina nuclear, na presença ou não de nucléolos, no diâmetro e segmentação ou não do núcleo.

Na série granulocítica considerou-se quatro etapas maturativas: blastos, envolvendo o mieloblasto; formas jovens, englobando as etapas de promielócito e mielócito; formas em anel, correspondentes ao metamielócito e ao bastonete; segmentados, envolvendo as formas segmentadas a partir de 2 lóbulos nucleares (GARCIA, 1992).

Os precursores eritróides foram classificados em: eritroblastos jovens, envolvendo proeritroblastos e eritroblastos basófilos; eritroblastos policromáticos, englobando todas as etapas em que as células apresentavam cromatina condensada e citoplasma policromático e eritroblastos ortocromáticos, incluindo células com núcleo apresentando cromatina picnótica e citoplasma eosinofílico. Quando as células apresentavam assincronismo maturativo,

prevaleceu o aspecto da cromatina nuclear para identificação da etapa maturativa (GARCIA, 1992).

As células da linhagem linfóide envolvendo prolinfócitos, linfócitos típicos ou atípicos foram agrupadas como linfócitos. Enquanto que os megacarioblastos, megacariócito basófilo e megacariócito acidófilo foram grupados como série megacariocítica. Promonócitos e monócitos foram reunidos em um grupo de células denominadas monocitóides. As células da linhagem plasmocitária foram agrupadas como plasmócitos. Por sua vez, as células monocitóides, os plasmócitos, macrófagos, células em mitose e células degeneradas foram classificadas como “outras células” (GARCIA, 1992).

3.7.1.4.1 Relação mielóide-eritróide

A relação mielóide-eritróide (M/E) tanto medular quanto esplênica foi avaliada determinando-se a proporção entre os elementos granulocíticos e precursores eritróides contando-se, no mínimo, 500 e 300 células por lâmina relativa ao mielograma e esplenograma, respectivamente.

3.7.1.4.2 Relação linfóide-eritróide

A relação linfóide-eritróide (L/E) esplênica foi avaliada determinando-se a proporção entre os elementos linfóides e precursores eritróides contando-se, no mínimo, 300 células por lâmina relativa ao esplenograma.

3.8 Análise Histológica

Os rins, coração, baço e fígado foram acondicionados em frasco contendo formol 10% até 12 horas e conservados em álcool a 70%, para proceder à análise histológica. O controle foi obtido com os mesmos órgãos retirados de animais utilizados como controle no protocolo experimental.

Os fragmentos dos órgãos dos animais foram desidratados, diafanizados e em seguida cortados no micrótomo, numa espessura de 5µm. Procedeu-se à coloração do material por

hematoxilina-eosina (H.E.) e as lâminas foram analisadas em microscópios de luz. Foram utilizados o microscópio trinocular Motic BA310/câmera Moticam 2000 - 2.0 mp live resolution e o microscópio trinocular Opton N ordem 8969/câmera Opten TA 0124-XS.

As lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Anatomia Patológica – Biopse e no Laboratório de Histologia dos Efeitos Causados pelos Venenos de Serpentes e Plantas (HISTOVESP), este último pertencente à Universidade Estadual do Ceará. A avaliação das lâminas foi feita pelos professores Dr. Dalgimar Beserra de Menezes (Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará) e pela Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista (Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará).

3.9 Reagentes Utilizados nos Experimentos

Ácido etilenodiaminotetracético-EDTA (Reagen[®]), heparina (Liquemine[®] – Roche), 1% de polissorbato 80 (Synth[®]), éter etílico (Synth[®]), solução fisiológica estéril a 0,9%, (Synth[®]), solução de Turk (Merck[®]), corante May-Gruwal-Giemsa (Doles[®]), álcool etílico absoluto (Synth[®]), álcool etílico 70% (700mL de álcool etílico absoluto (Synth[®]) para 300mL de água destilada), solução de formol a 10% (10mL de formaldeído P.A (Synth[®]) para 90mL de água destilada). Todos os outros reagentes foram obtidos no mais alto nível de pureza disponível no mercado.

3.10 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Nas comparações entre os grupos a significância estatística foi avaliada através de dois testes: o teste paramétrico oriundo da análise de variância (ANOVA) e o teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, com distribuição empírica obtida via Bootstrap. Foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada usando o software livre R, versão 2.12.0.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados do hemograma, mielograma e esplenograma dos camundongos *Swiss* tratados com salina, tween, cabenegrina A-I com tween e cabenegrina A-II com tween.

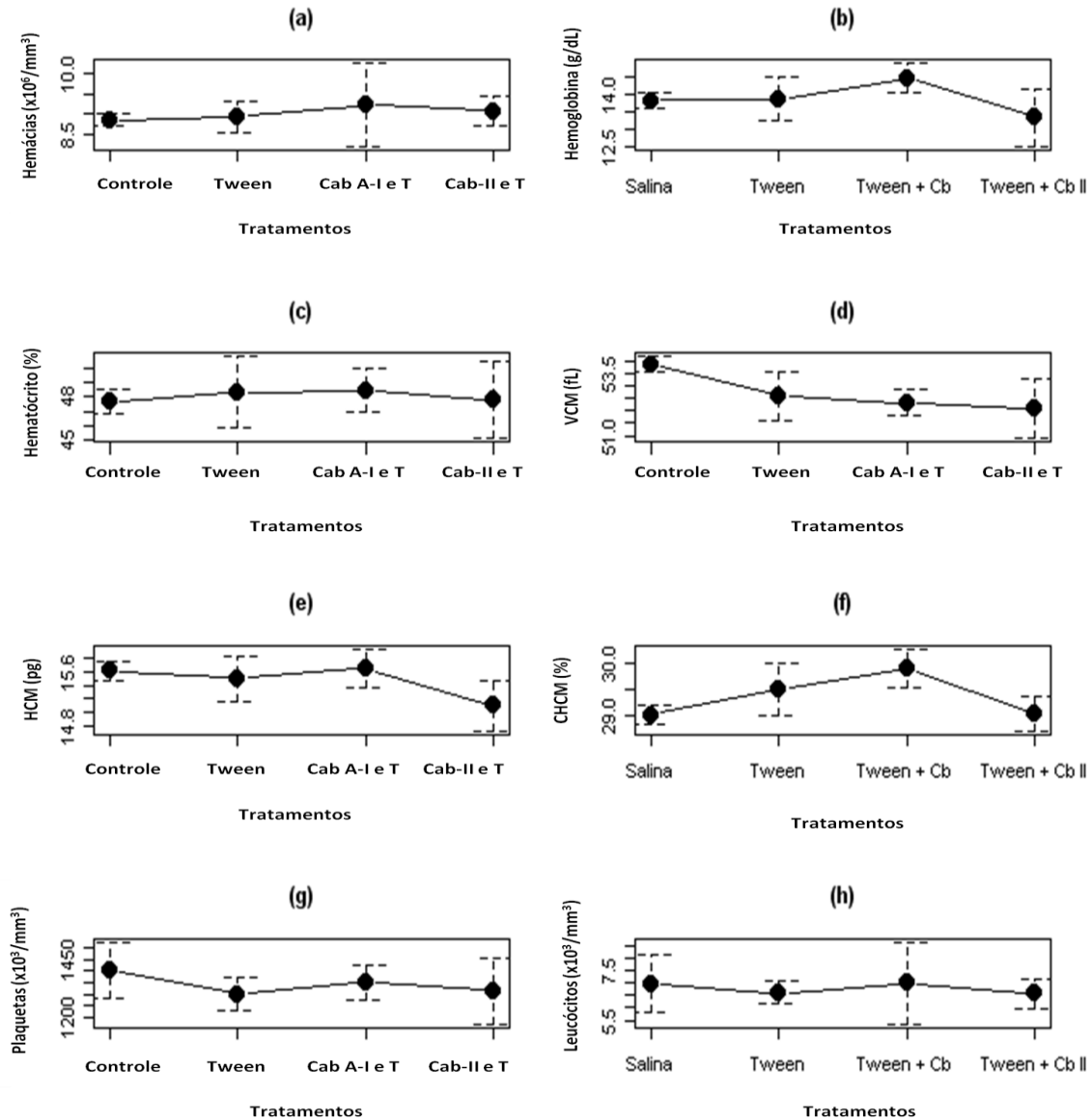


Figura 8 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos *Swiss* tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

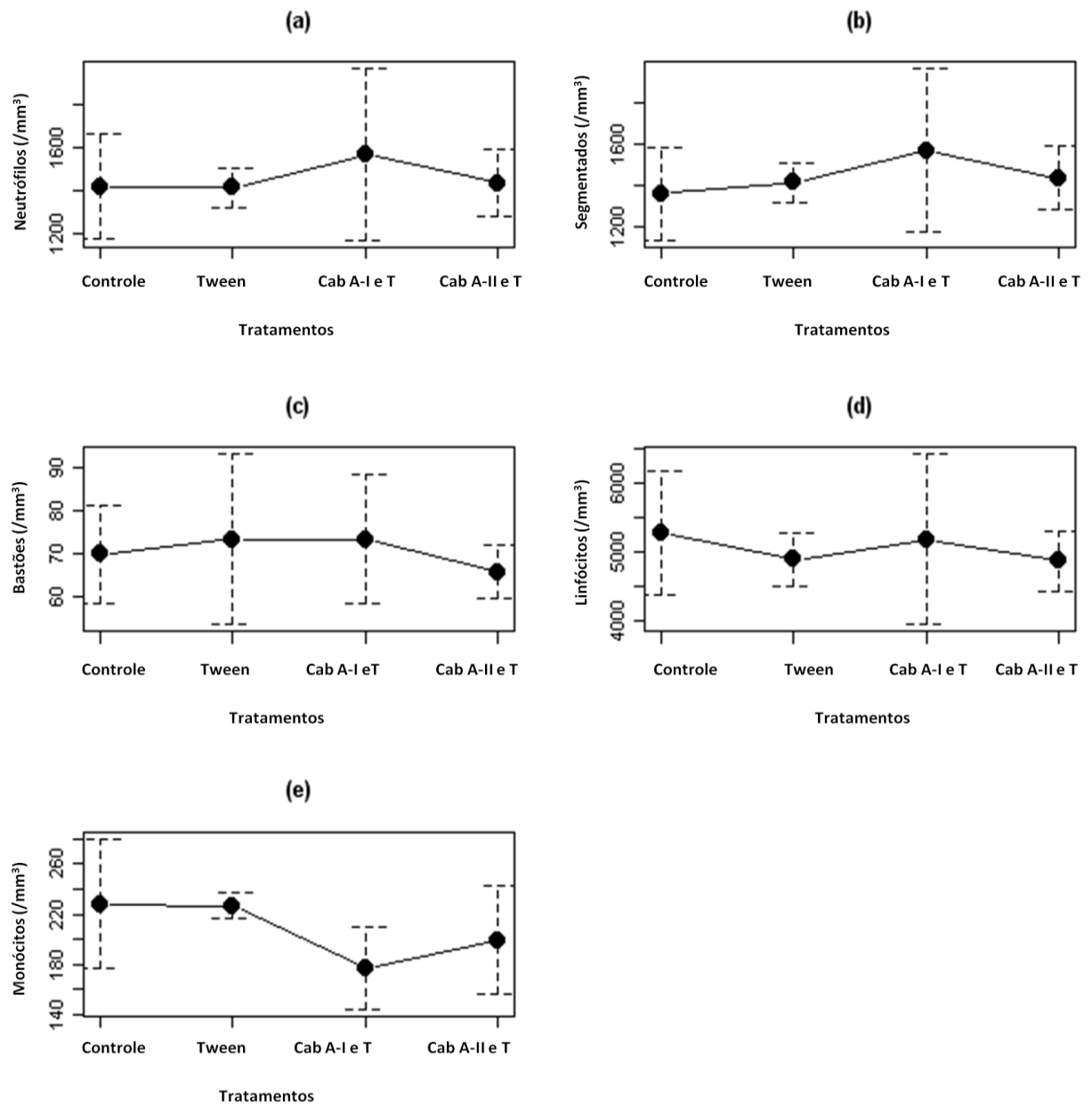


Figura 9 – Estudo da contagem diferencial de leucócitos, através do leucograma, de camundongos *Swiss* tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

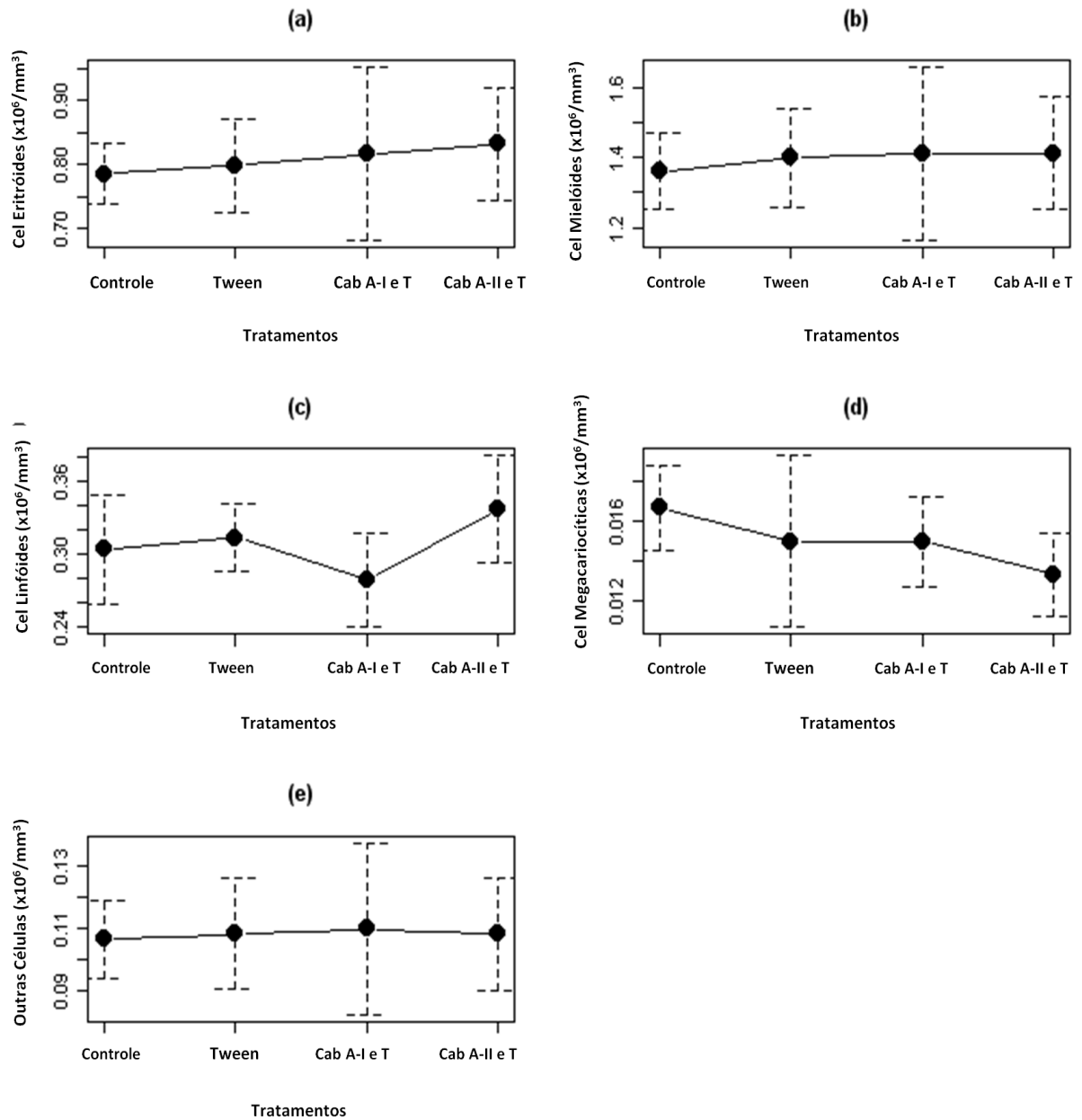


Figura 10 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos Swiss tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

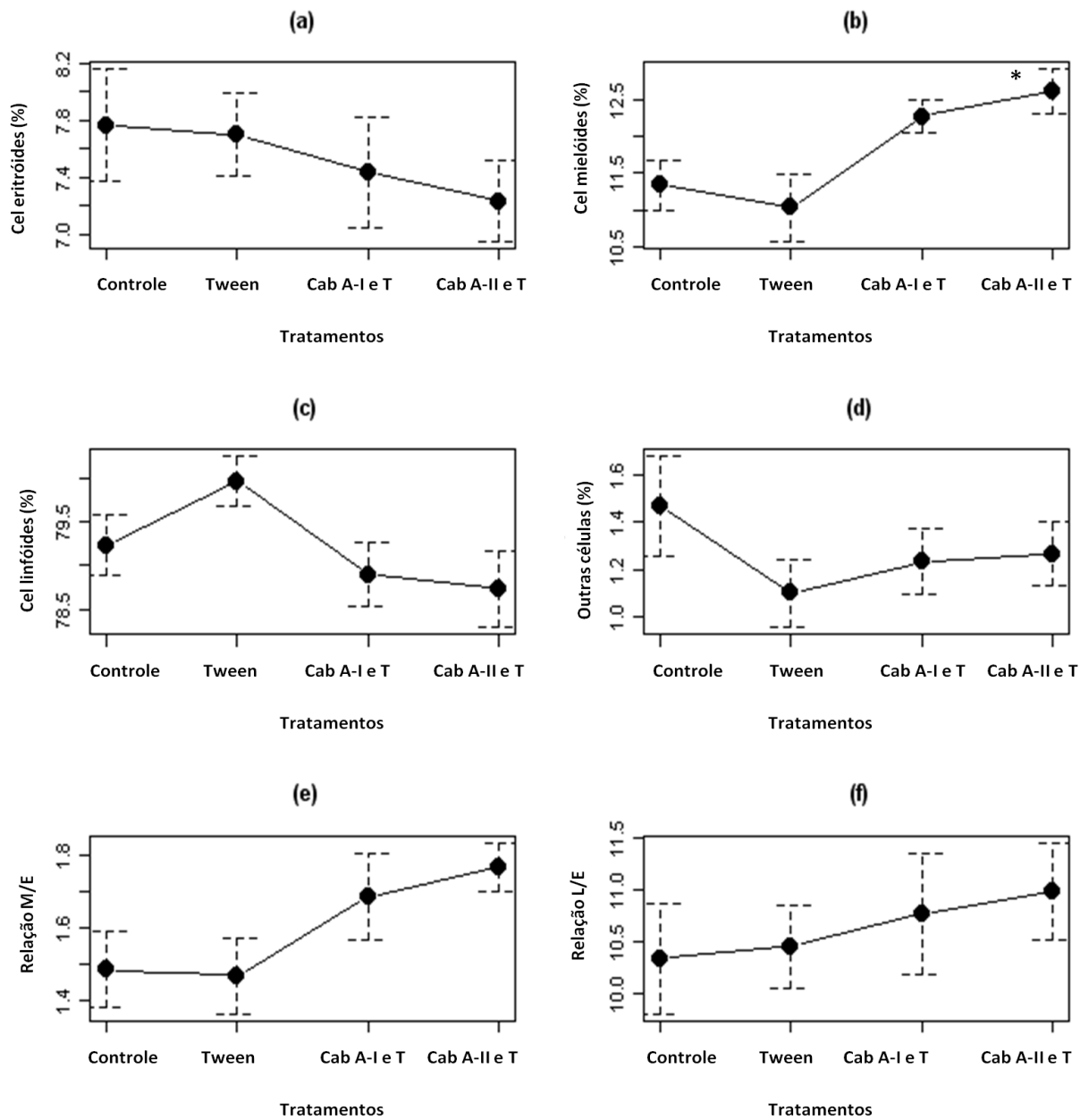


Figura 11 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos *Swiss* tratados com tween, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

Fizemos um teste comparativo entre o controle salina, o tween e as cabenegrinas associadas com tween para saber se o tween sozinho ou as cabenegrinas com tween provocam alterações hematológicas que podem influenciar nos resultados do teste. Lembrando que as cabenegrinas precisaram ser diluídas com tween para serem aplicadas nos animais.

Para efeito de comparação foram utilizados dois testes: o teste paramétrico oriundo da ANOVA e o teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, com distribuição empírica obtida via Bootstrap.

Na figura 8, apresentamos os resultados dos testes de comparação referentes às diferenças do número médio de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, plaquetas e leucócitos. Não foi detectada nenhuma diferença, ao nível de 5%, evidenciando que não existe diferença significativa entre o número médio das células e índices hematimétricos, quando se utiliza o controle salina, tween isoladamente ou tween em conjunto com as cabenegrinas A-I ou A-II.

Na figura 9 apresentamos os resultados dos testes de comparação referentes às diferenças do número médio de células para a contagem diferencial. Não foi detectada nenhuma diferença, ao nível de 5%, evidenciando que não existe diferença significativa entre o número médio de células (neutrófilos, bastões, segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos), quando se utiliza o controle salina, tween isoladamente ou tween em conjunto com a cabenegrina A-I ou A-II.

Pela figura 10, vimos que na medula óssea não existe diferença entre o número médio de células (eritróides, mielóides, linfóides, megacariocíticas e outras células) quando se utiliza apenas o controle salina, o tween ou o tween conjuntamente com as cabenegrinas A-I ou A-II.

Na figura 11 apresentamos os resultados dos testes de comparação referentes a diferença do número médio de células do esplenograma. A única diferença detectada ao nível de 5% foi no percentual de células mielóides, para todas as demais não ocorreu diferença significativa entre o número médio percentual de células (eritróides, linfóides e outras células), quando se utilizou o controle salina, tween isoladamente ou tween em conjunto com as cabenegrinas A-I ou A-II. O mesmo foi válido com respeito às relações M/E e L/E, ao nível de 5%.

4.2 Resultados do hemograma dos camundongos Swiss tratados com fosfolipase A₂, lectina C e veneno total da serpente *B. neuwiedi* em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II.

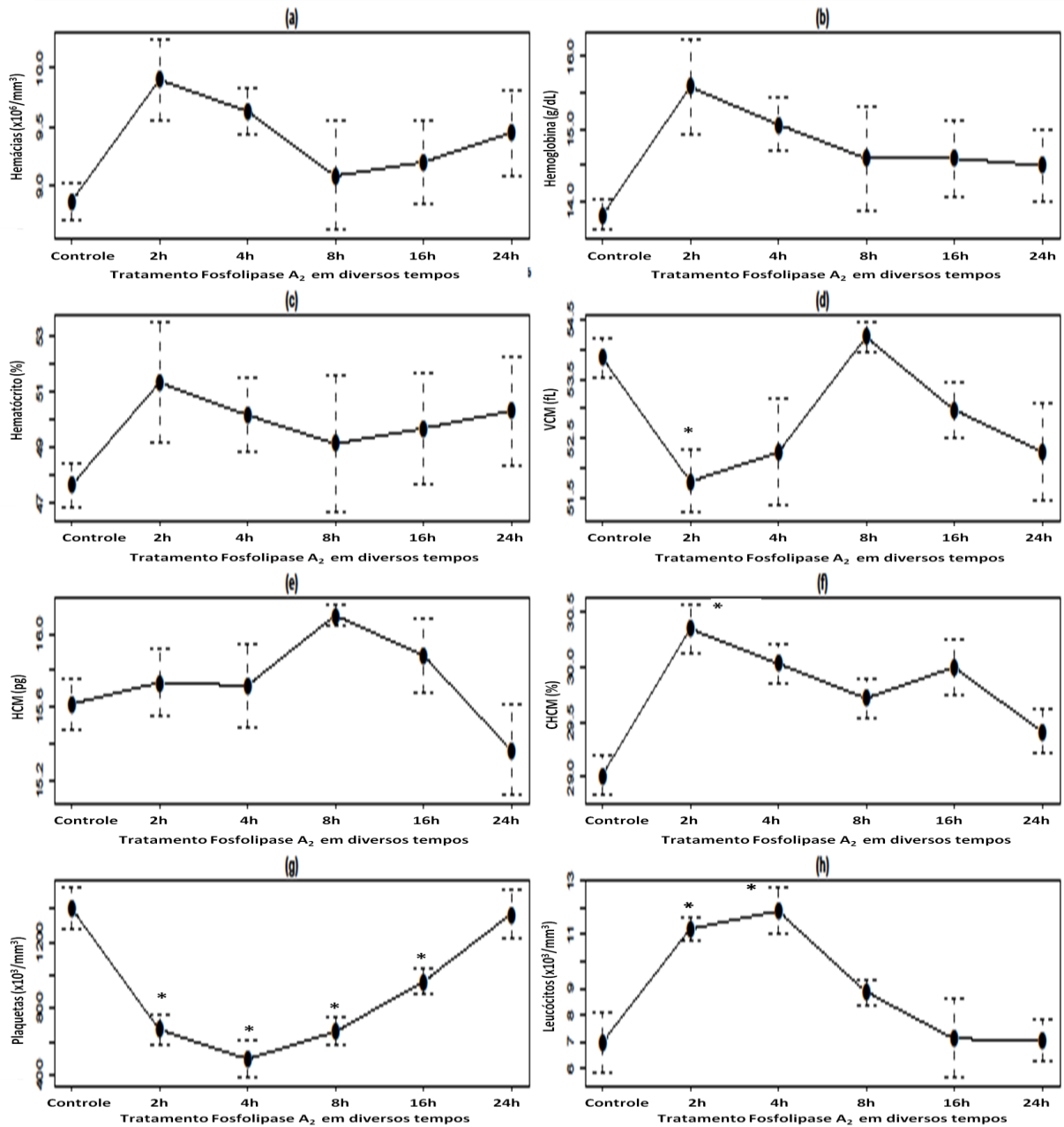


Figura 12 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos Swiss tratados com fosfolipase A₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

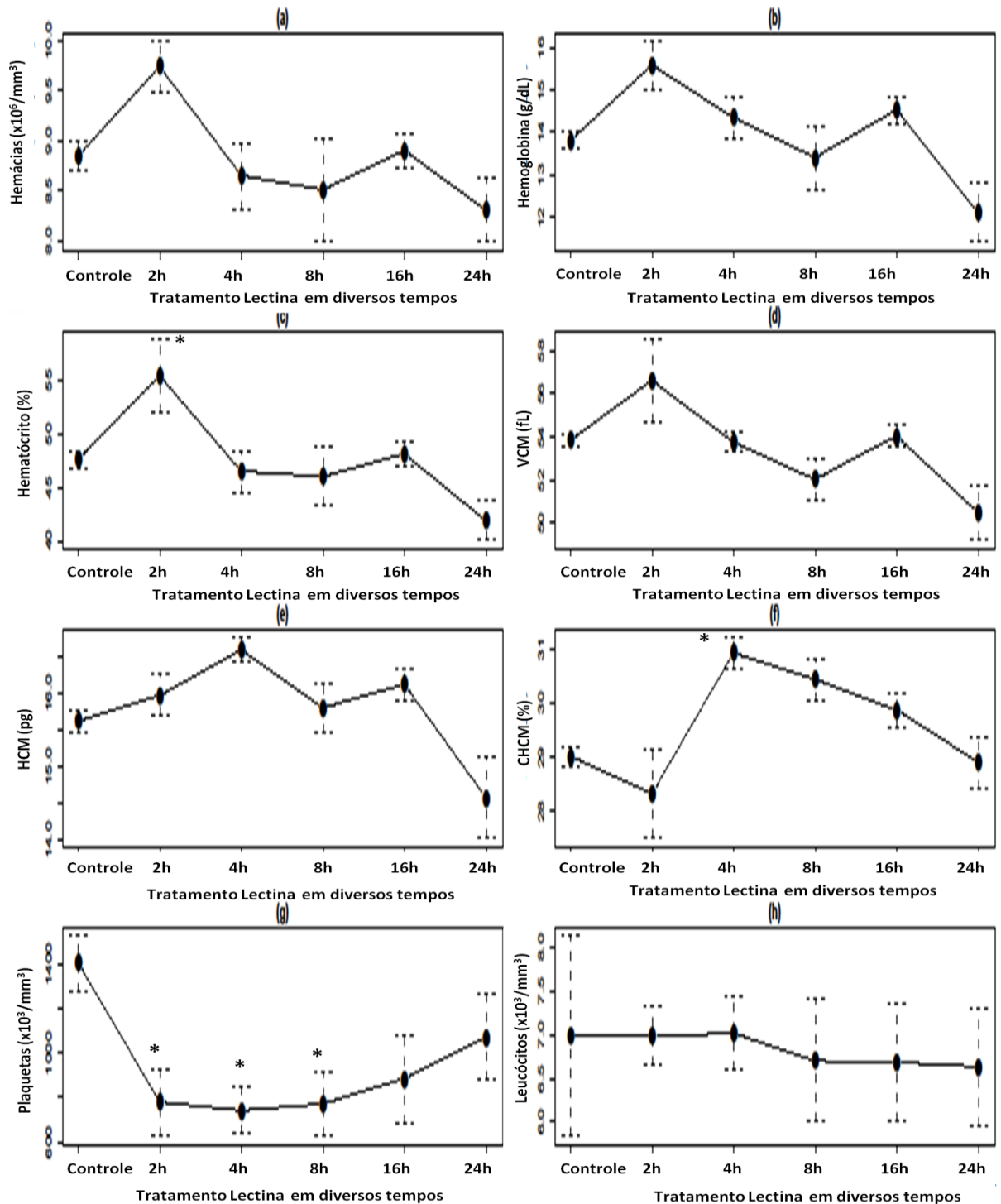


Figura 13 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos *Swiss* tratados com lectina C (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

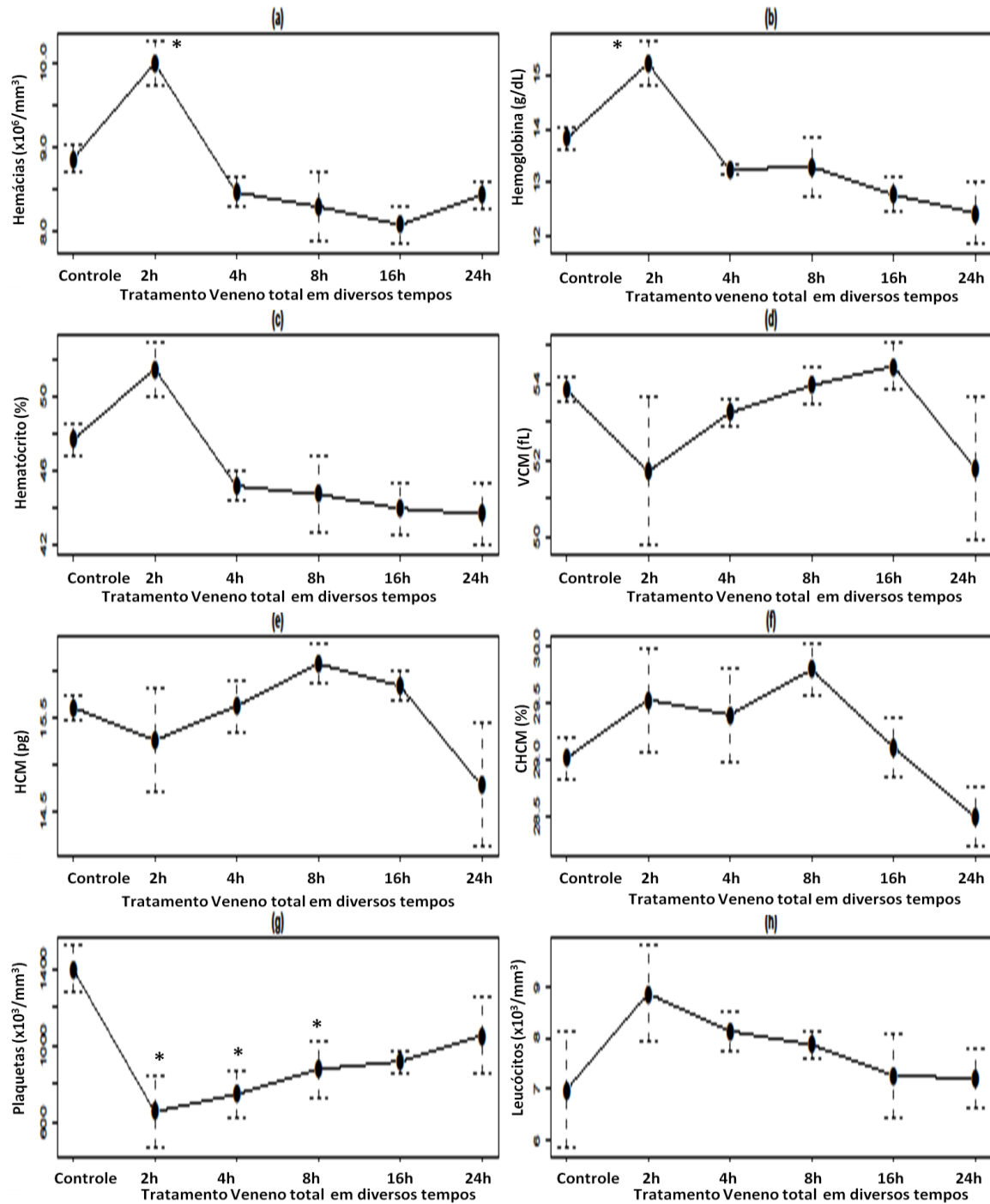


Figura 14 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. newiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

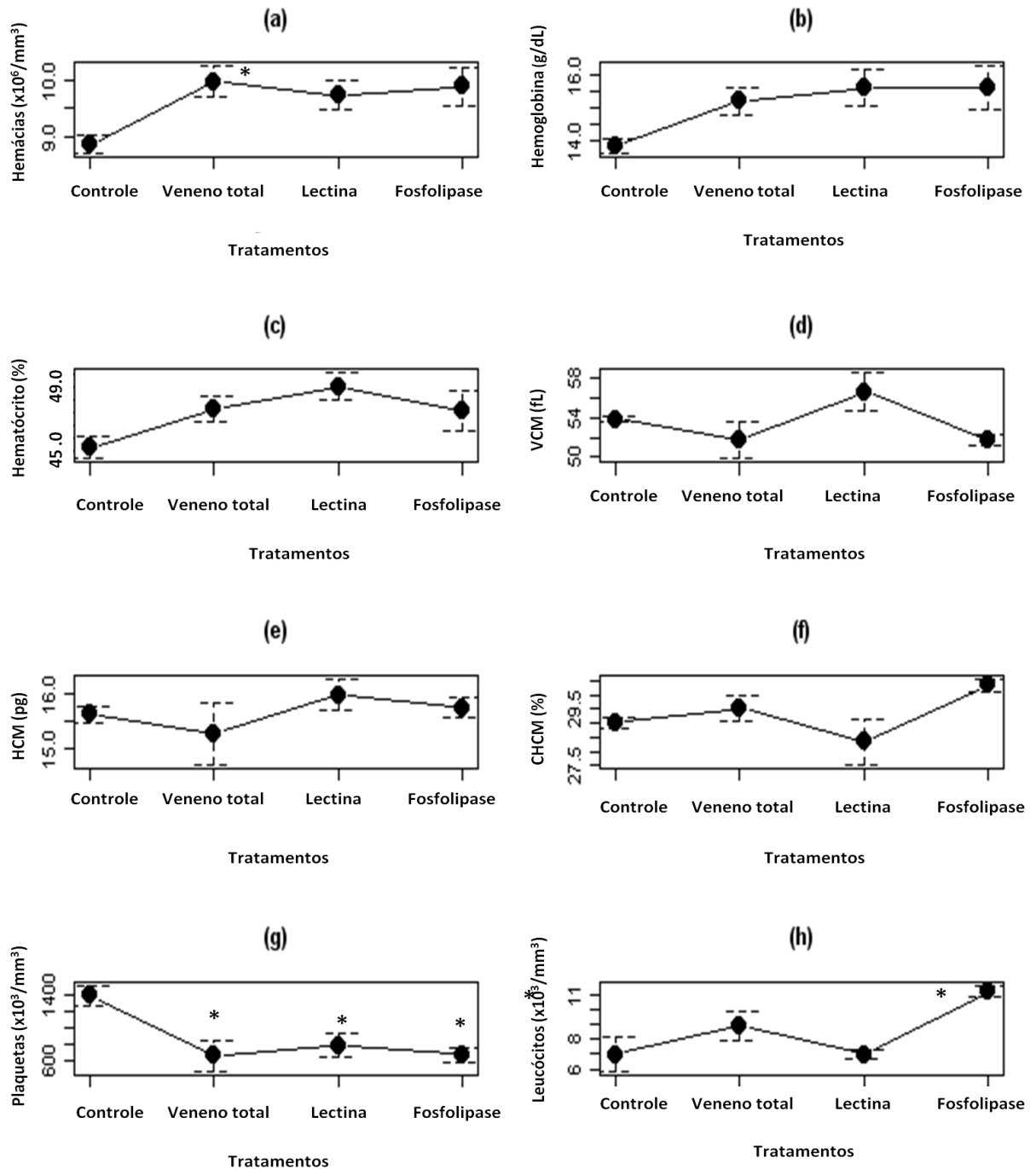


Figura 15 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase A_2 (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. neuwiedi* no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

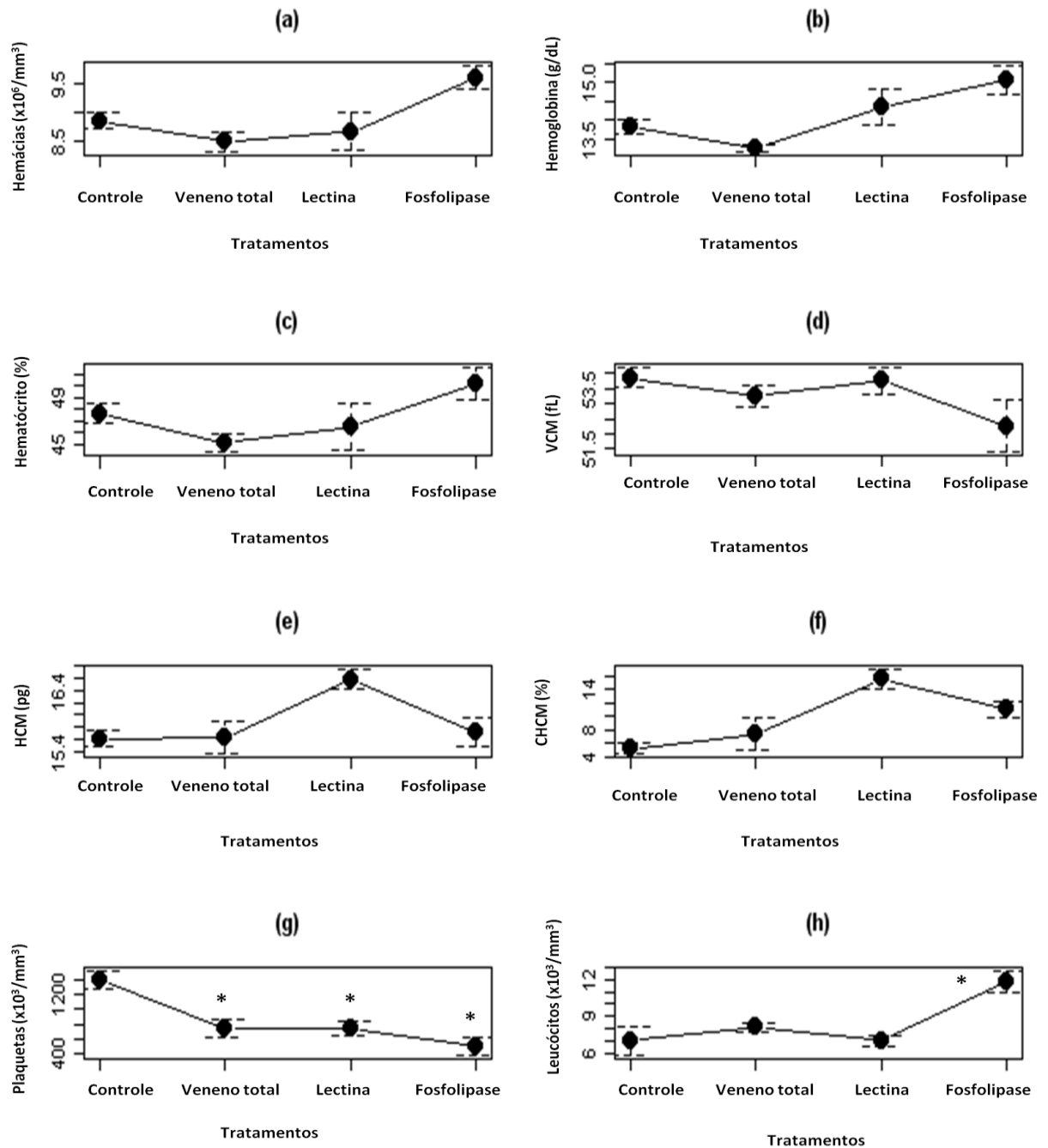


Figura 16 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. neuwiedi* no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

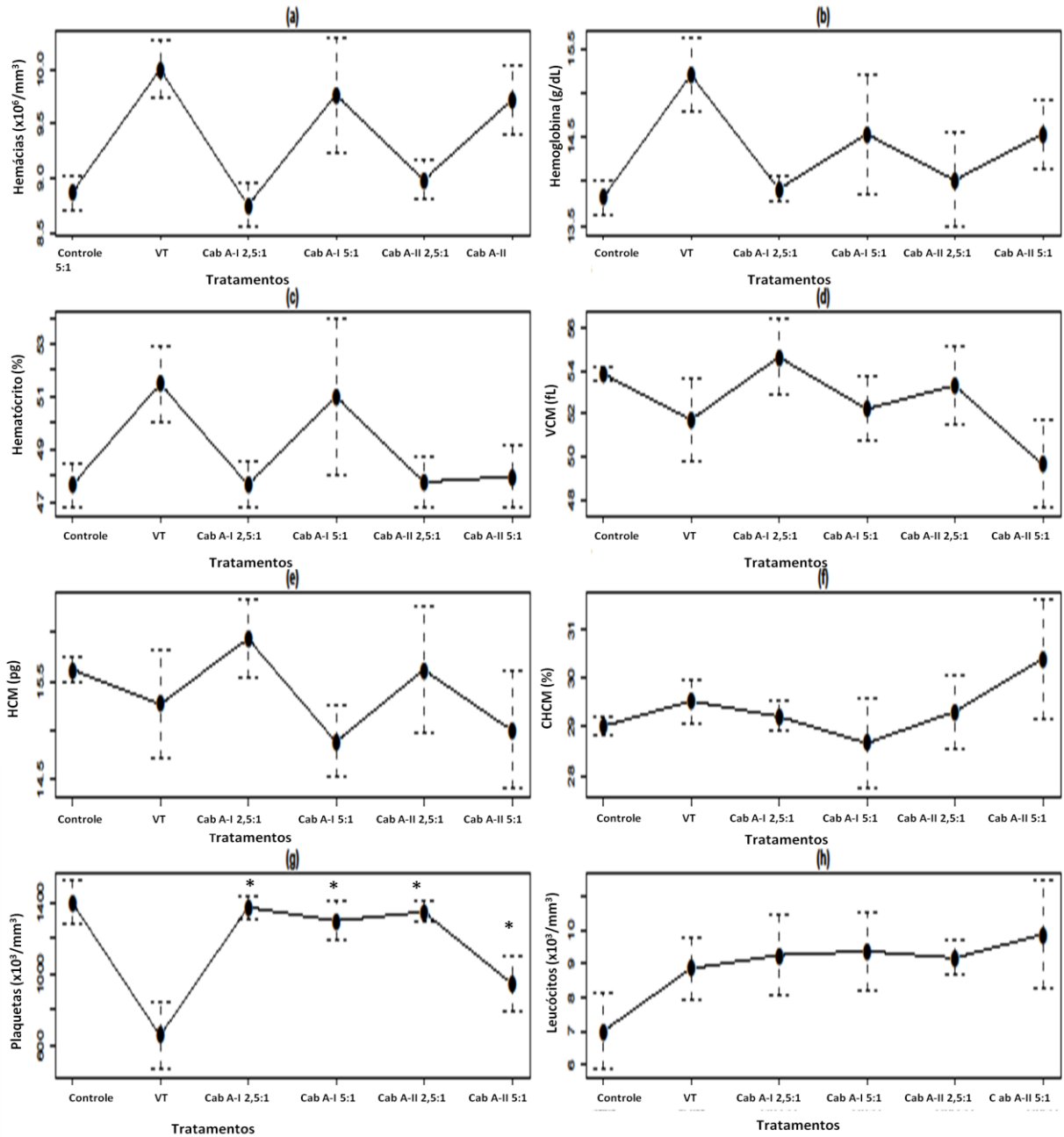


Figura 17 – Estudo do sangue do plexo retro-orbital, através do hemograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total da serpente *B. neuwiedi*, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

Os resultados mostraram que com o uso de fosfolipase A₂, as alterações hematológicas que apresentaram diferença estatística significativa foram: a diminuição do VCM e o aumento do CHCM às duas horas, a leucocitose às duas e quatro horas e diminuição do número de plaquetas as duas, quatro, oito e dezesseis horas após o envenenamento (Figura 12).

Com o uso de lectina C, as alterações que apresentaram significância estatística foram: o aumento do hematócrito e CHCM, às duas e quatro horas, respectivamente e a diminuição do número de plaquetas as duas, quatro e oito horas após o envenenamento (Figura 13).

As alterações hematológicas estatisticamente significantes com o uso de veneno total foram: o aumento do número de hemácias e da dosagem de hemoglobina às duas horas, respectivamente e a diminuição do número de plaquetas as duas, quatro e oito horas após o envenenamento (Figura 14).

Ocorreu plaquetopenia com o uso de veneno total e com o uso das frações (Figuras 12, 13 e 14), sendo que a plaquetopenia foi mais persistente com o uso de fosfolipase A₂, chegando até dezesseis horas.

Foram feitos testes de comparação apenas nos tempos duas e quatro horas, que foram os momentos que mais ocorreram alterações hematológicas, para ver se foi o veneno total ou as frações que apresentaram ação mais intensa. Na figura 15 observou-se que o veneno total provocou eritrocitose significativa, quando comparado com as frações fosfolipase A₂ e lectina C. Em relação aos leucócitos, a fração fosfolipase A₂ foi a que provocou leucocitose significativa quando comparada com o veneno total e com a fração lectina C. As plaquetas apresentaram alteração significativa (no caso diminuição), comparativamente ao grupo controle, mas os efeitos do veneno total, fosfolipase A₂ e lectina C foram semelhantes entre si.

A figura 16 compara as frações e o veneno total apenas no tempo quatro horas. Verificou-se que a fração fosfolipase A₂ foi a que provocou leucocitose significativa quando comparada com o veneno total e com a fração lectina C, entretanto os efeitos do veneno total, fosfolipase A₂ e lectina C foram semelhantes na indução da plaquetopenia.

A figura 17 mostra o tratamento dos animais com as cabenegrinas. Embora o veneno total tenha induzido eritrocitose, aumento da dosagem de hemoglobina, leucocitose e plaquetopenia. As cabenegrinas A-I 2,5:1, A-I 5:1 e A-II 2,5:1 só conseguiram neutralizar a plaquetopenia provocada pelo veneno total.

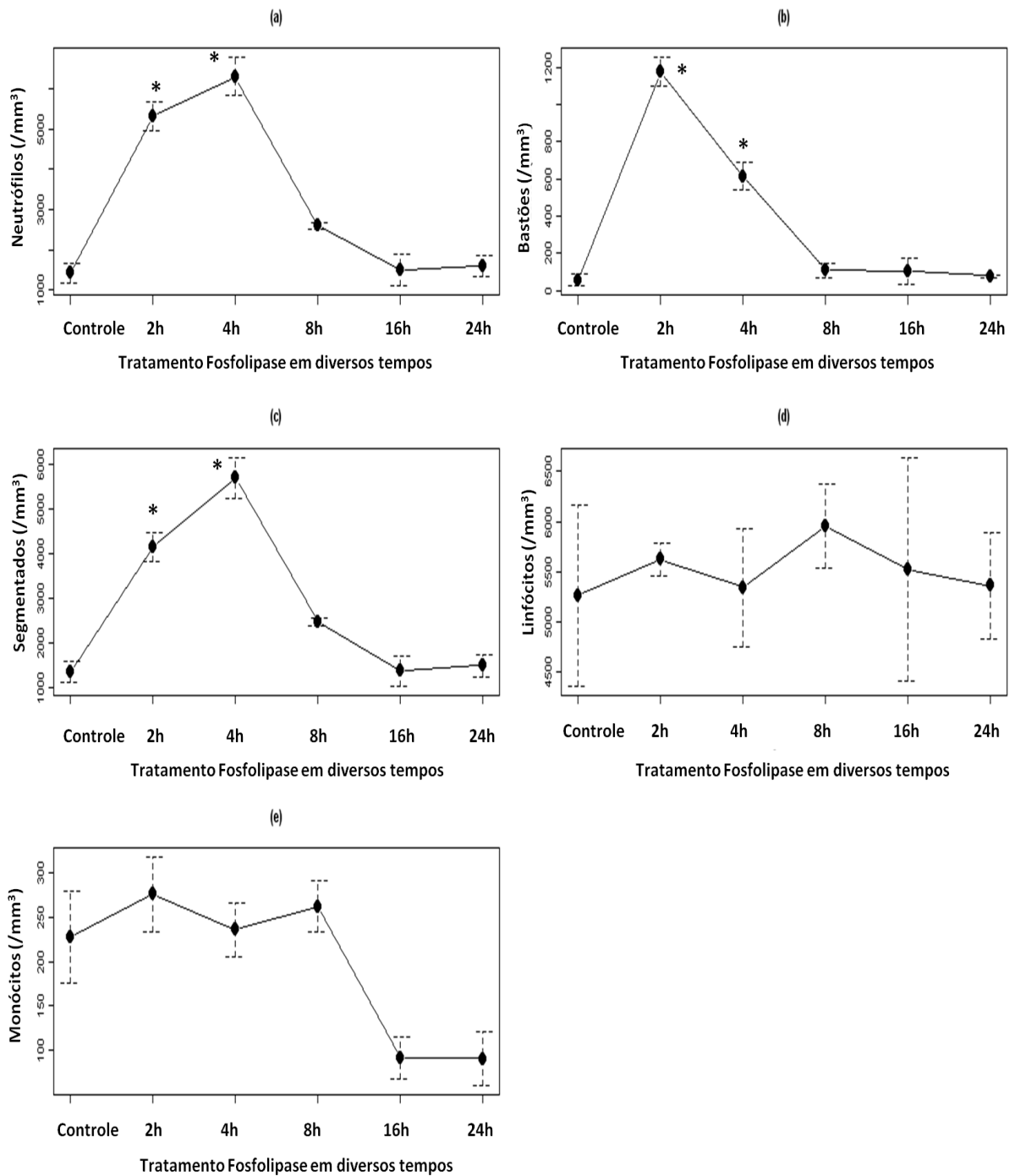


Figura 18 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos *Swiss* tratados com fosfolipase A₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

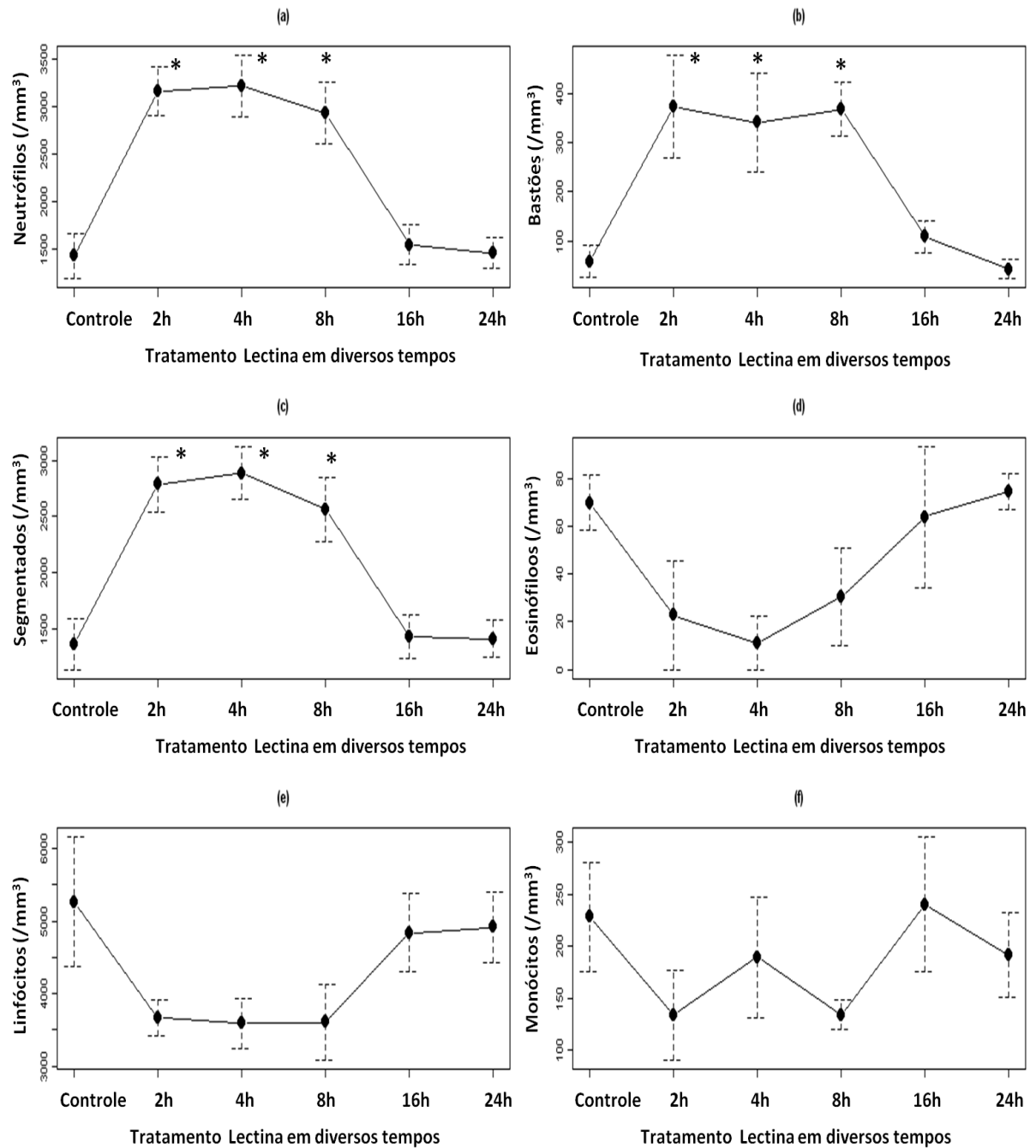


Figura 19 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos *Swiss* tratados com lectina C (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

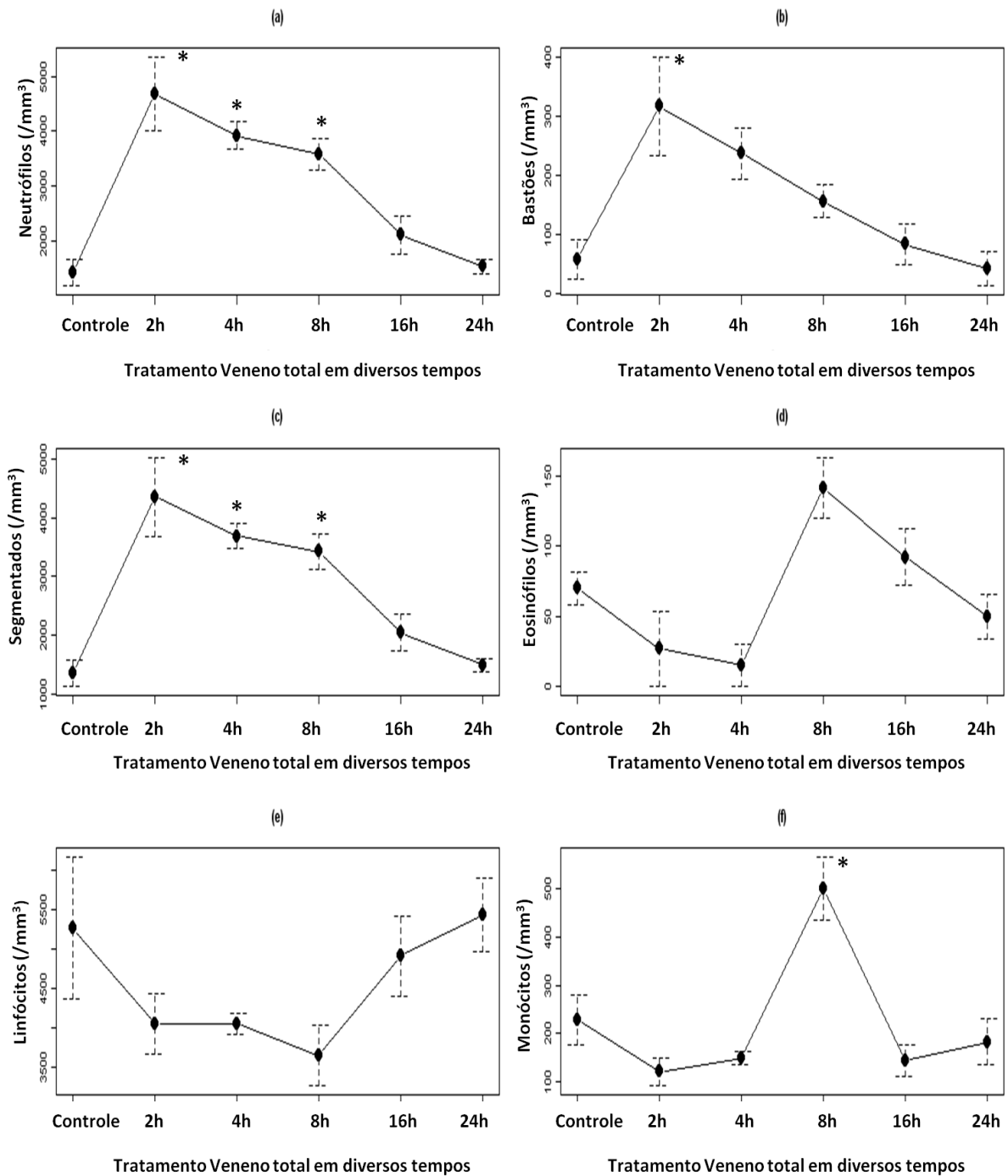


Figura 20 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. newiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

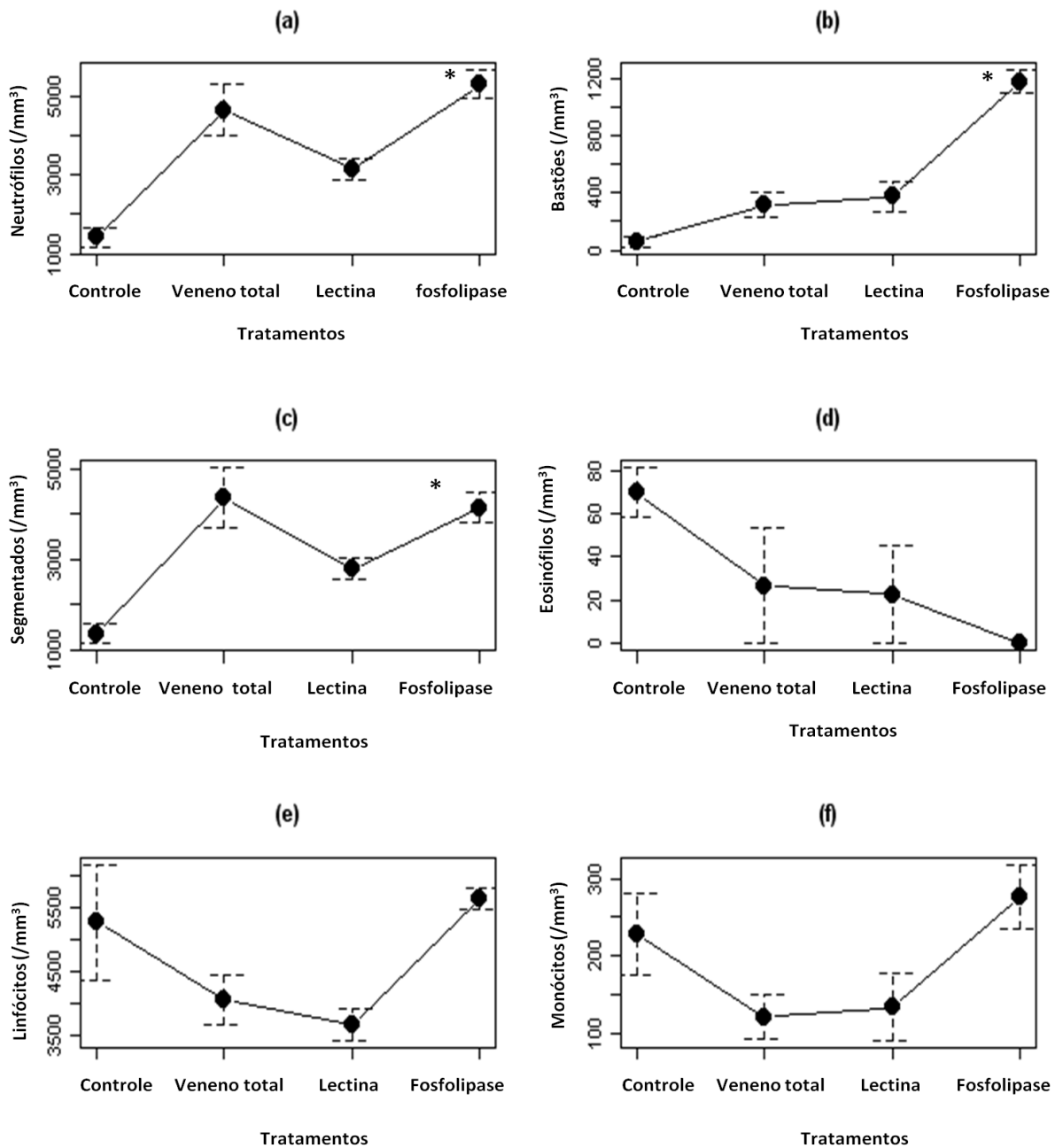


Figura 21 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. neuwiedi* no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle. Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

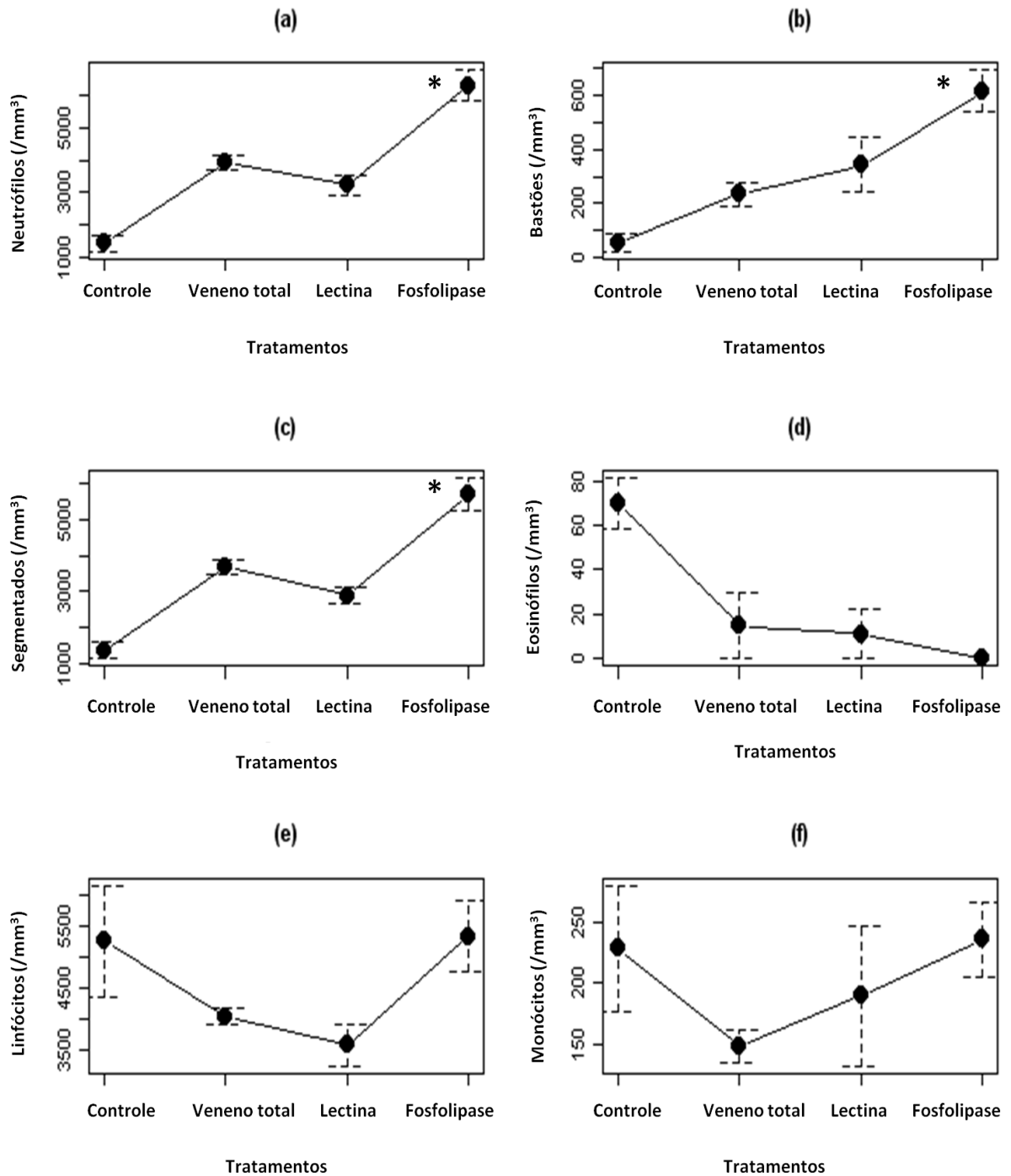


Figura 22 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. neuwiedi* no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle. Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

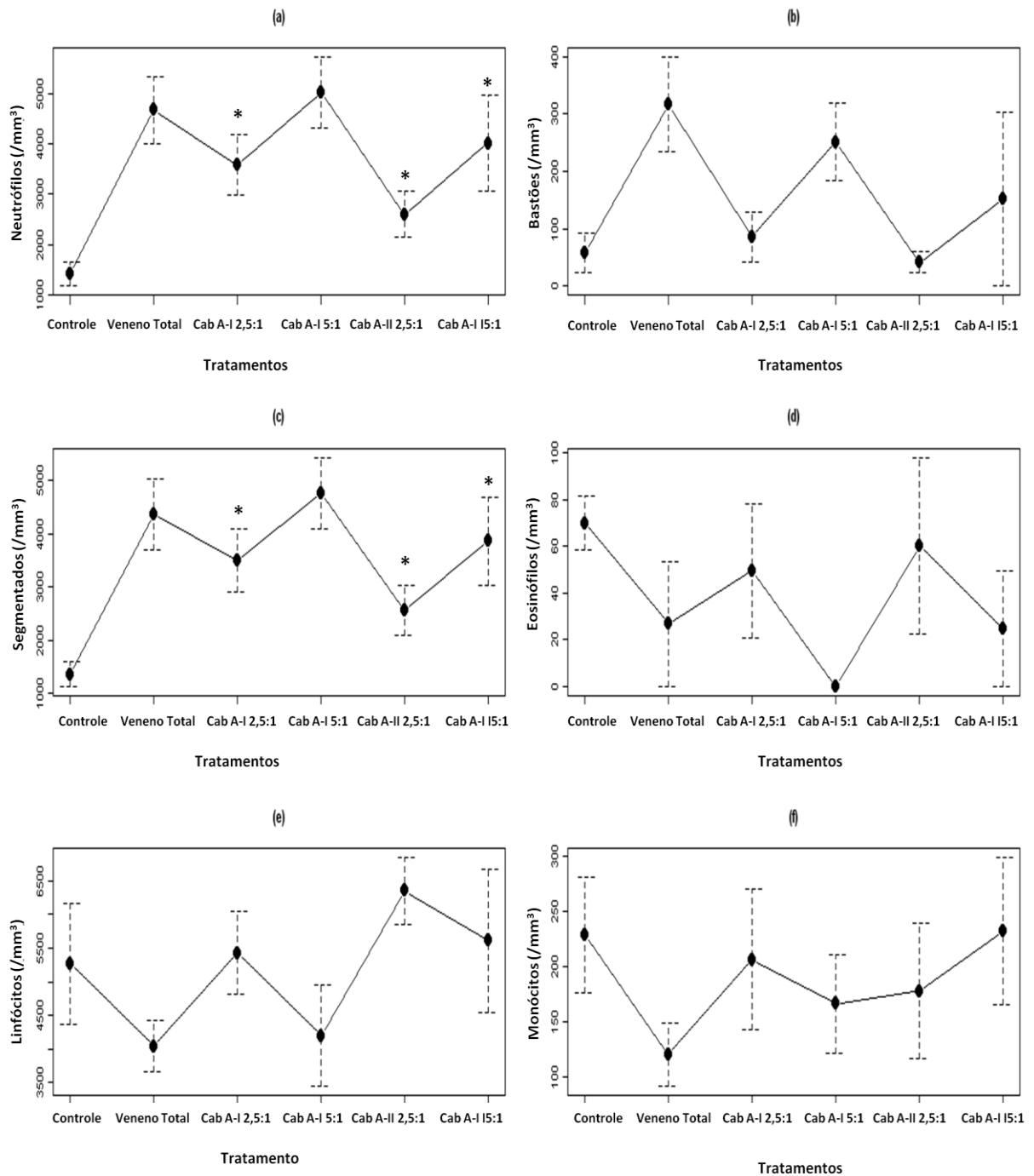


Figura 23 – Estudo da contagem diferencial dos leucócitos, através do leucograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total da serpente *B. neuwiedi*, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

As Figuras 18, 19 e 20 mostram os resultados dos testes de comparação referente às médias dos números de neutrófilos totais, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos do sangue do plexo retro-orbital de camundongos *Swiss* em diferentes tempos.

Com o uso de fosfolipase A_2 , as alterações hematológicas que apresentaram significância estatística foram: o aumento do número de neutrófilos bastões e segmentados às duas e quatro horas após o envenenamento (Figura 18). Com relação ao número médio de células eosinofílicas, estas não foram analisadas devido à falta de variabilidade entre os tempos.

Com o uso de lectina C, as alterações na contagem diferencial que apresentaram significância estatística foram: o aumento do número de neutrófilos bastões e segmentados nos tempo duas, quatro e oito horas após o envenenamento (Figura 19).

Na figura 20, verificou-se que as alterações na contagem diferencial que apresentaram significância estatística foram: o aumento do número de neutrófilos segmentados as duas, quatro e oito horas, aumento de neutrófilos bastões e monócitos apenas as duas e oito horas, respectivamente, após o envenenamento.

As duas horas ocorreu neutrofilia com desvio à esquerda com todas as frações e veneno total (Figuras 18, 19 e 20). Entretanto este desvio à esquerda foi mais persistente, até 8 horas, com o uso de lectina C.

Foram feitos testes de comparação apenas nos tempos duas e quatro horas, que foram os momentos que mais ocorreram alterações hematológicas, para ver se foi o veneno total ou as frações que apresentaram ação mais intensa. Observamos que às duas horas e quatro horas, a fração fosfolipase A_2 teve ação mais intensa, ou seja, provocou maior desvio à esquerda, comparativamente ao uso de veneno total e fração lectina C (Figuras 21 e 22).

O tratamento com as cabenegrinas mostrou que as cabenegrinas A-I na diluição 2,5:1 e as cabenegrinas A-II nas diluições 2,5:1 e 5:1 inibiram o aumento da contagem diferencial, ou seja, as referidas cabenegrinas diminuíram o número de neutrófilos segmentados, refletindo também no número de neutrófilos totais (Figura 23).

4.3 Resultados do mielograma dos camundongos *Swiss* tratados com fosfolipase A₂, lectina C e veneno total da serpente *B. neuwiedi* em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II.

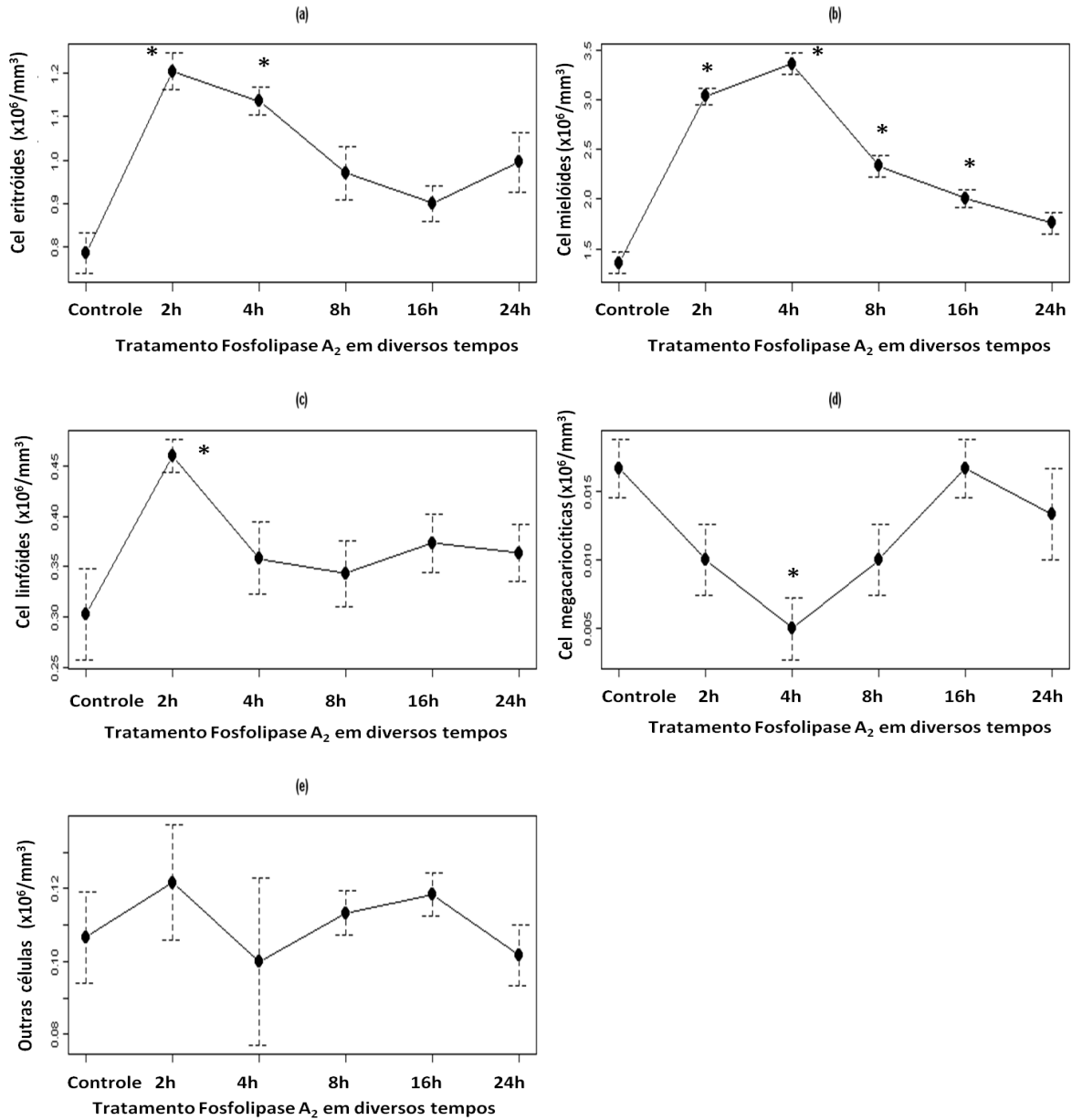


Figura 24 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos *Swiss* tratados com fosfolipase A₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

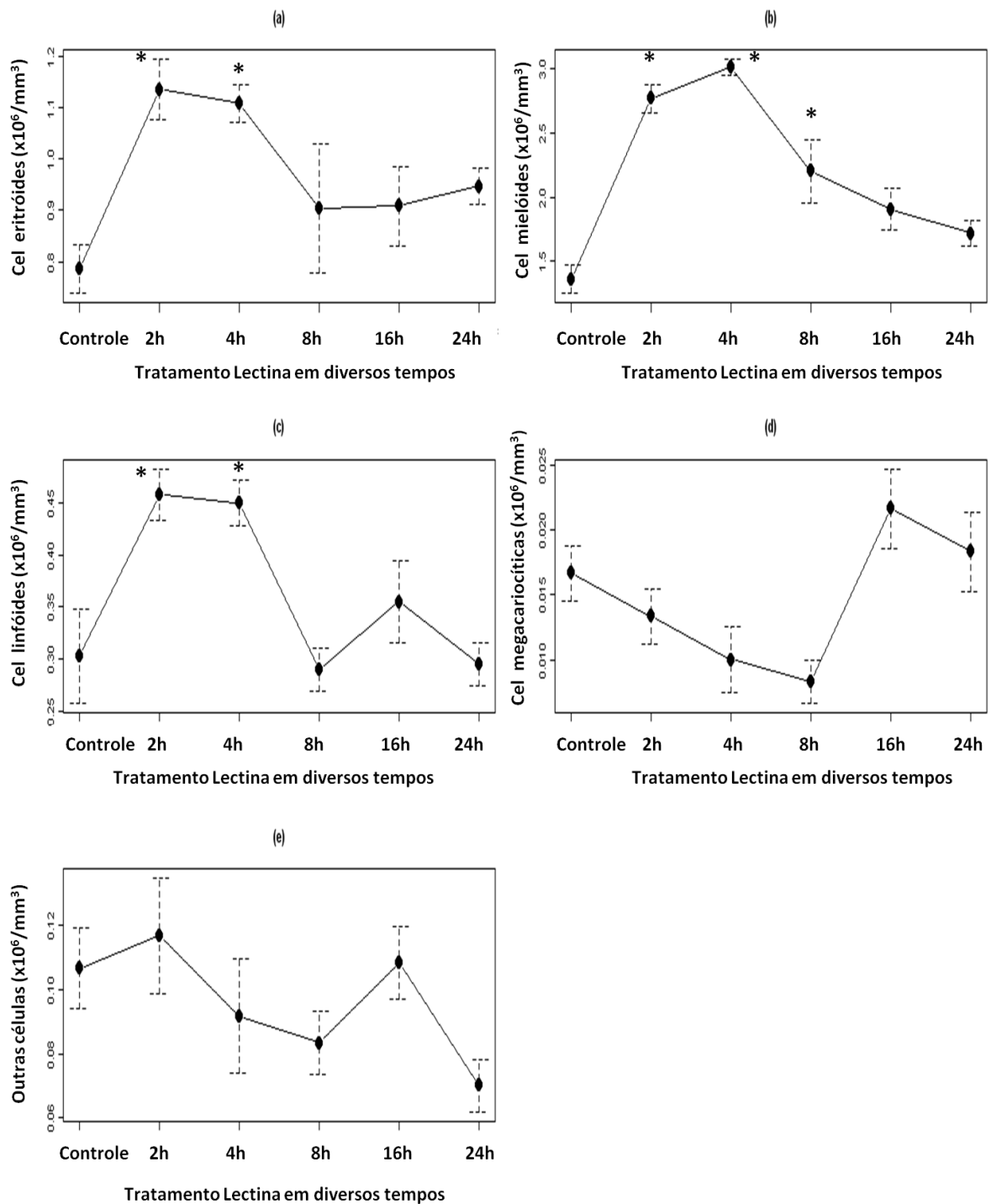


Figura 25 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos Swiss tratados com lectina C (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

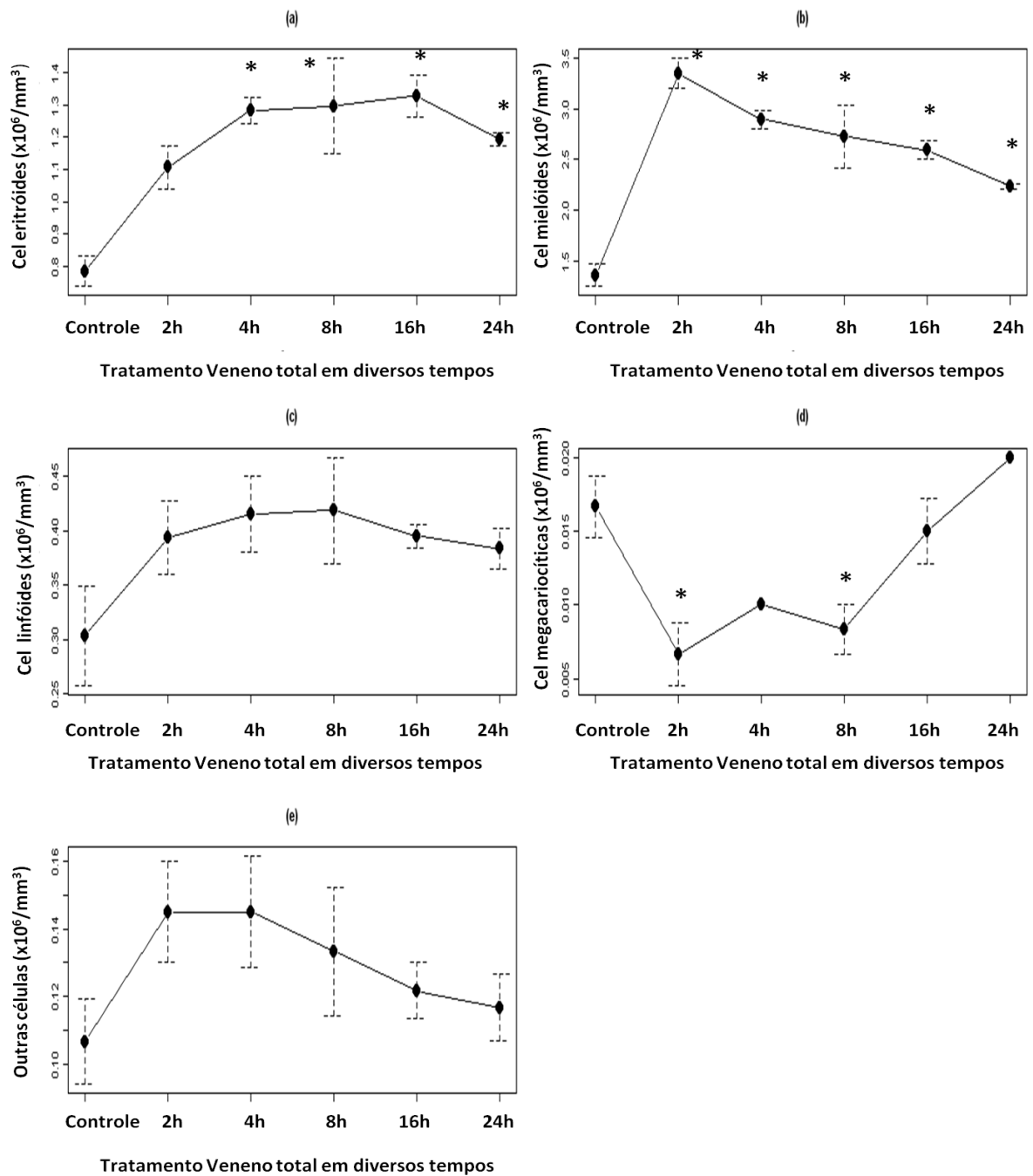


Figura 26 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

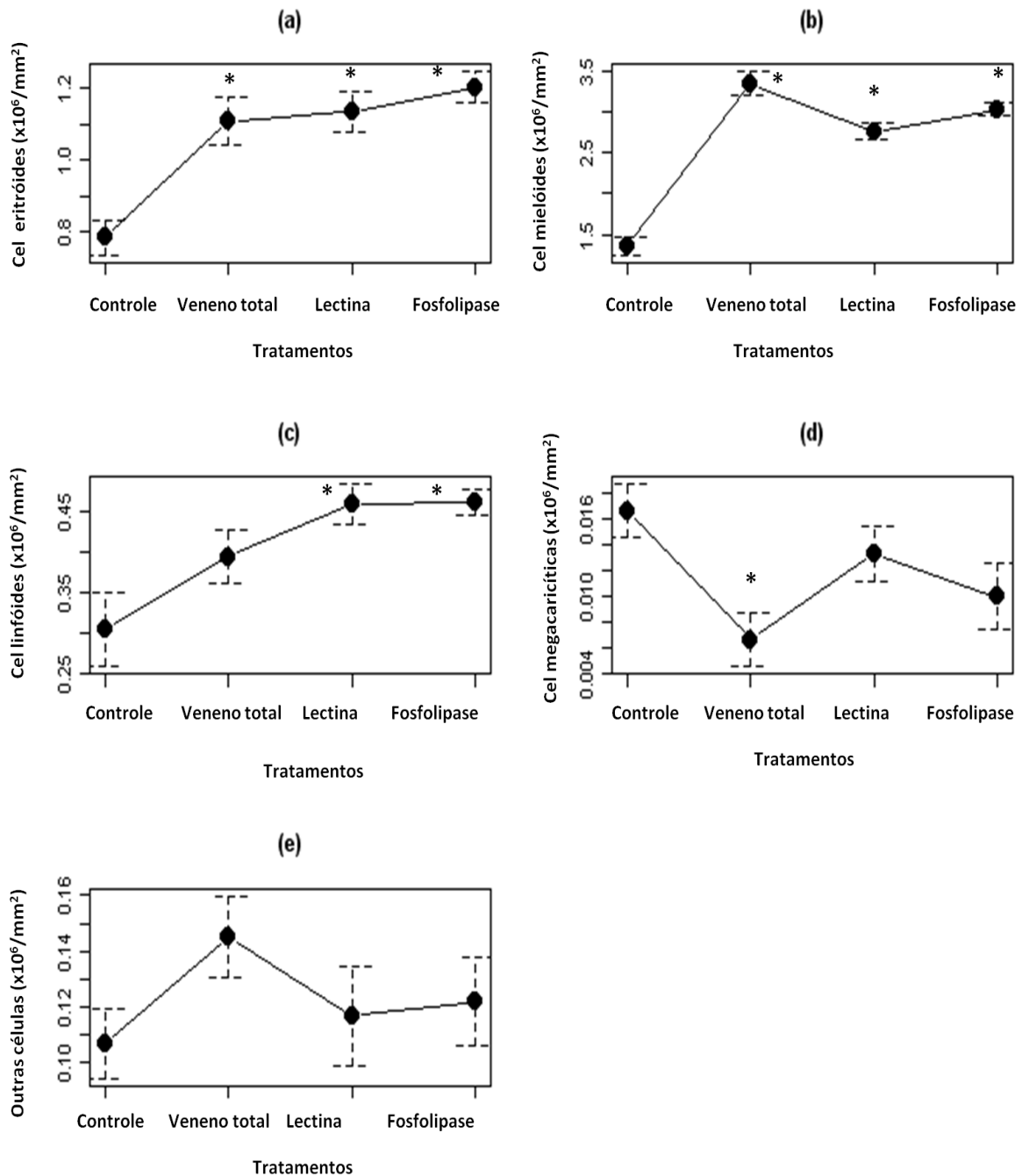


Figura 27 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos Swiss tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. newiedi* no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

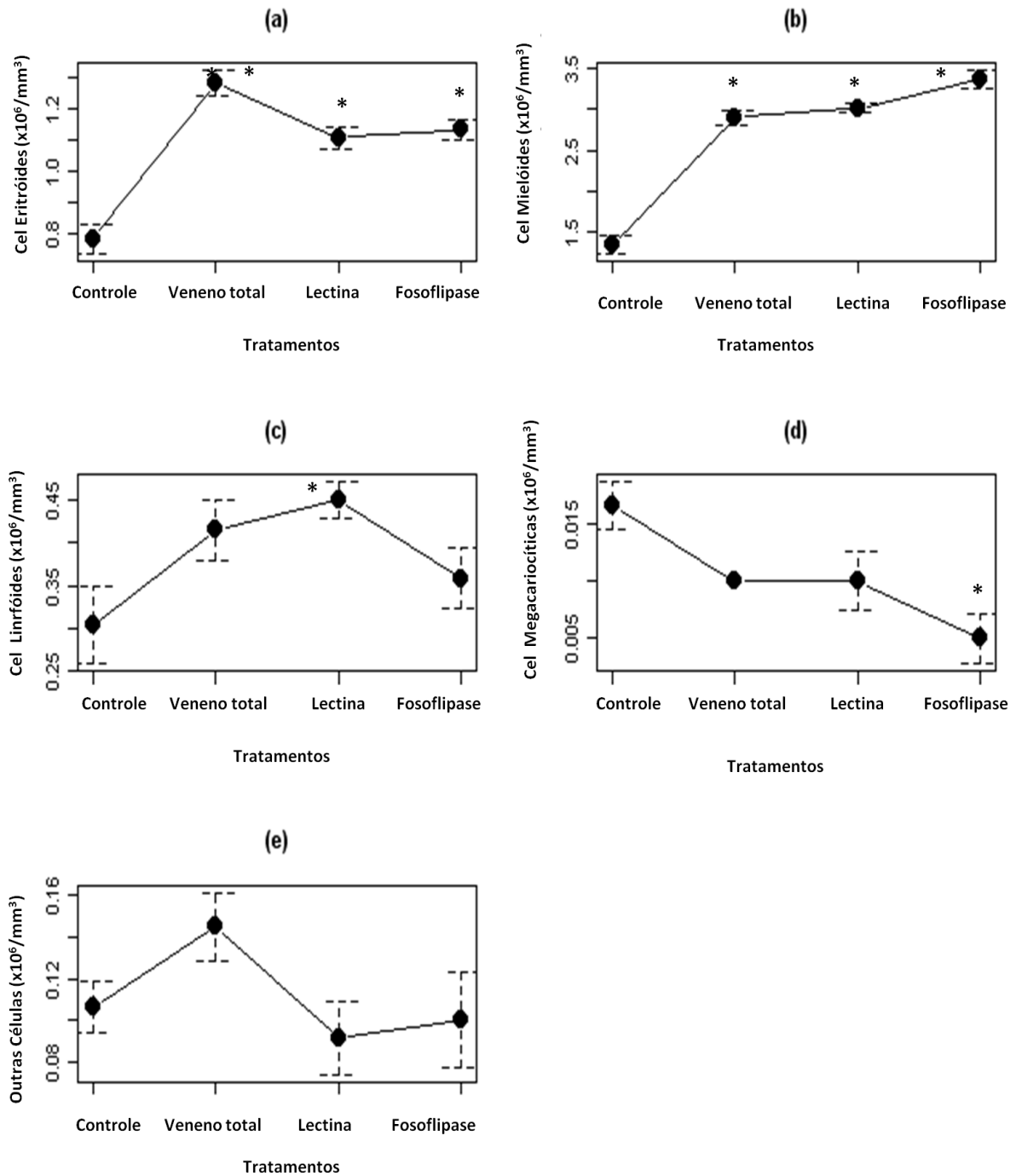


Figura 28 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. newiedi* no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

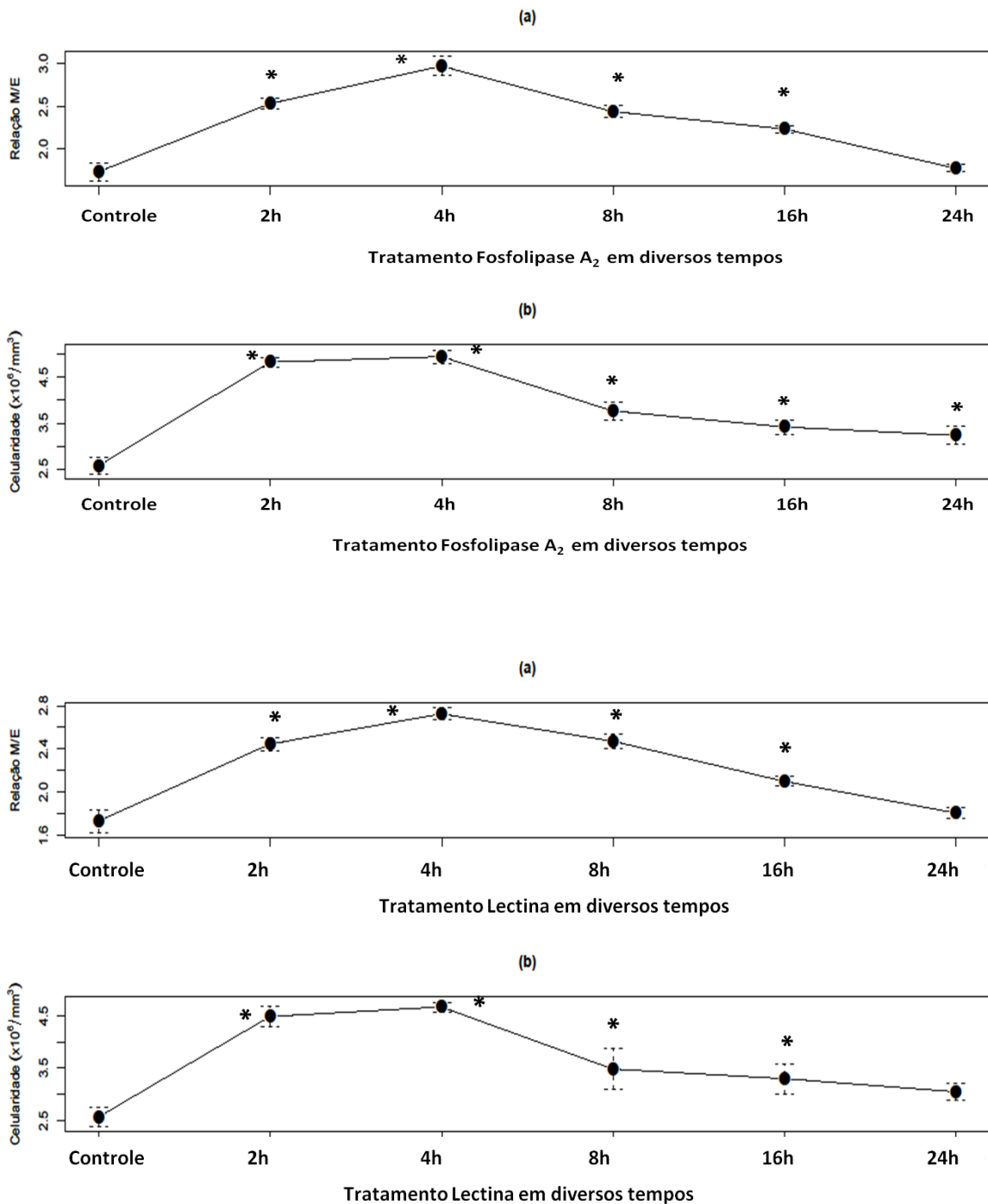


Figura 29 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos *Swiss* tratados com fosfolipase A₂ e lectina C (doses 4,68 e 4,0 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

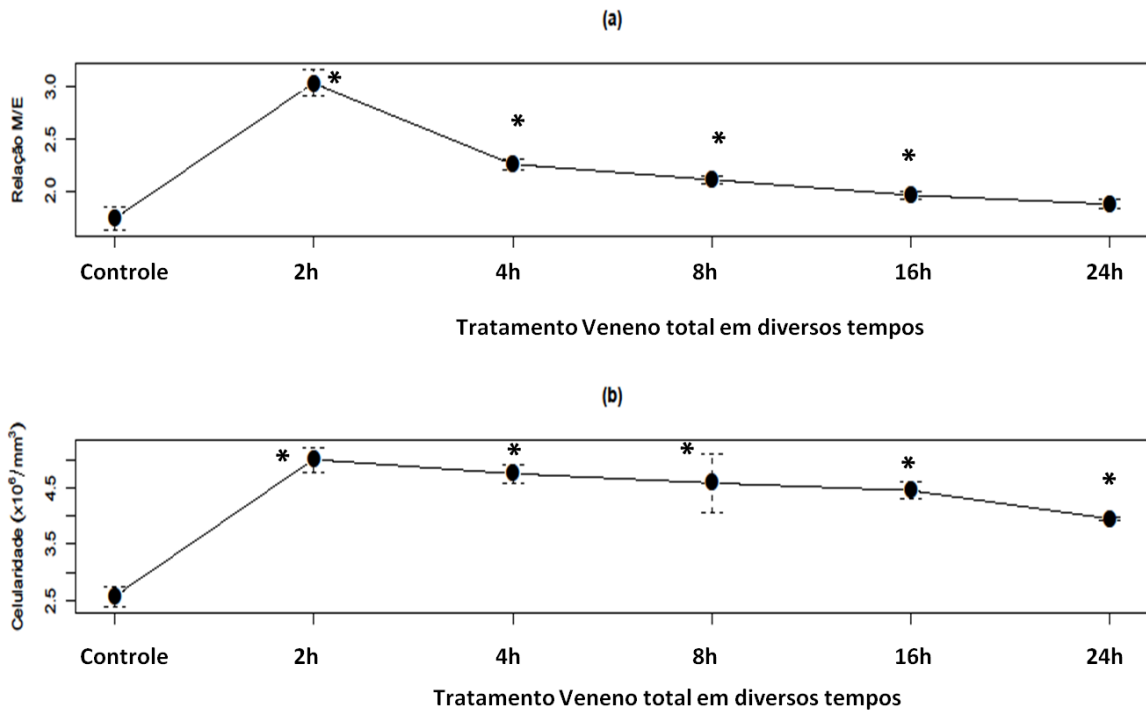


Figura 30 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparado com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

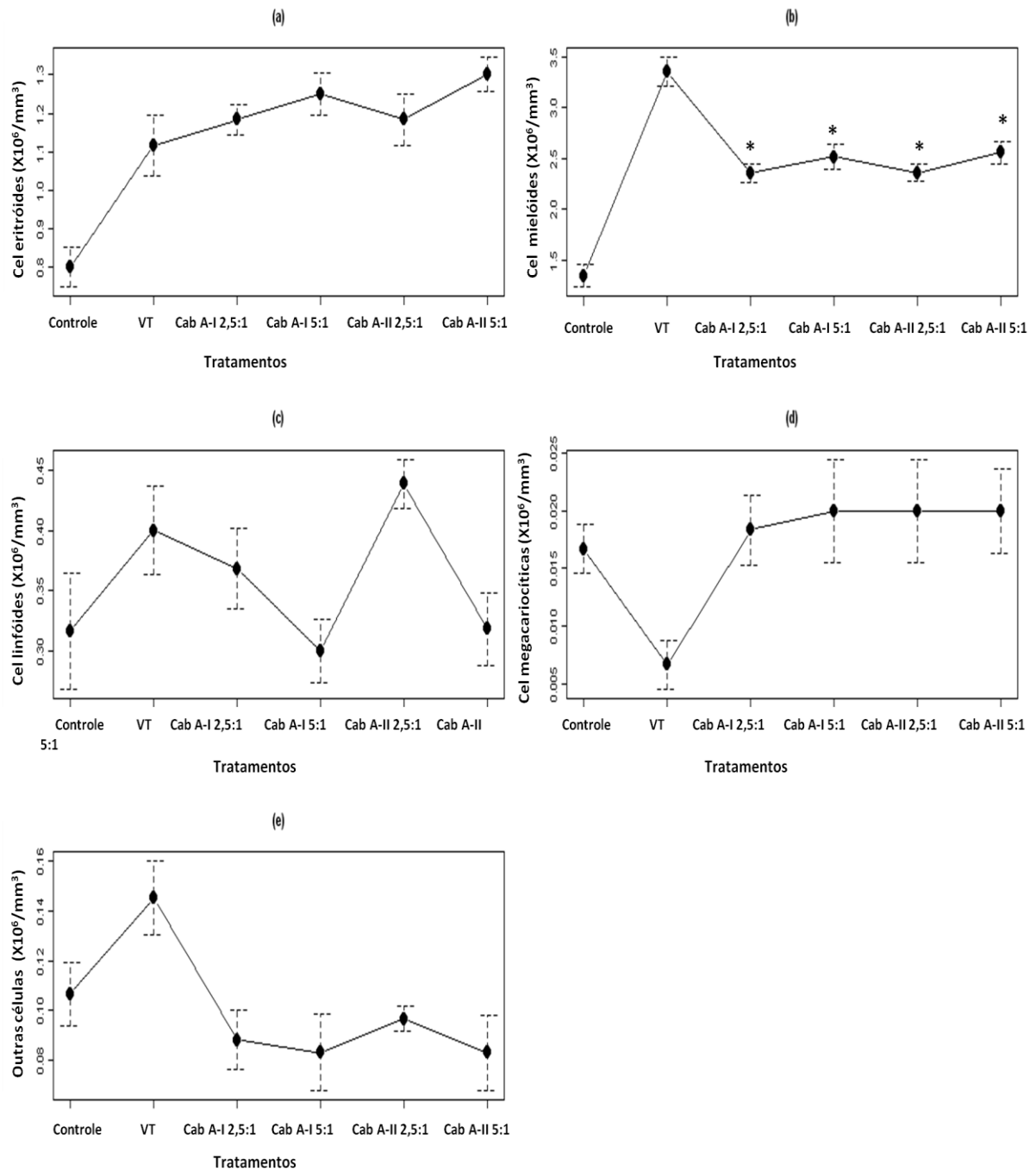


Figura 31 – Estudo das células hematológicas, através do mielograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total da serpente *B. neuwiedi*, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

As Figuras 24, 25 e 26 mostram os resultados dos testes de comparação referente às médias dos números de células eritróides, células mielóides, células linfóides, megacariócitos, outras células, celularidade e relação M/E da medula óssea de camundongos *Swiss*.

Com o uso de fosfolipase A₂, as alterações na medula óssea que mostraram significância estatística foram: o aumento do número de células eritróides (duas e quatro horas), aumento do número de células mielóides (duas, quatro, oito e dezesseis horas), aumento do número de células linfóides (duas horas) e diminuição de megacariócitos (quatro horas) após o envenenamento (Figura 24).

Com o uso de lectina C, as alterações que foram estatisticamente significantes foram: o aumento do número de células eritróides (duas e quatro horas), aumento do número de células mielóides (duas, quatro e oito horas) e aumento do número de células linfóides duas e quatro horas após o envenenamento (Figura 25).

Com o uso de veneno total, as alterações que apresentaram significância estatística foram: o aumento do número de células eritróides (quatro, oito, dezesseis e vinte e quatro horas), aumento do número de células mielóides (duas, quatro, oito, dezesseis e vinte e quatro horas) e diminuição de megacariócitos (duas e oito horas). Entre o veneno total e as duas frações, o veneno total teve ação mais persistente, pois o aumento das células eritróides e mielóides persistiu até 24 horas (Figura 26).

Foram feitos testes de comparação apenas nos tempos duas e quatro horas, que foram os momentos que mais ocorreram alterações hematológicas, para ver se foi o veneno total ou as frações que apresentaram ação mais intensa. Houve um aumento no número médio de células eritróides, entretanto, alterações foram estatisticamente iguais para o veneno total e frações, na série mielóide, a alteração no número de células foi maior quando se usou o veneno total e na série linfóide quando se usou fosfolipase A₂. Para as células megacariocíticas, somente o veneno total provocou alterações no número de células após 2 horas (Figura 27).

No momento 4 horas ocorreu um aumento no número médio de células eritróides, quando se fez uso do veneno total e frações do veneno, comparado ao grupo controle, entretanto as alterações foram estatisticamente maiores quando foi utilizado apenas o veneno total (Figura 28).

Houve um aumento no número médio de células mielóides, quando se fez uso do veneno e frações no tempo de 4 horas, comparado ao grupo controle. A maior alteração foi obtida com o uso da fosfolipase A₂. Para as células linfóides, somente a lectina C provocou aumento significativo no número de células após 4 horas, comparativamente ao grupo controle. Para as células megacariocíticas, somente a fosfolipase A₂ total provocou alterações

no número de células após 4 horas, comparativamente ao grupo controle. Em especial, houve uma diminuição no número médio de células (Figura 28).

Houve aumento da celularidade e relação M/E até dezesseis e vinte e quatro horas, respectivamente, após o envenenamento com veneno total e fosfolipase A₂ (Figuras 29 e 30).

Ocorreu aumento da celularidade e relação M/E até dezesseis horas após o envenenamento com a fração lectina C (Figura 29).

Com relação ao tratamento dos camundongos com as cabenegrinas, observamos que as cabenegrinas A-I e A-II, em todas as diluições, provocaram diminuição significativa no número médio das células mielóides comparativamente ao uso de veneno total (Figura 31).

4.4 Resultados do esplenograma dos camundongos *Swiss* tratados com fosfolipase A₂, lectina C e veneno total da serpente *B. neuwiedi* em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II.

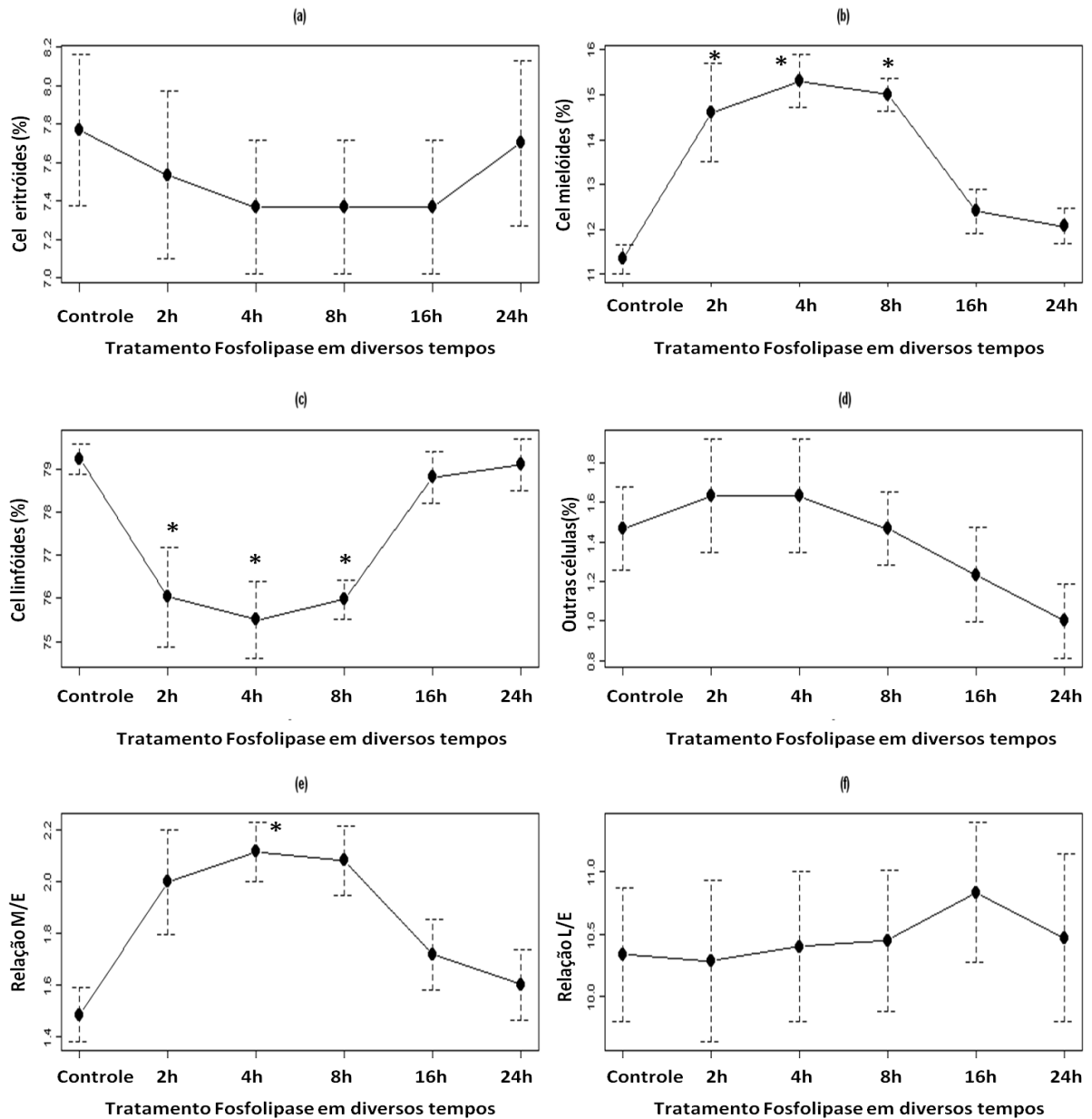


Figura 32 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos *Swiss* tratados com fosfolipase A₂ (dose 4,68 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

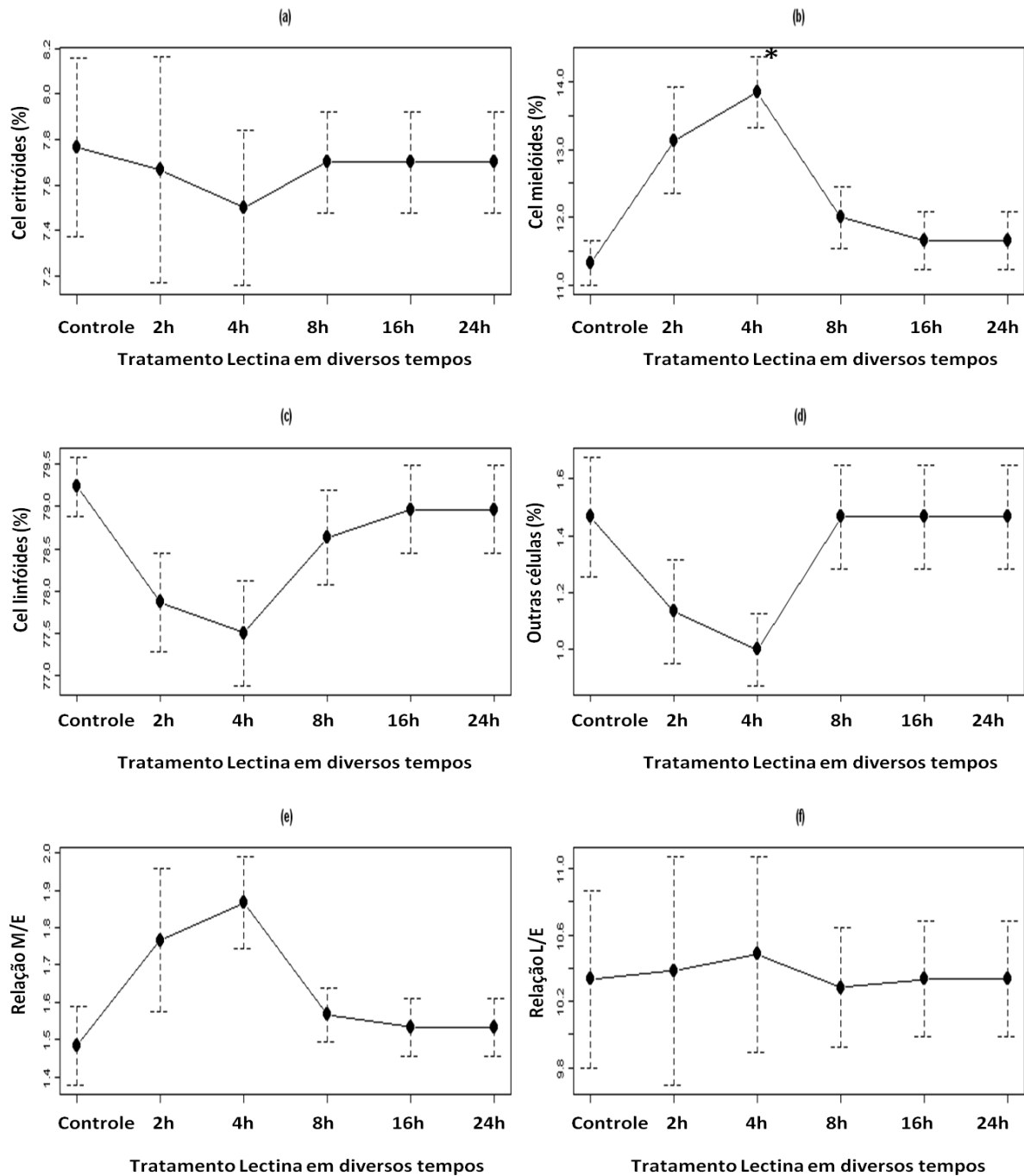


Figura 33 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos Swiss tratados com lectina C (dose 4,0 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. neuwiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

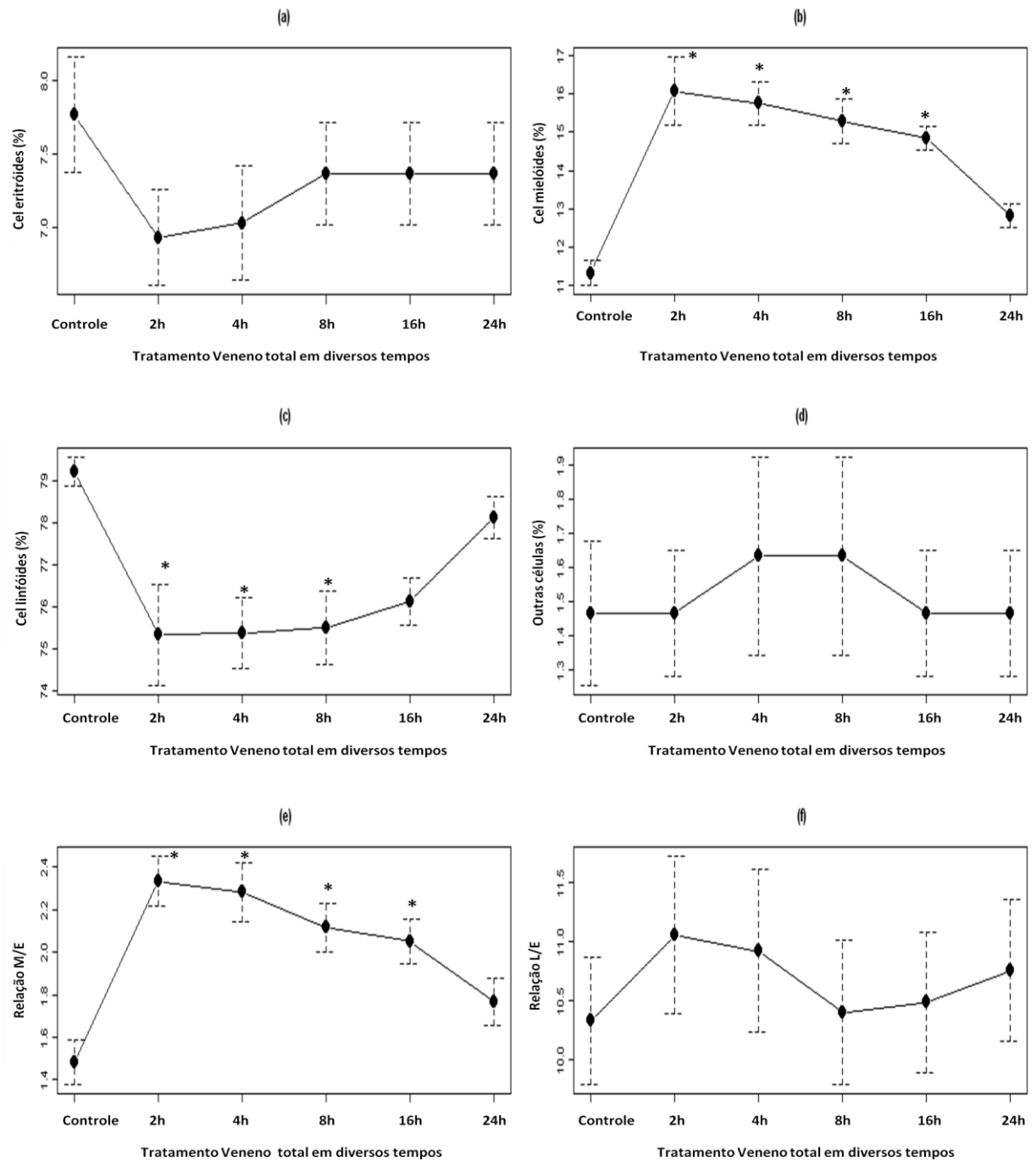


Figura 34 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total (dose 0,996 mg/Kg, i.p.) da serpente *B. newiedi* nos tempos 2, 4, 8, 16 e 24 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média \pm E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

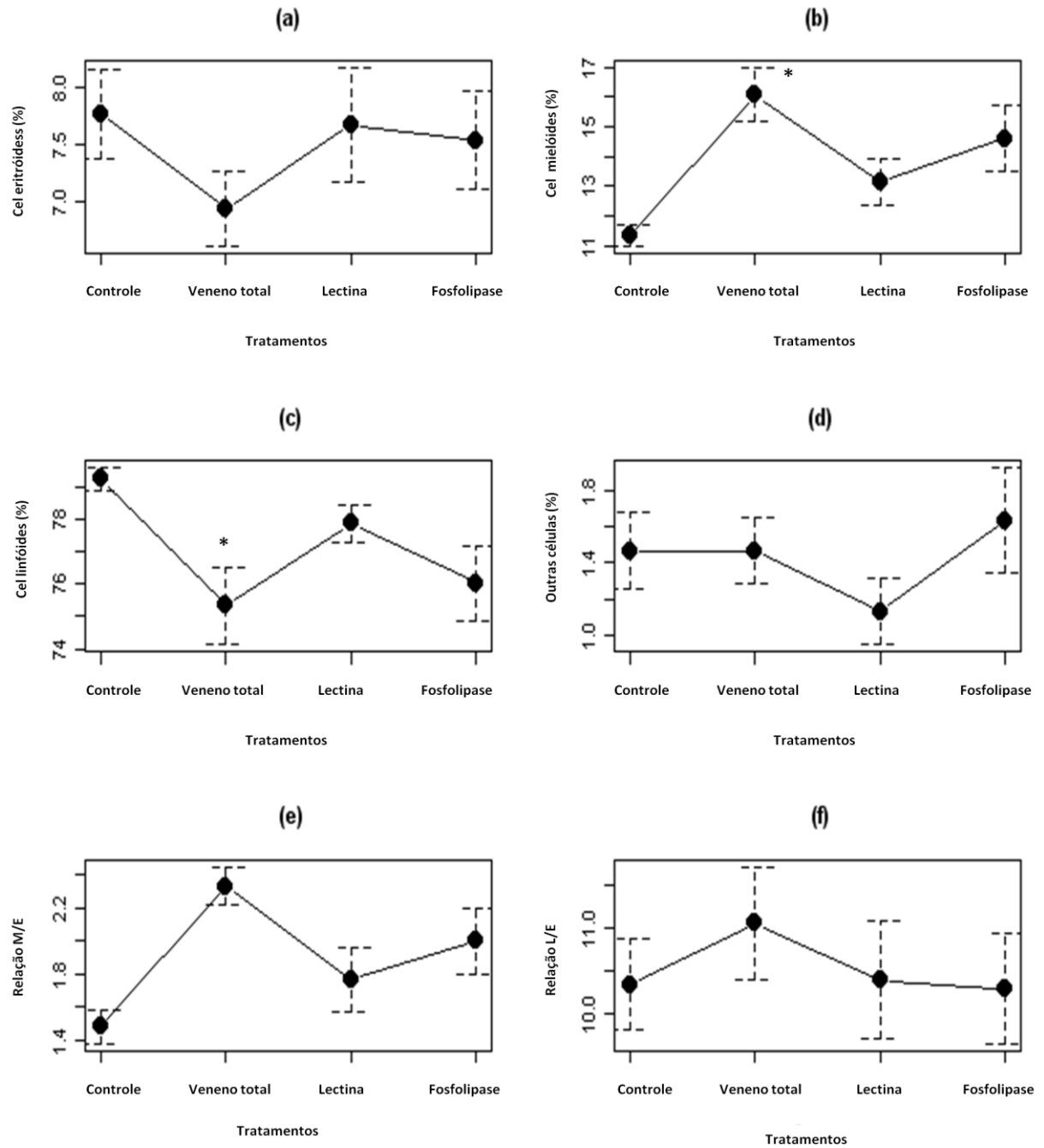


Figura 35 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. neuwiedi* no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle. Os dados foram expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

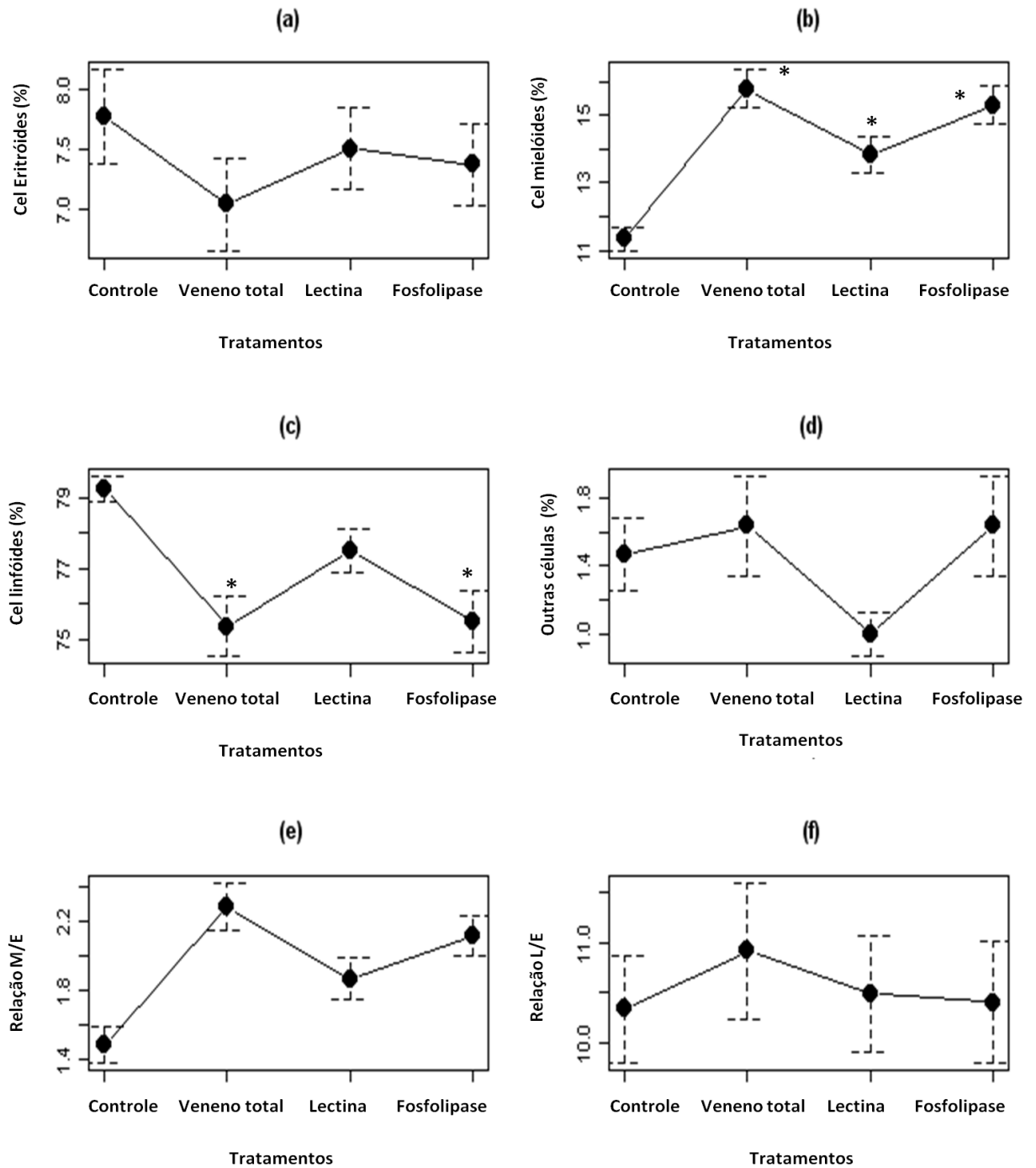


Figura 36 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ (doses 0,996, 4,0 e 4,68 mg/Kg, i.p., respectivamente) da serpente *B. neuwiedi* no tempo 4 horas, comparados com o grupo controle. Os dados foram expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando p<0,05. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

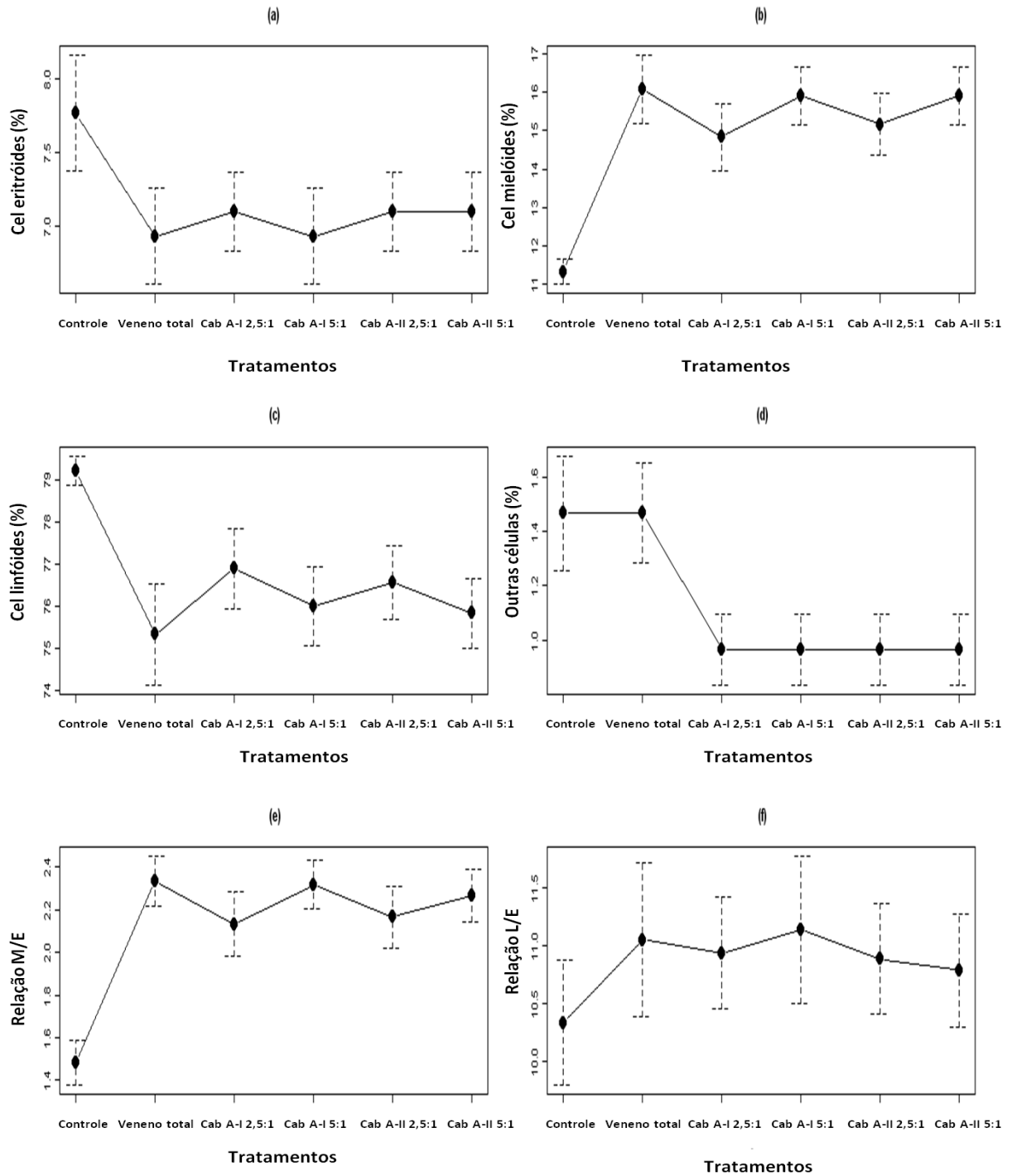


Figura 37 – Estudo das células hematológicas, através do esplenograma, de camundongos *Swiss* tratados com veneno total da serpente *B. neuwiedi*, cabenegrina A-I com tween (Cab A-I e T) e cabenegrina A-II com tween (Cab A-II e T) no tempo 2 horas, comparados com o grupo controle.

Os dados foram expressos em média ± E.P.M., agrupados em relação ao tempo da coleta. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA seguida pelo teste não-paramétrico exato de Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$. * = diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle.

As Figuras 32, 33 e 34 mostram os resultados dos testes de comparação referente às médias do número percentual de células eritróides, células mielóides, células linfóides, outras células, relação M/E e relação L/E do baço de camundongos *Swiss*.

No baço, houve um acréscimo do percentual das células mielóides e um decréscimo no percentual de células linfóides até 8 horas quando se fez uso de fosfolipase A₂. Houve um aumento na relação M/E, após 4 horas de envenenamento por fosfolipase A₂ comparado ao grupo controle (Figura 32).

A única alteração significativa, com o uso de lectina C, comparativamente ao grupo controle, ocorreu após 4 horas do envenenamento; aumento no percentual de células mielóides (Figura 33).

Com o uso de veneno total, ocorreu um acréscimo no percentual de células mielóides e na relação M/E nos tempos 2, 4, 8 e 16 horas após o envenenamento. Entretanto houve um decréscimo no percentual de células linfóides nos tempos 2, 4 e 8 horas, comparado ao grupo controle (Figura 34).

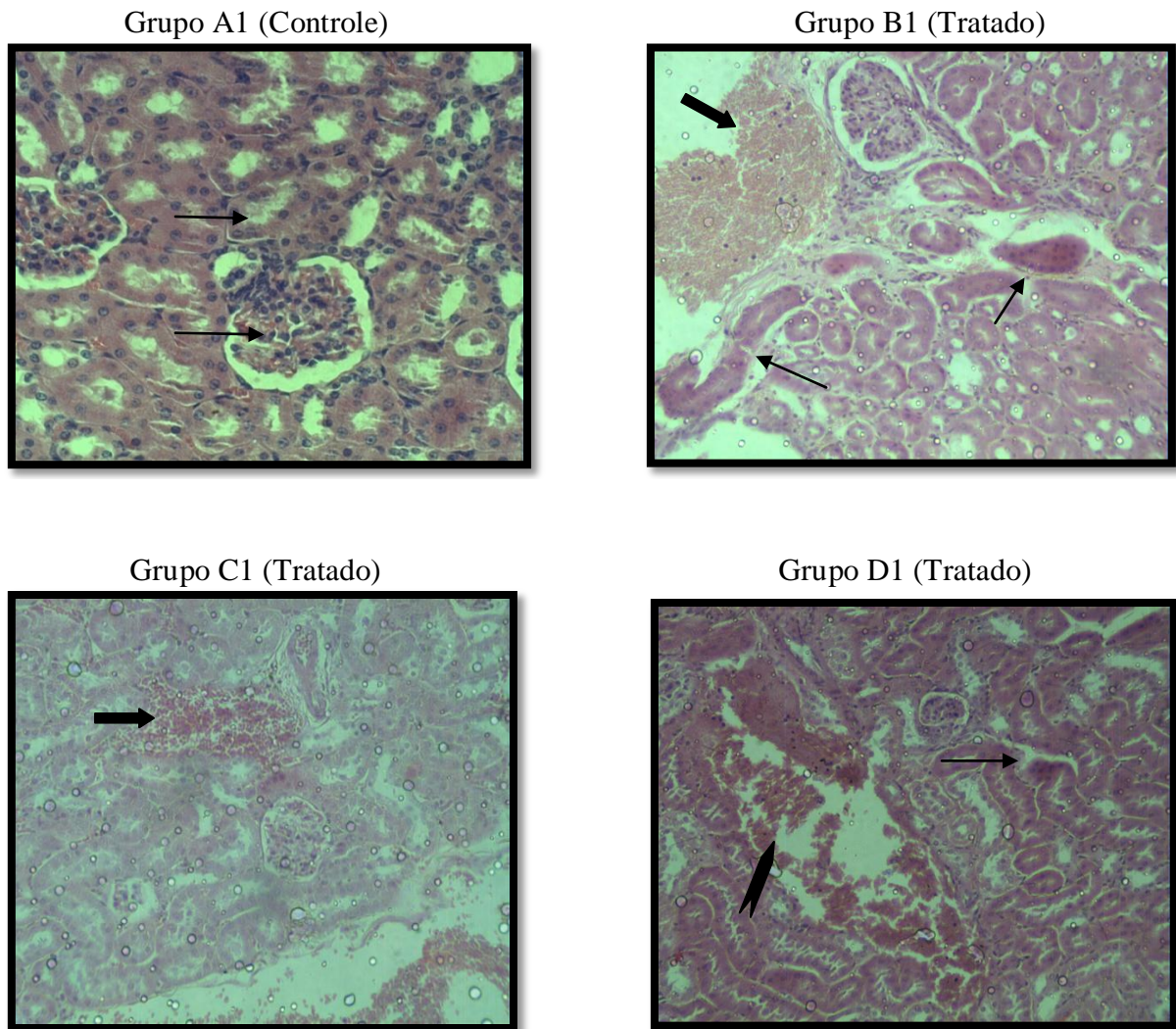
Com relação ao número percentual do número de megacariócitos, estes não foram analisadas devido à falta de variabilidade entre os tempos. Isto quer dizer, que a administração de veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ nos camundongos não provocou variação no número percentual de megacariocíticas presentes no baço, em nenhum tempo analisado (dados não mostrados).

Analisando o veneno total, lectina C e fosfolipase A₂ às duas horas, observamos que o veneno total teve maior ação sobre as células mielóides (aumentando-as) e células linfóides (diminuindo-as) do que as frações fosfolipase A₂ e lectina C (Figura 35).

Às quatro horas, o veneno total, fosfolipase A₂ e lectina C tiveram ações semelhantes sobre as células mielóides. Já com relação ao percentual de células linfóides, observou-se que as alterações provocadas pelo uso do veneno total e fração fosfolipase A₂ foram iguais, quando comparada a fração lectina (Figura 36).

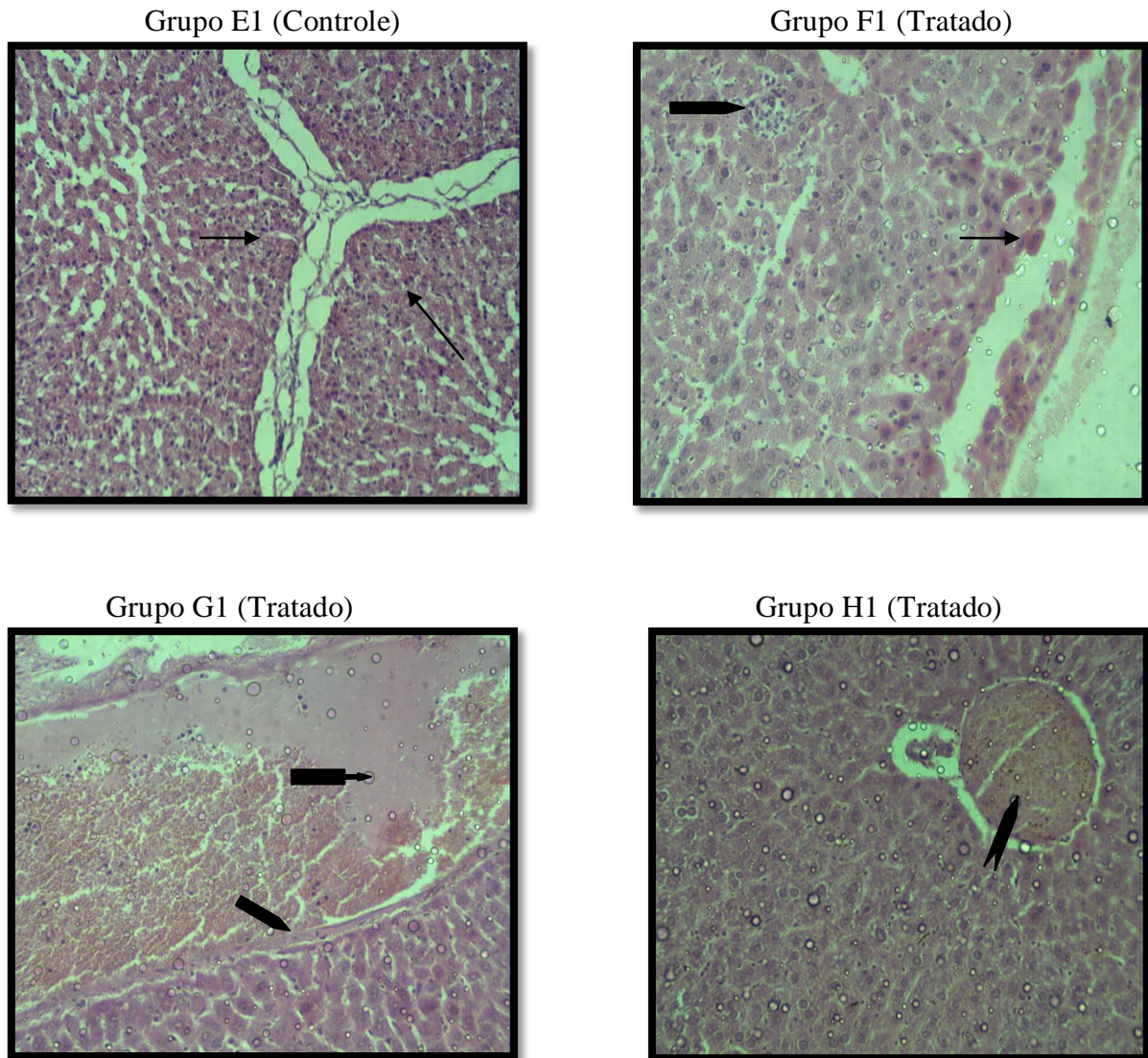
Com relação ao tratamento dos camundongos com as cabenegrinas A-I e A-II, verificamos que as cabenegrinas não reverteram às alterações hematológicas no baço, provocadas pelo veneno total às duas horas (Figura 37).

4.5 Resultados das análises histológicas dos órgãos de camundongos *Swiss* tratados com fosfolipase A₂, lectina C e veneno total da serpente *B. neuwiedi* em diversos tempos e tratamento com as cabenegrinas A-I e A-II.



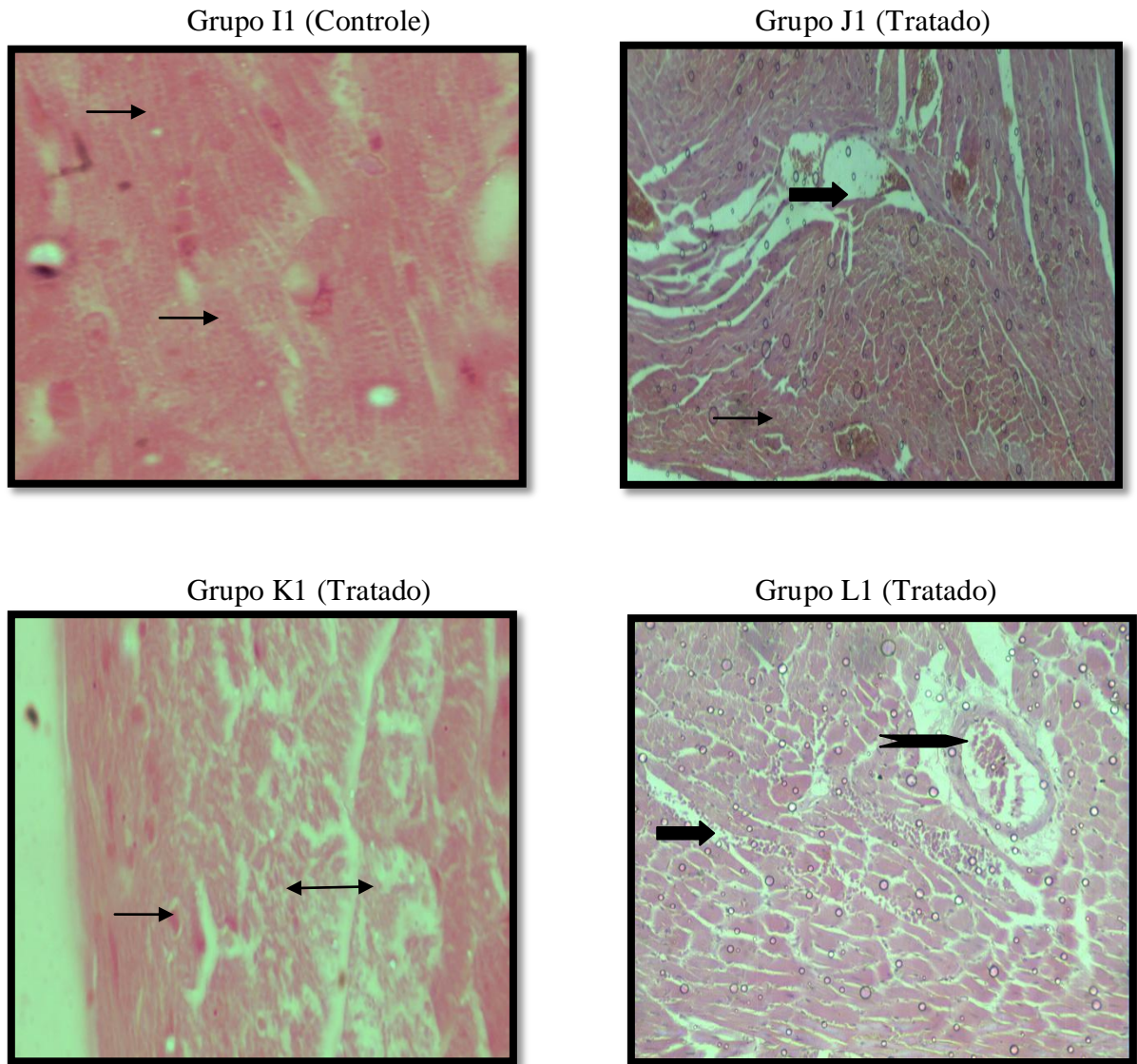
Figuras 38 a 41 - Fotomicrografia de rim de camundongo evidenciando os glomérulos e túbulos renais normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A₂ da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo A1 observou-se glomérulo e túbulos renais normais (setas) (H.E.), (aumento 400X). No grupo B1 tratado com PLA₂, observou-se a presença de hemorragia (**➡**) e degeneração hidrópica dos túbulos renais, com intensa eosinofilia citoplasmática e presença de núcleos picnóticos (**→**) (H.E.), (aumento 200X). No grupo C1 tratado com PLA₂, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de hemorragia intersticial (**➡**) (H.E.), (aumento 200X). No grupo D1 tratado com PLA₂, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, vaso congestionado (**➡**) e a presença de degeneração hidrópica dos túbulos renais (**→**) (H.E.), (aumento 400X).



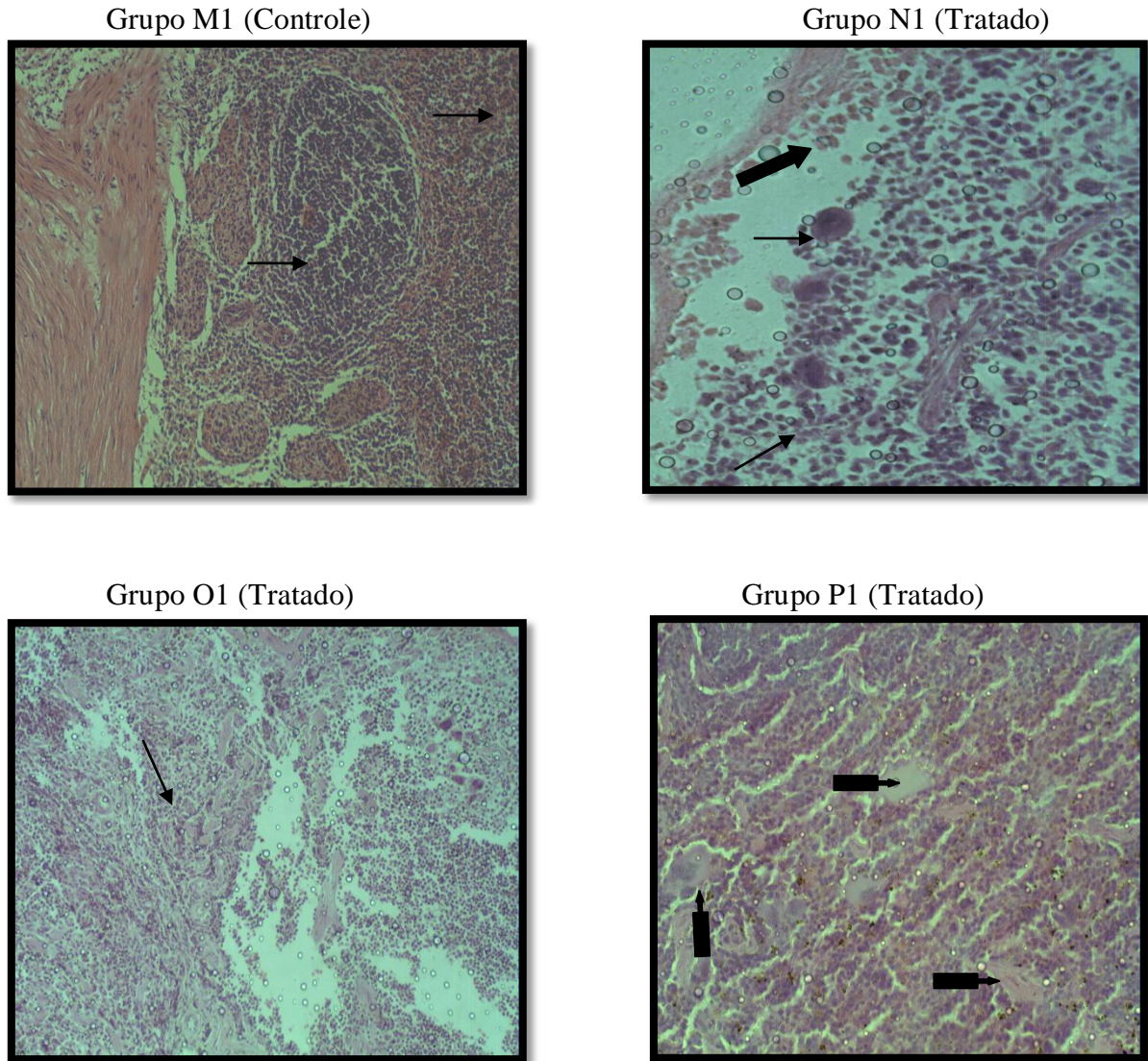
Figuras 42 a 45 - Fotomicrografia de fígado de camundongo evidenciando os hepatócitos normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A₂ da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo E1 observou-se hepatócitos normais (setas) (H.E.), (aumento 200X). No grupo F1 tratado com PLA₂, observou-se a presença de infiltrado inflamatório (**▬→**) e degeneração hidrópica dos hepatócitos, com eosinofilia citoplasmática (**→**) (H.E.), (aumento 400X). No grupo G1 tratado com PLA₂, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de hemorragia e células inflamatórias mononucleares (**▬→**) e edema (**▬→**). No grupo H1 tratado com PLA₂, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, congestão de vaso (**▬→**) (H.E.), (aumento 200X).



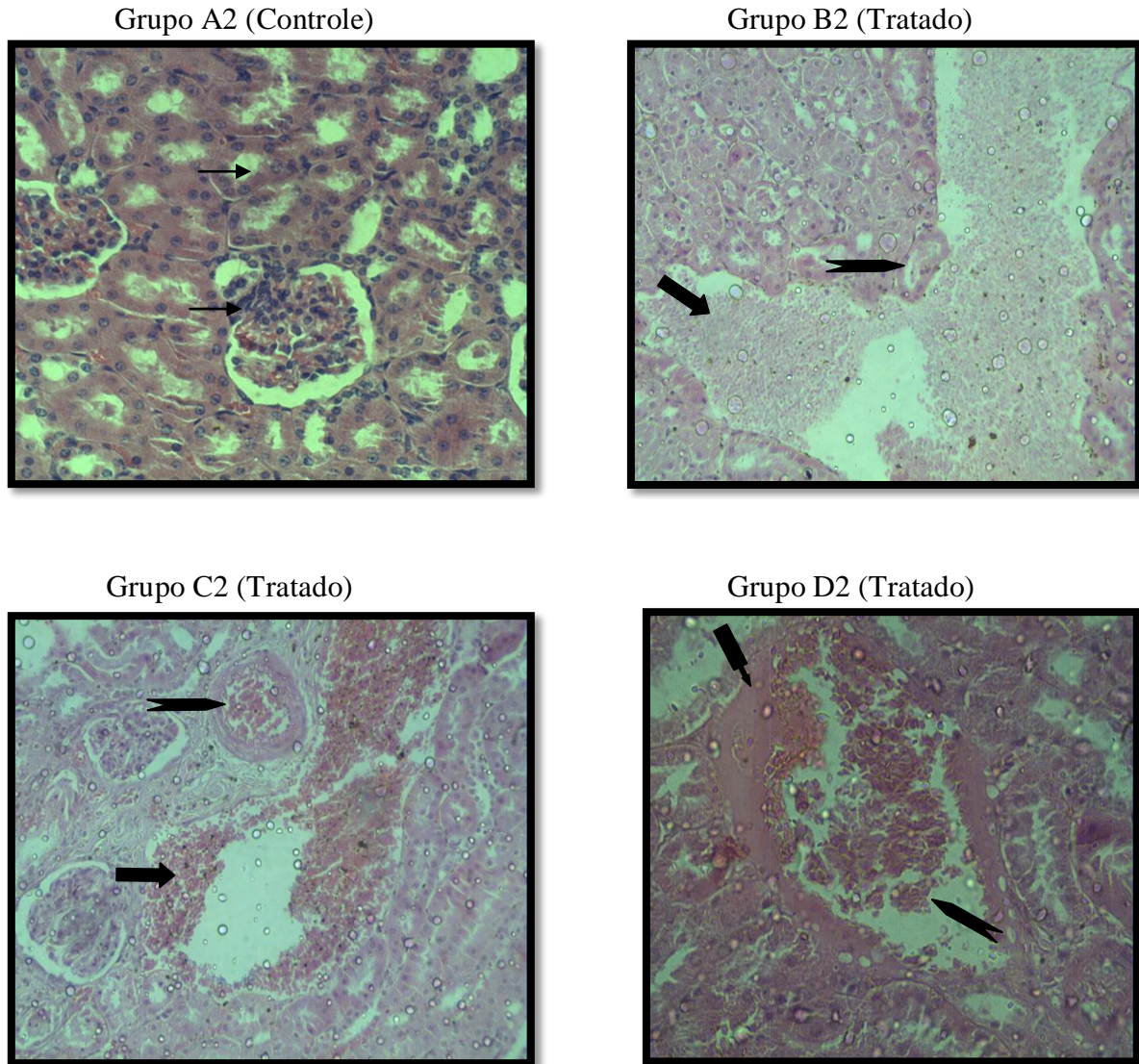
Figuras 46 a 49 - Fotomicrografia de coração de camundongo evidenciando as fibras cardíacas normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A₂ da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo I1 observou-se fibras cardíacas normais (setas) (H.E.), (aumento 1000X). No grupo J1 tratado com PLA₂, observou-se a presença de hemorragia no espaço miocárdio (**➡**) e discreta eosinofilia das fibras cardíacas (**→**) (H.E.), (aumento 400X). No grupo K1 tratado com PLA₂, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de discreta eosinofilia nas fibras cardíacas e núcleo picnótico (**→**) e fibras cardíacas rompidas (**↔**) (H.E.), (aumento 1000X). No grupo L1 tratado com PLA₂, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, hemorragia (**➡**) e congestão de vaso (**➡**) (H.E.), (aumento 400X).



Figuras 50 a 53 - Fotomicrografia do baço de camundongo evidenciando as polpas vermelha e branca normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de fosfolipase A₂ da serpente *B. neuwiedi*.

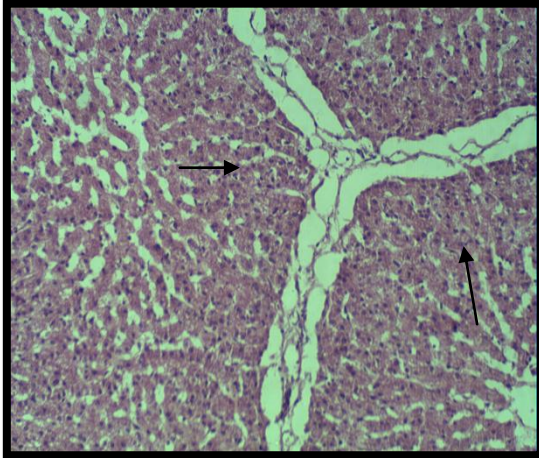
No grupo M1 observou-se a polpa vermelha e a polpa branca normais (setas) (H.E.), (aumento 200X). No grupo N1 tratado com PLA₂, observou-se a presença de macrófagos (—→) e presença de hemorragia subcapsular (—→) (H.E.), (aumento 400X). No grupo O1 tratado com PLA₂, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de hiperplasia da polpa vermelha (—→) (H.E.), (aumento 200X). No grupo P1 tratado com PLA₂, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, edema (—→) (H.E.), (aumento 400X).



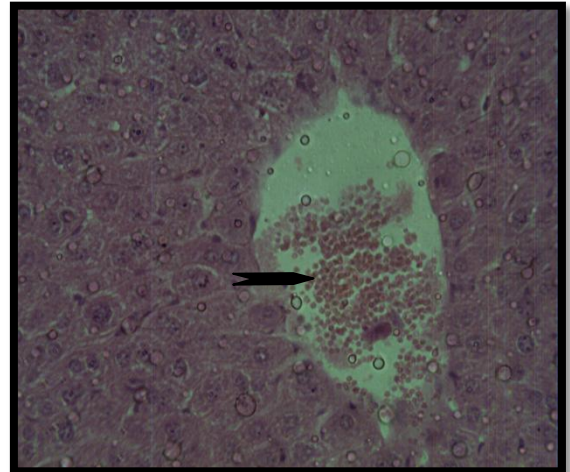
Figuras 54 a 57 - Fotomicrografia de rim de camundongo evidenciando os glomérulos e túbulos renais normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina C da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo A observou-se glomérulo e túbulos renais normais (setas) (H.E.), (aumento 400X). No grupo B tratado com lectina, observou-se a presença de vaso com congestão (➤) e hemorragia intensa (➤) (H.E.), (aumento 200X). No grupo C2 tratado com lectina, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de hemorragia intersticial (➤) e vaso congesto (➤) (H.E.), (aumento 200X). No grupo D2 tratado com lectina, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, vaso congesto (➤) e edema (➤) (H.E.), (aumento 400X).

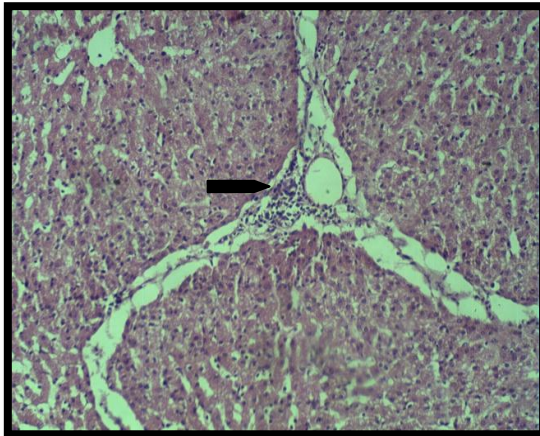
Grupo E2 (Controle)



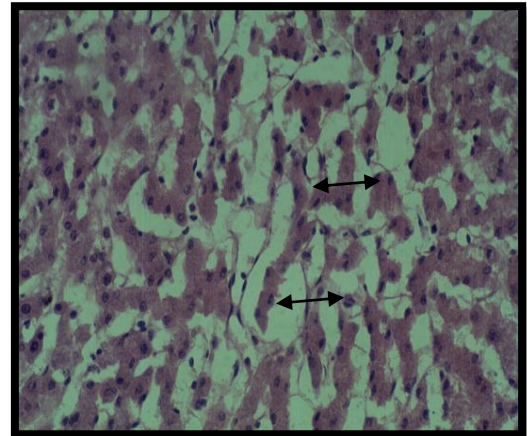
Grupo F2 (Tratado)



Grupo G2 (Tratado)

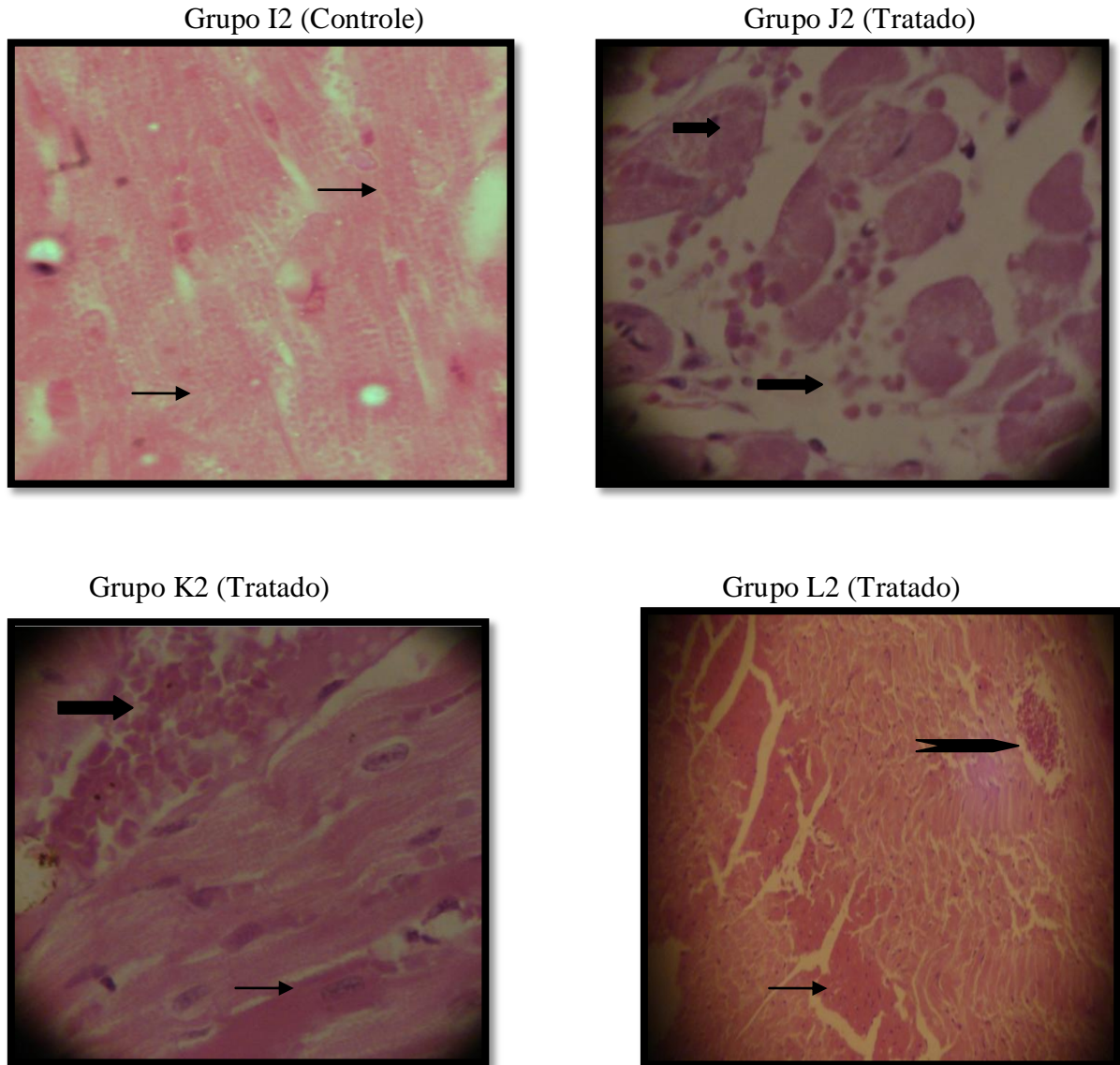


Grupo H2 (Tratado)



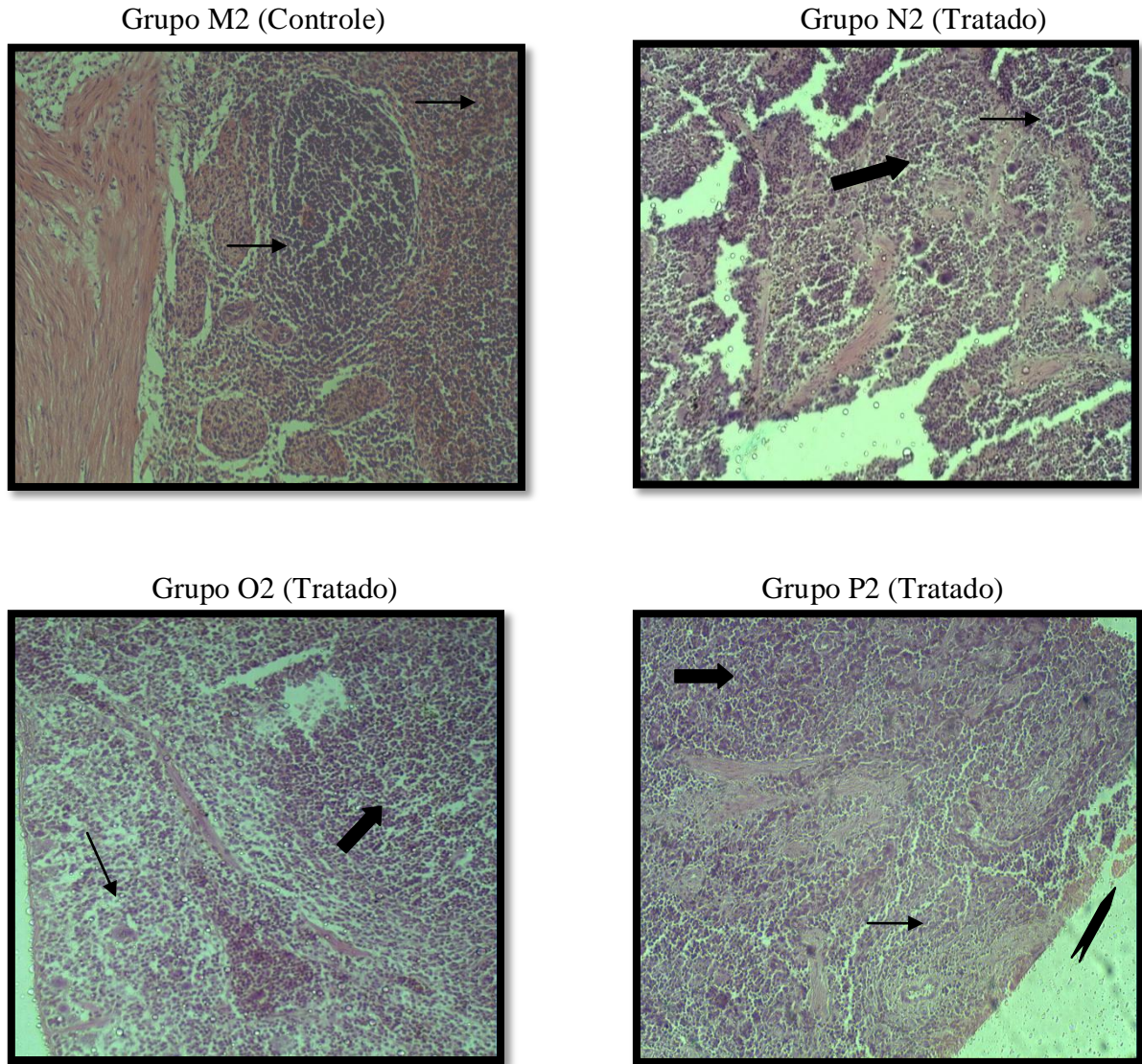
Figuras 58 a 61 - Fotomicrografia de fígado de camundongo evidenciando os hepatócitos normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina C da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo E2 observou-se hepatócitos normais (setas) (H.E.), (aumento 200X). No grupo F2 tratado com lectina, observou-se a presença de vaso congesto (**➤**) (H.E.), (aumento 400X). No grupo G2 tratado com lectina, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de infiltrado de células inflamatórias (**➤**) (H.E.), (aumento 200X). No grupo H2 tratado com lectina, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, degeneração dos hepatócitos e desorganização da arquitetura celular (**↔**) (H.E.), (aumento 400X).



Figuras 62 a 65 - Fotomicrografia de coração de camundongo evidenciando as fibras cardíacas normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina C da serpente *B. neuwiedi*.

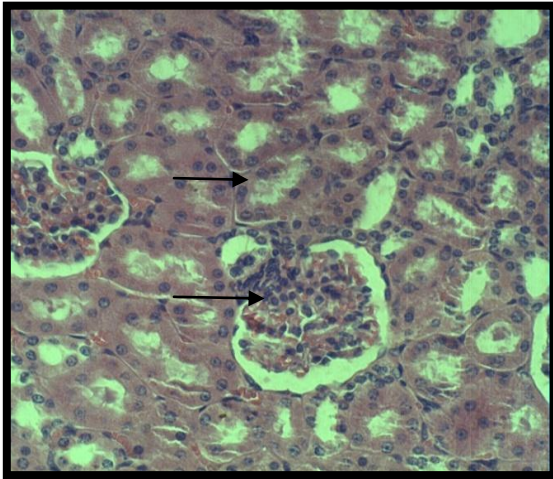
No grupo I2 observou-se fibras cardíacas normais (setas) (H.E.), (aumento 1000X). No grupo J2 tratado com lectina, observou-se a presença de hemorragia intersticial (**➡**) e células com profunda eosinofilia das fibras e com núcleo picnótico (**→**) (H.E.), (aumento 400X). No grupo K2 tratado com lectina, observou-se após quatro horas do envenenamento, degeneração hidrópica das fibras cardíacas, com intensa eosinofilia (**→**) e presença de hemorragia intersticial (**➡**). No grupo L2 tratado com lectina, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, vaso congestionado (**➡**) e degeneração das fibras cardíacas, citoplasma com intensa eosinofilia (**→**) (H.E.), (aumento 400X).



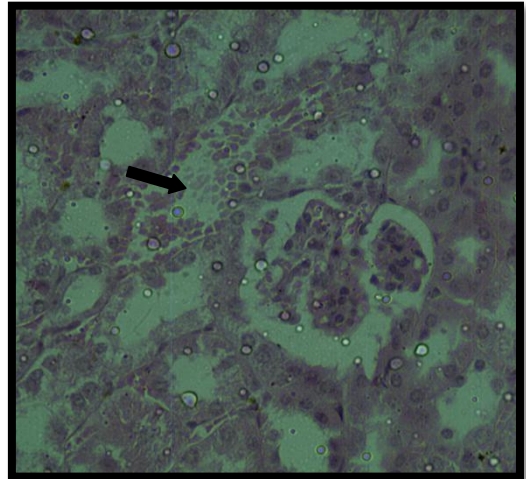
Figuras 66 a 69 - Fotomicrografia do baço de camundongo evidenciando a polpa vermelha e branca normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de lectina C da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo M2 observou-se a polpa vermelha e a polpa branca normais (setas). No grupo N2 tratado com lectina, observou-se a presença de hiperplasia da polpa branca (—→) e hiperplasia da polpa vermelha (—→) (H.E.), (aumento 200X). No grupo O2 tratado com lectina, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de hiperplasia da polpa vermelha (—→) e hiperplasia da polpa branca (—→). No grupo P2 tratado com lectina, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, hemorragia subcapsular (—→) e de hiperplasia da polpa vermelha (—→) e hiperplasia da polpa branca (—→) (H.E.), (aumento 200X).

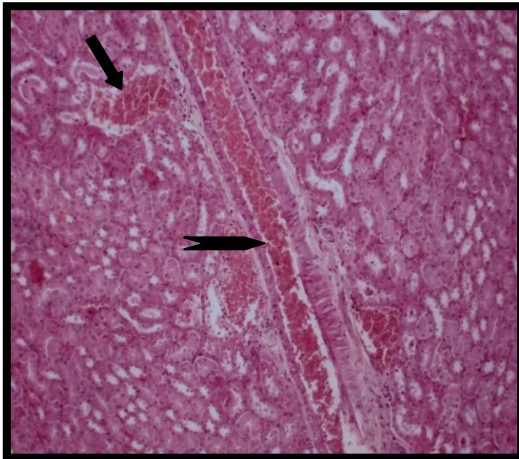
Grupo A3 (Controle)



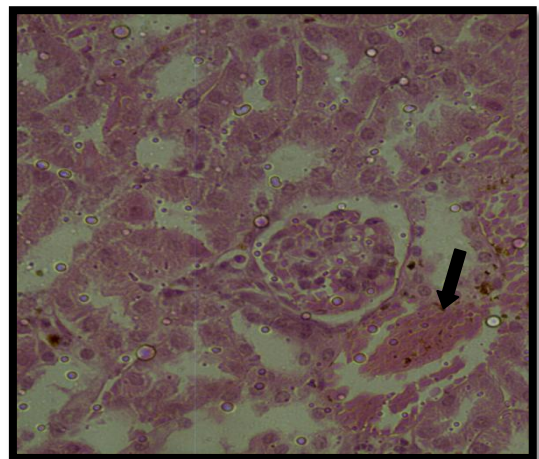
Grupo B3 (Tratado)



Grupo C3 (Tratado)

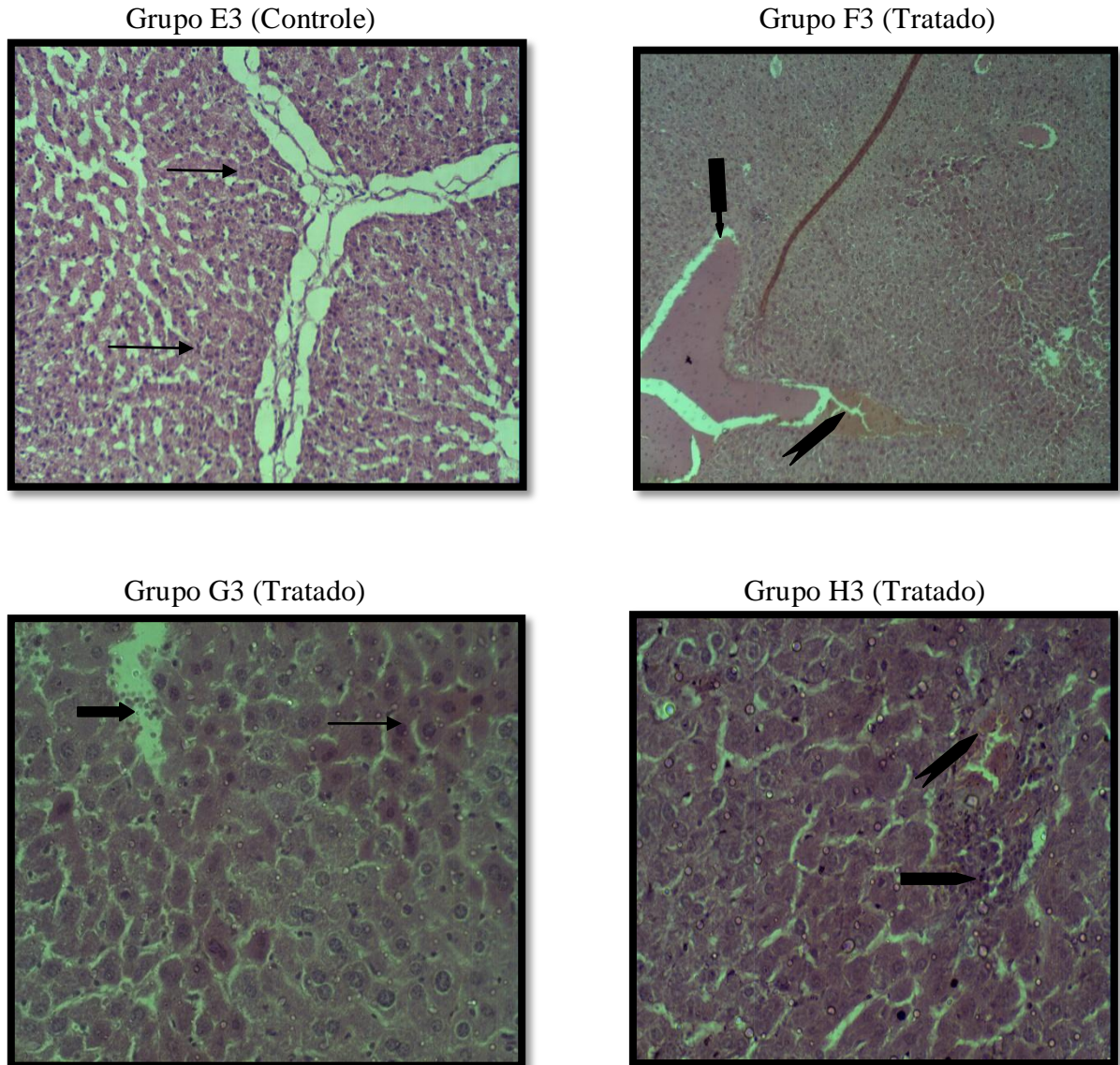


Grupo D3 (Tratado)









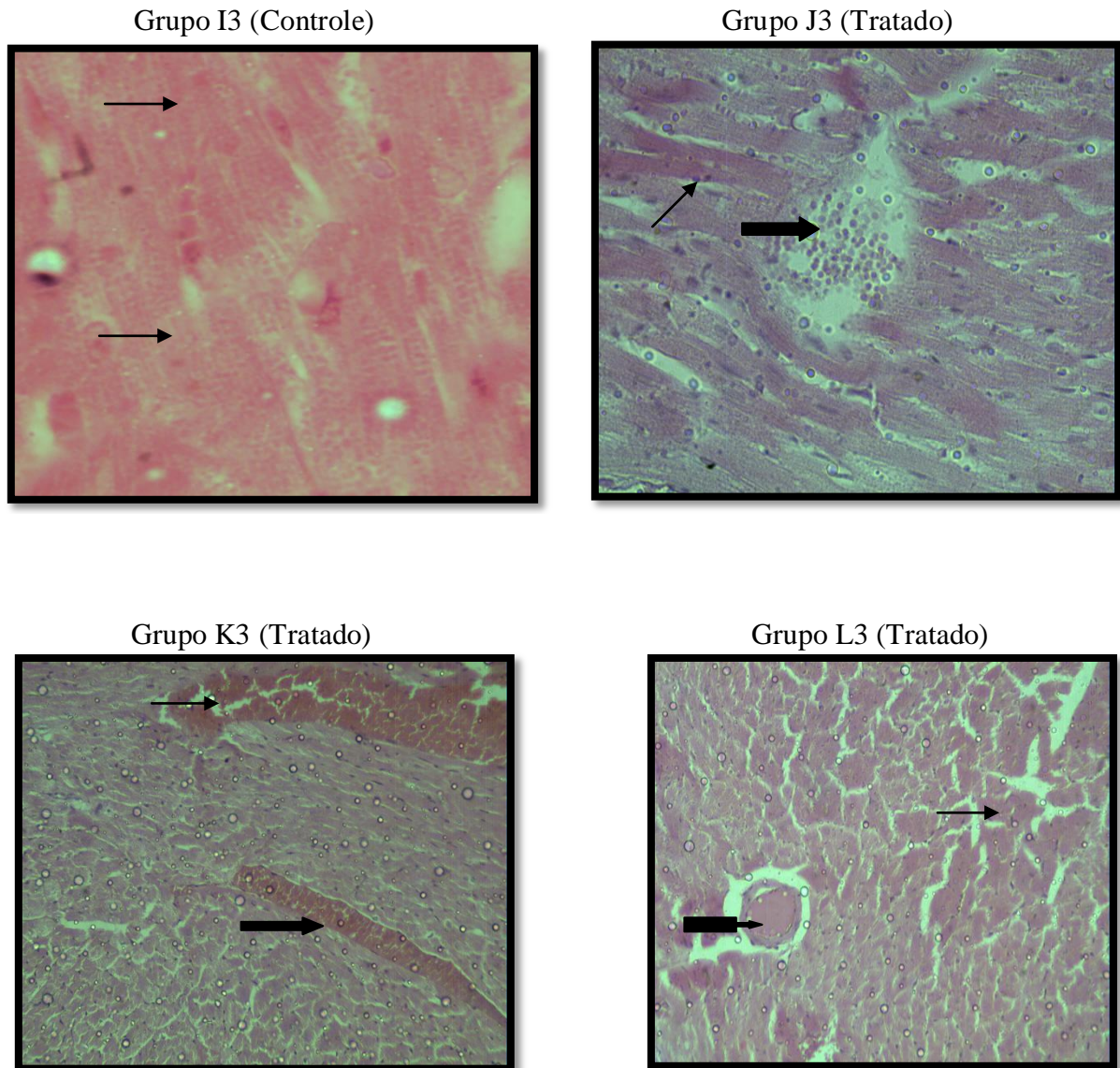
Figuras 70 a 73 - Fotomicrografia de rim de camundongo evidenciando os glomérulos e túbulos renais normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo A3 observou-se glomérulo e túbulos renais normais (setas). No grupo B3 tratado com veneno total, observou-se a presença de hemorragia intersticial (➡) (H.E.), (aumento 400X). No grupo C3 tratado com veneno total, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de hemorragia tubular (➡) e vaso congesto (➡). No grupo D3 tratado com veneno total, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, presença de hemorragia (➡) (H.E.), (aumento 400X).



Figuras 74 a 77 - Fotomicrografia de fígado de camundongo evidenciando os hepatócitos normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo E3 observou-se hepatócitos normais (setas) (H.E.), (aumento 200X). No grupo F3 tratado com veneno total, observou-se a presença de edema () e vaso congesto () (H.E.), (aumento 100X). No grupo G3 tratado com veneno total, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de hemorragia discreta () e degeneração hidrópica dos hepatócitos, com intensa eosinofilia citoplasmática (). No grupo H3 tratado com veneno total, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, presença de congestão vascular () e de infiltrado de células inflamatórias mononucleares () (H.E.), (aumento 400X).



Figuras 78 a 81 - Fotomicrografia de coração de camundongo evidenciando as fibras cardíacas normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo I3 observou-se fibras cardíacas normais (setas) (H.E.), (aumento 1000X). No grupo J3 tratado com veneno total, observou-se a presença de hemorragia (**➡**) e degeneração hidrópica das fibras cardíacas, com intensa eosinofilia citoplasmática e presença de núcleos picnóticos (**➡**) (H.E.), (aumento 400X). No grupo K3 tratado com veneno total, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de intensa hemorragia intersticial (**➡**). No grupo L3 tratado com veneno total, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, edema vascular (**➡**) e fibras cardíacas com intensa acidofilia (**➡**) (H.E.), (aumento 200X).

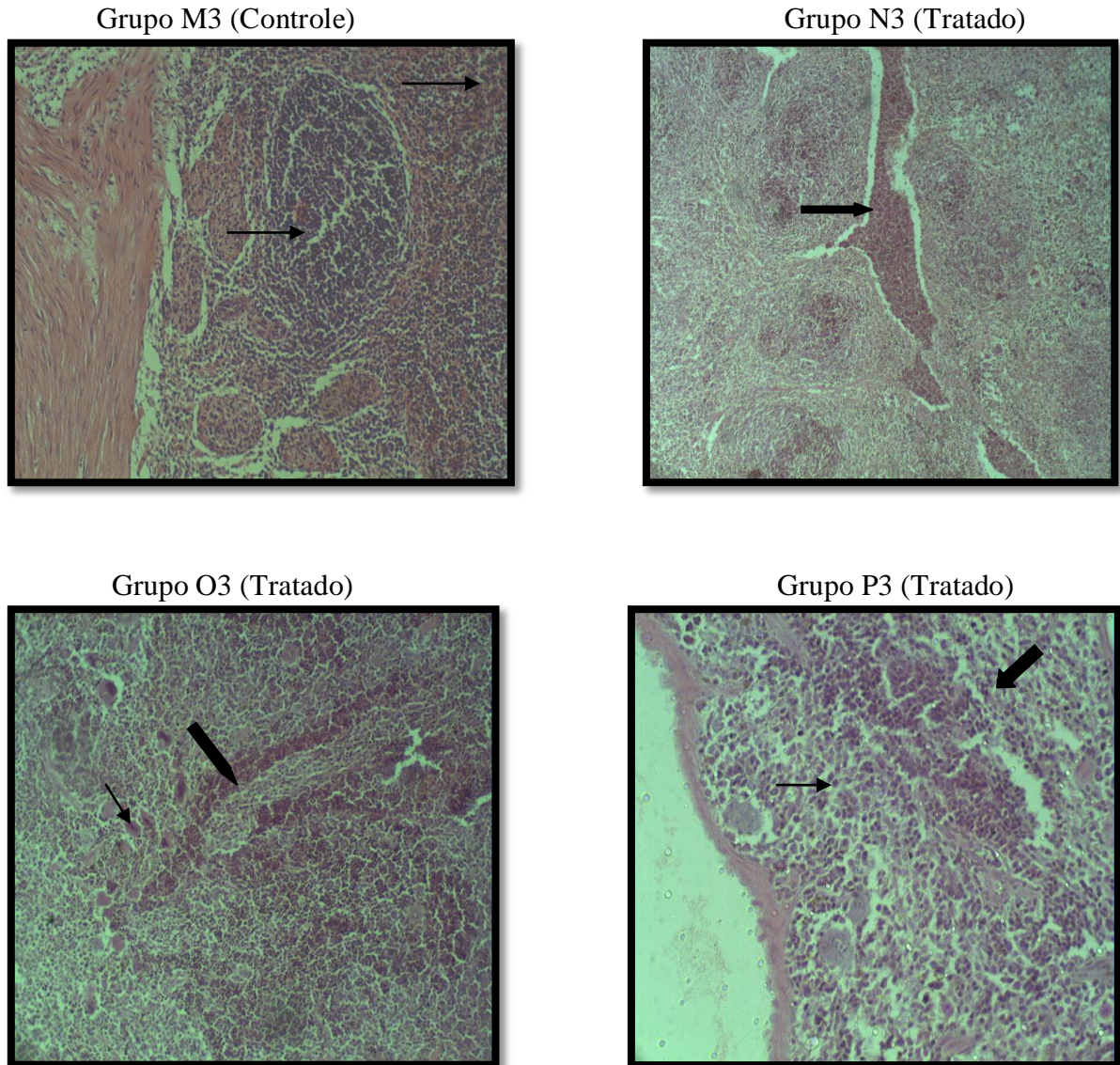


Figura 82 a 85 - Fotomicrografia do baço de camundongo evidenciando as polpas vermelha e branca normais e após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com o uso de veneno total da serpente *B. neuwiedi*.

No grupo M3 observou-se a polpa vermelha e a polpa branca normais (H.E.), (aumento 200X). No grupo N3 tratado com veneno total, observou-se a presença de hemorragia intersticial na polpa vermelha (**➡**) (H.E.), (aumento 100X). No grupo O3 tratado com veneno total, observou-se após quatro horas do envenenamento, presença de infiltrado inflamatório (**➡**) e macrófagos (**➡**) (H.E.), (aumento 200X). No grupo P3 tratado com veneno total, observou-se após vinte e quatro horas do envenenamento, hiperplasia da polpa vermelha (**➡**) e da polpa branca (**➡**) (H.E.), (aumento 400X).

Foram estudados o rim, fígado, coração e baço, quanto às alterações histológicas nestes órgãos, após duas, quatro e vinte e quatro horas de envenenamento com veneno total, fosfolipase A₂ e lectina C.

No rim, após duas, quatro e vinte e quatro horas do envenenamento, com o uso de frações fosfolipase A₂ (Figuras 38 a 41), lectina C (Figuras 54 a 57) e veneno total (Figuras 70 a 73), observamos que as alterações histológicas foram semelhantes tanto em relação ao uso de veneno total como em relação ao uso das frações fosfolipase A₂ e lectina C, como em relação ao tempo analisado. As principais alterações foram: hemorragia, congestão vascular, edema e degeneração hidrópica.

No fígado, verificamos que após duas, quatro e vinte e quatro horas do envenenamento, com o uso de frações fosfolipase A₂ (Figuras 42 a 45), lectina C (Figuras 58 a 61) e veneno total (Figuras 74 a 77) as alterações mais comuns foram congestão, edema, hemorragia, presença de inflamação e degeneração hidrópica.

No coração, observamos que após duas, quatro e vinte e quatro horas do envenenamento, com o uso de frações fosfolipase A₂ (Figuras 46 a 49), lectina C (Figuras 62 a 65) e veneno total (Figuras 78 a 81) as alterações mais comuns foram congestão, edema, hemorragia e degeneração hidrópica.

No baço, verificamos que após duas, quatro e vinte e quatro horas do envenenamento, com o uso de frações fosfolipase A₂ (Figuras 50 a 53), lectina C (Figuras 66 a 69) e veneno total (Figuras 82 a 85) as alterações mais comuns foram hiperplasia da polpa branca e vermelha, presença de inflamação, edema e hemorragia.

Com relação ao tratamento dos animais com as cabenegrinas foi visto que as lâminas dos animais tratados tanto com cabenegrina A-I nas diluições 2,5:1 e 5:1 como com as cabenegrina A-II nas diluições 2,5:1 e 5:1 não apresentaram alterações histológicas. E, não houve diferença entre as lâminas controle com as lâminas tratadas com as cabenegrinas. Portanto, não houve necessidade de fotografia, pois as lâminas tratadas corresponderam às lâminas usadas como controle.

5 DISCUSSÃO

5.1 Alterações da série vermelha

Ao analisar o sangue do plexo retro-orbital de camundongos em relação ao sangue periférico do ser humano deve-se levar em conta as diferenças existentes nos roedores. Estudos experimentais realizados por Diniz *et al.* (2006) mostraram que camundongos adultos normais apresentam valores mais elevados de eritrócitos, um VCM diminuído, uma porcentagem mais elevada de linfócitos em relação ao número total de leucócitos e uma contagem maior de plaquetas quando comparados com os valores de referência para seres humanos saudáveis.

Ao estudarmos as possíveis alterações hematológicas periféricas causadas pelo envenenamento ofídico verificamos que as mesmas foram constatadas por diversos autores e envolvem tanto as séries vermelha, branca e plaquetária (LAGO *et al.*, 2001; IZIDORO *et al.*, 2003; SANTORO *et al.*, 2008).

Neste trabalho, os resultados mostraram que com o uso de fosfolipase A₂, ocorreu aumento do número de hemácias, na concentração de hemoglobina e na determinação do hematócrito, porém sem significância estatística, as alterações do eritrograma que apresentaram diferença estatística significativa foram a diminuição do VCM e o aumento do CHCM às duas horas.

Com o uso de lectina C, as alterações da série vermelha que apresentaram significância estatística foram: o aumento do hematócrito e CHCM, às duas e quatro horas, respectivamente.

As alterações do eritrograma que apresentaram significância estatística com o uso de veneno total foram: o aumento do número de hemácias e a dosagem de hemoglobina às duas horas.

O veneno de serpentes botrópicas é caracterizado na literatura científica (SANO-MARTINS *et al.*, 1995) como causador de discreta anemia, de modo que, o aumento da contagem de hemácias, da concentração de hemoglobina e do hematócrito observados na presente pesquisa não foi concordante com esta afirmação.

Nesta pesquisa, algumas causas podem explicar o aumento dos parâmetros do eritrograma ocorrido no tempo duas horas. O discreto aumento do número dos eritrócitos pode ocorrer como resultado da dor e do estresse (efeito das catecolaminas) nos animais, levando a uma contração esplênica. A contração esplênica, por sua vez, pode causar liberação

temporária de grande massa de eritrócitos na corrente sanguínea (TARASIUK; SOFER, 1999). No entanto, esta alteração não ocorreu no nosso grupo controle que também sofreu estresse e dor, o que afasta esta possibilidade.

O aumento do hematócrito pode ocorrer por ação das metaloproteases existentes no veneno botrópico que podem destruir o endotélio e a membrana basal das células, aumentando a permeabilidade vascular, levando a perda de líquido para os tecidos, com conseqüente hipovolemia e hemoconcentração (GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009).

Relatou-se hemoconcentração transitória em diferentes envenenamentos ofídicos. Ruiz *et al.* (1980) estudaram o sangue periférico e as alterações metabólicas em cães picados pela serpente *Crotalus viridis helleri* e observaram aumento de hematócrito, da dosagem de hemoglobina e do volume corpuscular médio após 5 minutos do envenenamento, entretanto estes parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao controle.

O aumento da hemoconcentração também foi observado por Franceschi (1990) em cães que sofreram envenenamento experimental, utilizando a via intravenosa pelos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*.

Napathorn *et al.* (1998) estudaram o efeito do veneno da serpente *Russel* nos eritrócitos humanos, com respeito ao hematócrito, morfologia eritrocitária e efeito do antiveneno. Verificaram que nas dosagens de 50ng a 120µg ocorreu aumento significativo do hematócrito e os eritrócitos mudaram de morfologia, passando do formato bicôncavo para esfero-equinócito.

Lago *et al.* (2001) inocularam por via intramuscular 0,03mg/kg da toxina crotamina da *Crotalus durissus terrificus* em bovinos e verificaram elevação do número de hemácias e diminuição da hemoglobina corpuscular médio e do volume corpuscular médio.

Seveg *et al.* (2004) através de um estudo retrospectivo, verificaram que cães envenenados acidentalmente pela peçonha da serpente *Vipera palaestinae*, em Israel, apresentaram diversas alterações clínicas, acompanhadas de modificações nos exames laboratoriais como, aumento do hematócrito e na concentração de hemoglobina, leucocitose e plaquetopenia.

Oliveira *et al.* (2010) inocularam por via intramuscular superficial, 0,15mg/kg de veneno de *Bothrops alternatus* em bovinos. No eritrograma ocorreu pequena elevação no número de eritrócitos até 24 horas e queda significativa 48 horas após a inoculação do veneno. Estes autores correlacionam este aumento ao estresse e a dor local, devido à ação de

catecolaminas, indicando policitemia relativa nas primeiras horas do envenenamento botrópico. Posteriormente, no tempo 72 horas, ocorreu perda abrupta de sangue.

Entretanto, alguns autores encontraram resultados diferentes aos nossos em outras espécies de serpentes. Nogueira; Sakate (2006) estudaram 16 cães divididos em dois grupos, com 8 animais cada. O primeiro grupo recebeu 1mg/Kg de veneno crotálico por via subcutânea e 30mg de soro antiofídico por via intravenosa e o segundo grupo recebeu 1mg/Kg de veneno crotálico por via subcutânea e 60mg de soro antiofídico por via intravenosa. Os dois grupos tratados com veneno crotálico apresentaram alterações hematológicas caracterizadas principalmente por diminuição no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Entretanto aqueles animais que receberam maior quantidade de soro antiofídico se recuperaram mais rapidamente.

Santoro *et al.* (2008) estudaram 100 pacientes picados por *Bothrops jararaca* e correlacionaram os valores hematológicos com a severidade do envenenamento. Pacientes que desenvolveram sangramento local e sistêmico mostraram uma grande queda no hematócrito, contagem de hemácias e concentração de hemoglobina, comparados com aqueles pacientes que não tiveram sangramento. Os valores de hemoglobina, hematócrito e eritrócitos em todos os pacientes independentemente da severidade do envenenamento apresentaram uma queda em torno de 8%.

Floriano *et al.* (2009) verificaram diminuição do número de hemácias, hemoglobina e hematócrito após inoculação de veneno crotálico em ratos *Wistar*, tanto no grupo de animais tratado com veneno e soro botrópico-crotálico, como no grupo tratado com a associação de veneno, soro botrópico-crotálico e extrato aquoso de *M. glomerata*.

Na nossa pesquisa, os resultados obtidos para contagem de número de hemácias, hematócrito e dosagem de hemoglobina não foram concordantes com os resultados dos estudos relatados acima. Provavelmente porque estes autores verificaram anemia e hemólise, situação não observada no nosso trabalho.

Foram vistas variações leves nos índices hematimétricos desta pesquisa, entretanto estas variações não tiveram repercussão importante na morfologia dos eritrócitos destes camundongos, foi visto apenas discreta anisocitose.

Os resultados observados na nossa pesquisa forma semelhantes à literatura pesquisada.

5.2 Alterações da série branca

Na análise do leucograma, os resultados mostraram que com o uso de fosfolipase A₂ ocorreu leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda, às duas e quatro horas após o envenenamento com significância estatística.

Apesar de não ter ocorrido leucocitose com o uso de lectina, verificou-se neutrofilia com desvio à esquerda, as duas, quatro e oito horas após o envenenamento com significância estatística. O que não era de se esperar, já que a lectina tem baixa potência e corresponde a uma porcentagem reduzida da peçonha (KASSAB *et al.*, 2004; RUCAVADO *et al.*, 2005).

Com o uso de veneno total, ocorreu leve aumento de leucócitos sem significância estatística, entretanto, a neutrofilia com desvio à esquerda só foi significativa após duas horas do envenenamento.

Houve uma queda nos valores médios dos linfócitos com o uso de veneno total e lectina C nos tempos 2, 4 e 8 horas sem significância estatística. Nos roedores, a principal célula da linhagem branca é o linfócito, representando em torno de 70% do total em animais sadios. Nos animais envenenados houve redução destas células em função do aumento significativo de neutrófilos.

Na análise morfológica do leucograma, não foram vistas alterações morfológicas nos leucócitos.

Leucocitose com neutrofilia é uma alteração comum, registrada em muitos casos clínicos humanos de envenenamento botrópico e também em camundongos, ratos, bovinos e cães (NOGUEIRA *et al.*, 2007; CALDAS *et al.*, 2008; SANTORO *et al.*, 2008).

A resposta leucocitária observada na nossa pesquisa poderia ter sido causada pelo estresse produzido pela manipulação, desconforto e dor dos animais, que maximiza a descarga de adrenalina e provoca leucocitose fisiológica devido ao desprendimento de leucócitos do *pool* marginal dos vasos sanguíneos para o *pool* circulatório (NOGUEIRA; SAKATE, 2006). Porém, tal alteração, não foi vista nos nossos animais controle.

Após 16 horas do envenenamento com veneno total e lectina C, o número de neutrófilos começou a diminuir enquanto que o número de linfócitos aumentou, mostrando similaridades com um processo infeccioso.

A presença de leucocitose com desvio nuclear à esquerda no presente estudo tem sido referida por diversos autores na fase inicial do envenenamento botrópico. Oliveira *et al.* (2007) utilizaram dois grupos de caprinos, em um grupo inocularam por via intramuscular o veneno puro de *Bothrops jararaca* e no outro grupo utilizaram o veneno irradiado com

cobalto 60. Ocorreu leucocitose em ambos os grupos, sendo mais intensa nos animais inoculados com o veneno puro.

Santoro *et al.* (2008) no Brasil, estudando pacientes picados pela serpente *Bothrops jararaca*, verificaram que a leucocitose e neutrofilia presentes eram diretamente proporcionais a intensidade do envenenamento.

Bovinos inoculados com a peçonha de *Bothrops alternatus*, por via subcutânea, nas doses de 0,0625, 0,125 e 0,25mg/kg, apresentaram discreta leucocitose caracterizada por neutrofilia, monocitose, linfopenia e eosinopenia. Os autores associaram estas alterações ao estresse e ao processo inflamatório agudo ocorrido no local da inoculação do veneno (CALDAS *et al.*, 2008)

Aragão *et al.* (2010) estudaram grupos de ovinos envenenados pelo veneno das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacussu* por via subcutânea. Os exames laboratoriais revelaram acentuada anemia normocítica e normocrômica e o leucograma apresentou discreta leucocitose caracterizada por eosinopenia, linfopenia, neutrofilia relativa e desvio nuclear de neutrófilos à esquerda.

Leucocitose com neutrofilia também foi visto em envenenamento por serpentes do gênero crotálico. Nogueira *et al.* (2007) após intoxicação crotálica em cães, relataram leucocitose com neutrofilia, diminuição no número de eosinófilos e linfócitos, caracterizando uma resposta inflamatória aguda e estresse.

Graça *et al.* (2008) reproduziram experimentalmente o envenenamento crotálico, através da inoculação, por via subcutânea, do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em dez bovinos mestiços. Verificaram além de alterações clínicas nos animais, discreto a moderado aumento do tempo de sangramento, moderado aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada, moderada leucocitose com neutrofilia, linfopenia relativa, eosinopenia, monocitose e discreto aumento do número de bastões.

A explicação mais plausível para a leucocitose neutrofílica, observada neste trabalho, pode ter sido causada pela interação entre o veneno botrópico e o organismo animal, que induz uma reação inflamatória celular evidente, levando a uma típica resposta de fase aguda com liberação de catecolaminas, mediadores celulares e humorais, e fatores quimiotáticos séricos que são responsáveis pelo acúmulo de leucócitos, com predominância dos polimorfonucleares, os neutrófilos no local da lesão, refletindo-se de maneira evidente no leucograma (BARRAVIERA *et al.*, 1995).

5.3 Alterações da série plaquetária

Dos elementos figurados do sangue, as plaquetas foram às células que sofreram alterações quantitativas (plaquetopenia) mais marcantes no envenenamento, quando comparamos os camundongos envenenados com veneno total, frações lectina C e fosfolipase A₂ com os animais controle. Houve um declínio acentuado na contagem plaquetária dos animais envenenados com o veneno total e lectina C, que perdurou até 8 horas. E com a administração da fosfolipase A₂, a plaquetopenia foi mais persistente perdurando até 16 horas. Após 24 horas, o número de plaquetas circulantes começou a aumentar, aproximando-se dos níveis do grupo controle.

Segundo a literatura, a trombocitopenia decorrente do envenenamento botrópico, no homem, se caracteriza com o aparecimento de petéquias, hemorragias, equimoses e hematomas (PINHO; PEREIRA, 2001). Embora a plaquetopenia estivesse presente nos animais envenenados do nosso experimento, os camundongos não apresentaram estes sinais clínicos de distúrbio hemostático comuns nos homens.

Existem vários trabalhos mostrando diminuição do número de plaquetas no envenenamento botrópico. Franceschi (1990) inoculou grupos de cães com veneno das serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*. Este autor reportou trombocitopenia e uma leve hemoconcentração nos exames hematológicos dos animais estudados.

Kamiguti *et al.* (1991), Sano-Martins *et al.* (1997), Santoro *et al.* (2008) e Oliveira *et al.* (2008) também observaram trombocitopenia em humanos picados por serpentes do gênero *Bothrops*. Kamiguti *et al.* (1991) sugeriram que a plaquetopenia associada ao prolongado tempo de coagulação, aumentava o risco de sangramento. Sano-Martins *et al.* (1997), verificaram que os pacientes picados pela *Bothrops jararaca* apresentavam trombocitopenia associada com disfunção plaquetária e Oliveira *et al.* (2008) relataram que a plaquetopenia estava relacionada à gengivorragia e hematúria presentes nos pacientes.

Santos *et al.* (2003) utilizaram 12 cães adultos e inocularam 0,3mg/Kg de veneno da *B. alternatus*, via intramuscular, além de observarem plaquetopenia, verificaram que 30 horas após o envenenamento, os valores médios de plaquetas ainda não haviam retornado aos valores considerados normais.

Izidoro *et al.* (2003) inocularam grupos de camundongos com veneno total e com a toxina neuwidase da serpente *Bothrops neuwiedi*. O veneno total causou diminuição de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas, enquanto que a toxina neuwidase induziu apenas a diminuição do número de plaquetas.

Santoro; Sano-Martins (2004) mostraram que o envenenamento experimental de coelhos com veneno de *Bothrops jararaca* causou não só trombocitopenia, mas também, hipofibrinogenemia, aumento nos níveis do fator von Willebrand, hipoagregação plaquetária no plasma rico em plaquetas e no sangue total, normoagregação em suspensão de plaquetas lavadas, diminuição da secreção de ATP plaquetário, nível plasmático normal de fator 4 plaquetário e nível de serotonina intraplaquetário constante.

Rucavado *et al.* (2005) desenvolveram um modelo experimental para estudar os efeitos do veneno de *B. asper* no número e na função das plaquetas em camundongos. A administração intravenosa do veneno induziu trombocitopenia rápida e proeminente. A queda no número de plaquetas foi devido principalmente a aspercetina, uma proteína da família de lectina tipo C que induziu agregação plaquetária. Além disso, o efeito de metaloproteinase hemorrágica de classe P-III, na parede de microvasos, também contribuiu para a trombocitopenia.

Mendes *et al.* (2008) observaram que o número de plaquetas e a concentração de fibrinogênio plasmático diminuíram em aproximadamente, 56% e 63%, respectivamente, quando o veneno de *Bothrops pauloensis* foi inoculado em camundongos *Swiss*, por via intramuscular.

Aragão *et al.* (2010) estudaram ovinos envenenados por *B. jararaca* e *B. jararacussu* por via subcutânea. Os exames laboratoriais revelaram além de acentuada anemia normocítica normocrômica, discreta leucocitose e trombocitopenia. Por outro lado, Haad (1981) não observou trombocitopenia em pacientes picados por serpentes *Bothrops atrox* e *Bothrops bilineatus*.

A trombocitopenia que ocorreu nesta pesquisa pode ser decorrente da ação da lectina C com o fator von Willebrand que pode promover a interação com a glicoproteína plaquetária, resultando em aglutinação plaquetária e conseqüente redução das plaquetas circulantes (KAMIGUTI *et al.*, 1991; GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009)

As metaloproteinases hemorrágicas e a fosfolipase A₂ também podem contribuir com a trombocitopenia. As metaloproteinases podem causar dano nos microvasos fazendo com que as plaquetas circulantes migrem para o sítio lesionado culminando com o consumo do número de plaquetas na circulação (IZIDORO *et al.*, 2003). E, a fosfolipase A₂ pode contribuir para plaquetopenia, através da produção de prostaglandina E₂ e tromboxano A₂ que promovem a agregação plaquetária (SANO-MARTINS, 1990; KAMIGUTI *et al.*, 1991; ROODT *et al.*, 2000).

Como já descrito, as fosfolipases A₂ podem ser classificadas em três grupos: classe A, aquelas que induzem agregação plaquetária, classe B, fosfolipases que inibem a agregação plaquetária e classe C, fosfolipases que induzem resposta bifásica (pró e anti-agregante) (KIN; EVANS, 1990). Provavelmente, a fosfolipase A₂ presente no veneno da serpente *B. neuwiedi* pertence à classe A.

5.4 Alterações das células da medula óssea

A avaliação hematológica fornece importantes indícios de manifestações tóxicas locais e sistêmicas induzidas pelo veneno ofídico. Alterações no número de células circulantes podem indicar o comprometimento da hematopoese devido a interferências na multiplicação, maturação ou diferenciação celular, processos esses dependentes das células pluripotentes da medula óssea, do microambiente medular e dos fatores reguladores envolvidos (WEISS, 1993).

A medula óssea é constituída por células hematopoiéticas como série eritróide, mielóide, linfóide, monocítica, megacariocítica e outras células (normalmente encontradas na medula e não classificadas dentro das séries anteriores (KUTER; GMINSKI; ROSENBERG, 1992).

Neste trabalho foi observado com o uso de fosfolipase A₂, as alterações na medula óssea que mostraram significância estatística foram: o aumento do número de células eritróides (duas e quatro horas), aumento do número de células mielóides (duas, quatro, oito e dezesseis horas) e aumento do número de células linfóides (duas horas) e diminuição de megacariócitos (quatro horas).

Com o uso de lectina C, as alterações que foram estatisticamente significantes foram: o aumento do número de células eritróides (duas e quatro horas), aumento do número de células mielóides (duas, quatro e oito horas) e aumento do número de células linfóides (duas e quatro horas).

Com o uso de veneno total, as alterações que apresentaram significância estatística foram: hiperplasia das células eritróides (quatro, oito, dezesseis e vinte e quatro horas), hiperplasia das células mielóides (duas, quatro, oito, dezesseis e vinte e quatro horas) e hipoplasia dos megacariócitos (duas e oito horas). Entre o veneno total e as duas frações, o veneno total teve ação mais persistente, pois a hiperplasia das células eritróides e mielóides persistiu até 24 horas.

Como descrito anteriormente, ocorreu leucocitose no sangue circulante duas horas após o envenenamento, principalmente com o uso de fosfolipase A₂. Sabe-se que o veneno dos animais peçonhentos atua no organismo humano de maneira semelhante a um trauma agudo. Assim, o veneno ofídico pode interagir com as células alvo (macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos) liberando citocinas, em especial a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), que atuam na medula óssea ativando a produção e liberação de neutrófilos e células jovens como bastonetes e metamielócitos para o sangue periférico (BARRAVIERA *et al.*, 1995). Desse modo, os resultados do mielograma da nossa pesquisa, associados aos do leucograma indicam aumento da produção de células hematopoiéticas mielóides.

Maria; Vassão; Ruiz (2003) inocularam a toxina jararagina da serpente *Bothrops jararaca* em camundongos em diferentes doses. A análise diferencial da medula óssea mostrou significativo aumento das células mielóides, particularmente dos mielócitos, nas doses de 12ng e 24ng.

Trabalho realizado por Lemos; Oliveira em 2009, quanto ao efeito da peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni* e sua miotoxina, denominada BmTx, sobre a medula óssea de camundongos, mostrou que os animais que receberam peçonha bruta (25µg) e BmTx (48ng e 96ng) apresentaram um aumento significativo de células medulares de 60%, 82% e 62%, respectivamente. Além disso, foi visto que quando comparados os grupos, o número de mieloblasto, mielócito, metamielócito, neutrófilo bastonete, monócito e linfócito entre os grupos tratados e o grupo controle não apresentaram diferenças significativas, sendo que em todos houve um predomínio de neutrófilos metamielócitos, neutrófilos segmentados e linfócitos.

Na nossa pesquisa, a contagem de megacariócitos apresentou diminuição, sendo esta redução significativa com o uso de veneno total (tempo duas e oito horas) e fosfolipase A₂ (tempo 4 horas), enquanto que com o uso de lectina C esta diminuição não apresentou significância estatística. A queda do número de megacariócitos na medula óssea foi acompanhada pela diminuição do número de plaquetas no sangue periférico.

A medula óssea dos animais apresentou uma hiper celularidade, com hiperplasia leve da série eritróide e da série granulocítica com o uso de veneno total e frações. A relação mielóide/eritróide aumentou com veneno total e frações, principalmente às duas e quatro horas após o envenenamento.

Neste trabalho, não foram observados vacúolos citoplasmáticos e/ou nucleares nas séries eritróide, mielóide, linfóide e megacariocítica. Todas as séries apresentaram maturação

conservada e mitoses normais. Estas observações sugerem que o veneno e as frações lectina e fosfolipase A₂ da serpente *Bothrops neuwiedi* causam alteração quantitativa, não interferindo na morfologia celular.

A ausência de alterações qualitativas nas células do mielograma também foi observada por Nogueira *et al.* (2007). Estes autores estudaram a medula óssea de cães, após receberem 1mg/kg de veneno de *Crotalus durissus terrificus* por via subcutânea. Os resultados mostraram que no geral as células eritróides e mielóides mantiveram maturação conservada e mitoses normais. Ocorreu hipoplasia das séries eritróide e granulocítica com aumento da relação mielóide/eritróide e não foram observadas alterações morfológicas na série megacariocítica.

Porém, Ruiz *et al.* (1980) inocularam o veneno da serpente *Crotalus viridis helleri* em cães e verificaram no sangue periférico, redução no número de plaquetas e fibrinogênio, no exame da medula óssea, redução no número de megacariócitos e a presença de vacúolos citoplasmáticos nos mesmos.

Também, Takahira (1998), após injetar venenos de *Bothrops jararaca* e de *Bothrops neuwiedi* em cães, observou diminuição significativa nas contagens total de plaquetas e megacariócitos, presença de alterações morfológicas na série megacariocítica, além de alterações na função plaquetária como, prolongamento no tempo parcial de tromboplastina ativada, prolongamento nos tempos de trombina, protrombina e coagulação, sendo estas alterações mais evidentes com o uso de veneno de *Bothrops jararaca*.

A presença de megacariócitos sem alterações morfológicas na nossa pesquisa sugere que as alterações de função plaquetária possam ser minimizadas pela produção de plaquetas normais (sem defeito) *in vivo*.

5.5 Alterações das células do baço

O baço é o único órgão linfóide interposto na circulação sanguínea, além de ser o maior acúmulo de tecido linfóide no organismo. Devido ao contato íntimo com o sangue, o baço está pronto para responder a estímulos positivos ou negativos, trazidos pelo sangue. Em roedores, ao contrário da espécie humana, o baço divide com a medula óssea a função de suprir o sangue com os elementos figurados, sendo identificados precursores, eritrocíticos, granulocíticos e megacariocíticos nas secções histológicas deste órgão (FREITAS *et al.*, 2009). Considerando que as alterações hematológicas são uns dos principais efeitos no

envenenamento botrópico, é considerável a probabilidade das mesmas serem encontradas no baço, por suas características.

No baço, houve um acréscimo do percentual das células mielóides e um decréscimo no percentual de células linfóides até 8 horas quando se fez uso de fosfolipase A₂. Houve um aumento na relação M/E, após 4 horas de envenenamento por fosfolipase A₂ comparado ao grupo controle.

A única alteração significativa, com o uso de lectina C, comparativamente ao grupo controle, ocorreu após 4 horas, aumento no percentual de células mielóides.

Com o uso de veneno total, ocorreu um acréscimo no percentual de células mielóides e na relação M/E nos tempos 2, 4, 8 e 16 horas. Entretanto houve um decréscimo no percentual de células linfóides nos tempos 2, 4 e 8 horas, comparado ao grupo controle.

Como descrito anteriormente, com relação ao número percentual do número de megacariócitos, estes não foram analisadas devido à falta de variabilidade entre os tempos. Ou seja, a administração de veneno total e frações nos camundongos não provocou variação no número percentual de megacariocíticas presentes no baço, em nenhum tempo analisado.

Segundo a literatura, a contagem plaquetária do sangue total reflete o equilíbrio entre as plaquetas circulantes, as plaquetas contidas em órgãos de estoque plaquetário (como o baço), os trombócitos que são produzidos pela medula e aqueles que são retirados da circulação. Em condições de consumo de plaquetas, o baço se contrai e as libera do reservatório esplênico para a circulação, aumentando sua contagem periférica (FREEDMAN; KARPATKIN, 1975).

A contagem plaquetária dos nossos animais se manteve baixa até 16 horas após a administração da fosfolipase A₂ e até 8 horas após a inoculação do veneno total e lectina. Podemos especular que as plaquetas acumuladas no baço pouco contribuíram para restabelecimento da trombocitopenia nas primeiras 8 horas após o envenenamento. Porém, também pode ter ocorrido que as plaquetas recém liberadas do baço tenham sido imediatamente consumidas, ocultando desta forma a liberação de plaquetas esplênicas.

No esplenograma não foram observados vacúolos citoplasmáticos e nucleares nas séries eritróide, mielóide, linfóide e megacariocítica. Todas as séries apresentaram morfologia normal. Adicionalmente, é interessante dizer que quando foi administrado veneno total nos camundongos, as células mielóides do baço, com relação ao grupo controle, foi decrescendo ao longo do tempo e aparentemente de forma linear, sugerindo que a queda no percentual de células mielóides do esplenograma variou em função do tempo através de um modelo de regressão linear.

A literatura é escassa no que se refere às alterações de células hematológicas na medula óssea e baço de camundongos envenenados por serpentes do gênero *Bothrops*, dificultando a análise comparativa dos resultados. Porém, pelos resultados obtidos neste experimento pode-se demonstrar que o camundongo se comporta de maneira semelhante ao homem e outros animais frente ao veneno botrópico.

5.6 Alterações histológicas

A análise microscópica dos órgãos dos camundongos inoculados com veneno total, lectina e fosfolipase A₂ foi feita nos tempos duas, quatro e vinte e quatro horas. Observamos processo congestivo nos órgãos (baço, rim, fígado e coração) nos animais, tanto com o uso de veneno total como das frações, assim como, em todos os tempos estudados.

Pela própria definição de congestão “distúrbio do retorno venoso possivelmente por obstrução de vasos” (PINTÃO; FRANCO, 2001). Sugerimos que este processo congestivo, ocorrido nos nossos animais pode ter sido resultado da ação pró-coagulante do veneno que levou à formação de coágulo de fibrina na microvasculatura.

Soerense *et al.* (1995) além da congestão esplênica, observaram congestão renal e hepática em bovinos, 48 horas após a inoculação do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

Segundo a literatura, a congestão das redes capilares está intimamente relacionada ao desenvolvimento de edema, de modo que a congestão e o edema normalmente ocorrem juntos. O edema pode ocorrer pela formação de microtrombos e diminuição do fluxo sanguíneo ou pelo aumento da permeabilidade, causada pela liberação de substâncias vasoativas, como histamina e bradicinina, associada à estase sanguínea (FERREIRA; BARRAVIERA, 2004).

O edema intersticial observado principalmente nos rins e fígado dos animais deste experimento, pode ser explicado pelas duas ações, citadas acima, presentes nos venenos botrópicos.

Também foi observada nesta pesquisa, a presença de hemorragia cardíaca, esplênica, renal e hepática em alguns animais, sendo esta, possivelmente um reflexo da atividade do veneno botrópico sobre os vasos, plaquetas e fatores de coagulação (CASTRO, 2006). A evidência de hemorragia intersticial no coração, baço, rins e fígado indica extravasamento de sangue em virtude de ruptura vascular decorrente da congestão vista nestes órgãos.

Raposo *et al.* (2000/2001) descreveram um caso de acidente ofídico em um equino de um mês, associado à picada por serpente do gênero *Bothrops*. Estes autores observaram congestão e hemorragia severa no baço, rins, fígado, musculatura, timo, intestino e no cérebro, além de áreas de necrose na musculatura próxima a área da picada e no baço.

Koscinczuk, *et al.* (2007) utilizando dose de 1400 μ g do veneno da serpente *B. neuwiedi diporus*, por via intramuscular, em ratos *Wistar*, verificaram após 3 horas do envenenamento, edema e infiltrado inflamatório intersticial nos rins destes animais.

Nos baços dos animais envenenados, também foi visto hiperplasia da polpa branca e da polpa vermelha e pigmentação por hemossiderina.

A presença de hiperplasia não tem uma explicação conhecida, pois pode ocorrer espontaneamente nos roedores. Tal alteração foi relatada em baços de ratos *Fischer* idosos (CESTA, 2006; SUTTIE, 2006).

A hemossiderina é um pigmento que contém ferro, resultante da degradação da hemoglobina. A presença de hemossiderina no baço dos camundongos pode ser resultado da ruptura dos capilares neste órgão que pode causar pequenos focos de hemorragia; a degradação e fagocitose dos restos dos eritrócitos podem gerar pequenos grupos de macrófagos cheios de hemossiderina (FREITAS *et al.*, 2009).

Contudo, Zeni *et al.* (2007) estudando a atividade do veneno da serpente *B. jararacussu*, nas doses 25 μ g e 50 μ g, em camundongos *Swiss*, não observaram alterações histológicas no baço e no músculo esquelético desses animais. Essa divergência com a nossa pesquisa, provavelmente reflitam diferenças na espécie de serpente e nas doses de veneno utilizadas.

Outras alterações histológicas encontradas, principalmente nos rins e no fígado, foram o infiltrado inflamatório e à degeneração hidrópica.

Nos tecidos hepático e renal foram evidenciados tanto a presença de infiltrado inflamatório com polimorfonucleares quanto a existência de infiltrado inflamatório com a presença de linfócitos e plasmócitos. O primeiro achado é sugestivo de uma agressão tecidual aguda provocada pelo veneno da serpente *Bothrops neuwiedi*. Como se sabe nos primeiros estágios de uma resposta aguda há predomínio numérico de neutrófilos. Essas células, mobilizadas a partir dos compartimentos de reserva e da corrente sanguínea, marginam a superfície dos vasos da microcirculação da área afetada e migram para o exterior do vaso, através de junções interendoteliais (diapedese). Uma vez no sítio extravascular, locomovem-se em resposta a um gradiente de concentração de mediadores inflamatórios quimiotáticos

(quimiotaxia) e acumulam-se no local de lesão, para destruírem o agente lesivo (KAPLANSKI *et al.*, 2003; WINKLER; LÉVESQUE, 2006; FURZE; RANKIN, 2008).

Por outro lado, o achado de infiltração inflamatória mononuclear, descrito neste trabalho, provavelmente é incidental, já que essa lesão apesar de comum nos rins e fígado de camundongos envenenados, em princípio, demanda mais tempo para sua instalação (GRAÇA *et al.*, 2008).

Quanto ao processo inflamatório, Búrigo; Calixto; Medeiros (1996) demonstraram que o veneno da serpente *B. jararaca* induz reação inflamatória de longa duração quando injetado na cavidade pleural de ratos. Estes autores verificaram que o veneno induz um aumento de fluido e de migração celular para esta cavidade, e que vários mediadores tais como histamina, serotonina e produtos do ácido araquidônico, participam desse efeito.

A presença de degeneração hidrópica vista neste trabalho, pode ter ocorrido por ação direta do veneno, de efeitos aditivos ou sinérgicos das diferentes toxinas e enzimas presentes nos venenos que podem alterar o funcionamento da membrana celular, levando a um desequilíbrio eletrolítico e hemodinâmico. É uma lesão que reflete a fase inicial da agressão tóxica do veneno e caracteriza-se pelo acúmulo de água e eletrólitos no interior da célula, tornando-a tumefeita, aumentada de volume. Quase sempre, não acarreta conseqüências funcionais muito sérias, a não ser que seja muito intensa. Esse processo no seu início é reversível, porém, se houver manutenção da agressão à célula, o processo torna-se irreversível, culminando com a morte celular (BARRAVIERA *et al.*, 1995).

Acosta de Pérez *et al.* (1996) inocularam no músculo gastrocnêmico de ratos, 50µg de veneno da serpente *Bothrops alternatus*. Após 3 e 6 horas de exposição ao veneno, o tecido hepático apresentou tumefação celular e degeneração hidrópica nas áreas das veias centrais. Os rins apresentaram congestão no córtex renal e degeneração hidrópica nos túbulos contornados proximais e distais.

Como se sabe, os rins e fígado possuem importante papel na metabolização do veneno, estando por este motivo, mais vulneráveis aos efeitos nocivos do mesmo (TANIGAWA *et al.*, 1994). Lesões histológicas, caracterizadas por congestão e degeneração hidrópica localizadas principalmente no rim, são consideradas características do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*.

Entretanto, no exame histológico dos rins dos camundongos usados na nossa pesquisa não foram observadas as alterações clássicas descritas por Amaral *et al.* (1985) como necrose tubular aguda ou ocorrência de alterações glomerulares. Porém, Aung-Khin (1978) refere que essas alterações renais são mais evidentes em animais que sobrevivem pelo menos 16 horas

após o envenenamento. Mesmo após 24 horas do envenenamento de nossos animais, não observamos as alterações citadas por Amaral *et al.* Este resultado diferente do nosso pode ter ocorrido porque o referido autor usou outras espécies (*B. jararaca* e *B. jararacussu*) em seu experimento.

A insuficiência renal aguda descrita por vários autores é a principal causa de morte por acidentes com venenos ofídicos, ocorrendo secundariamente aos processos de glomerulonefrite aguda, necrose tubular aguda e necrose cortical renal. Entretanto, a ausência dessas alterações neste trabalho, leva a crer que o veneno da serpente *Bothrops neuwiedi* teve uma ação tóxica moderada sobre este órgão.

5.7 Tratamento com as Cabenegrinas

Pesquisas em busca de alternativas para amenizar os sintomas desencadeados por acidentes ofídicos vêm crescendo mundialmente, principalmente através do uso de plantas medicinais. Em muitos países, extratos de plantas têm sido tradicionalmente usados no tratamento de envenenamento ofídico, embora só uns poucos casos tenha tido validação científica (SOARES *et al.*, 2005). Estudos como o nosso indicam a importância de uma avaliação científica dos componentes das plantas que podem confirmar os efeitos biológicos atribuídos popularmente.

No presente estudo, avaliamos se as cabenegrinas A-I e A-II neutralizam a atividade tóxica do veneno da serpente *B. neuwiedi* em modelo experimental, este experimento baseado na incubação previamente das cabenegrinas com o veneno antes da inoculação dos animais, facilita a interação das toxinas com potenciais substâncias neutralizadoras, e é melhor do que os procedimentos baseados na inoculação independente do veneno e cabenegrinas, já que neste caso a rapidez com que desencadeia o efeito do veneno torna-se difícil sua inibição por agentes neutralizantes.

Na análise do sangue do plexo retro-orbital dos animais, foi visto que as cabenegrinas A-I e A-II em todas as diluições utilizadas (A-I 2,5:1, A-I 5:1, A-II 2,5:1 e A-II 5:1), foram capazes de neutralizar o veneno total revertendo a diminuição do número de plaquetas provocada pelo veneno total.

O tratamento com as cabenegrinas mostrou que as cabenegrinas A-I na diluição 2,5:1 e as cabenegrinas A-II nas diluições 2,5:1 e 5:1 neutralizaram as alterações na contagem

diferencial, ou seja, as referidas cabenegrinas diminuíram o número de neutrófilos segmentados, refletindo também no número de neutrófilos totais.

Na medula, as cabenegrinas A-I e A-II em todas as diluições utilizadas (A-I 2,5:1, A-I 5:1, A-II 2,5:1 e A-II 5:1), foram capazes de bloquear o aumento das células mielóides. E no baço, as cabenegrinas não conseguiram reverter às alterações quantitativas das células.

Na análise histológica, as cabenegrinas A-I 2,5:1, A-I 5:1, A-II 2,5:1 e A-II 5:1 associada ao veneno total reverteram as alterações histológicas nos órgãos estudados.

O primeiro relato de pterocarpanos com atividade antiofídica foi em 1982, quando, Nakagawa *et al.* isolaram as cabenegrinas A-I e A-II de um preparado conhecido por “Específico Pessoa” e verificaram que a injeção por via endovenosa da cabenegrina A-I em cães, 15 minutos antes da inoculação do veneno da serpente *Bothrops atrox*, restaurou a hipotensão e a parada cardíaca e respiratória nos animais. Estes autores também observaram que quando as cabenegrinas A-I e A-II foram injetadas na preparação de coração isolado de cães, minutos após a inoculação da dose letal de veneno, os efeitos tóxicos cardiovasculares foram revertidos. Entretanto, o mecanismo de ação das cabenegrinas não foi proposto pelos referidos autores.

Mors *et al.* (1989) e Melo *et al.* (1994) utilizaram o extrato das partes aéreas da *Eclipta prostrata* (Asteraceae) no tratamento da picada por serpentes e verificaram que a wedelolactona, um coumestano da classe dos isoflavonóides, presente na planta, neutralizou a letalidade do veneno de *Crotalus durissus* em ratos e apresentou efeito antihemorrágico contra o veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

Reyes-Chilpa *et al.* (1994) isolaram das raízes das plantas *Brongniartia podalyrioides* e *Brongniartia intermedia* um pterocarpano prenilado, o (-)-edunol. A administração de (-)-edunol (3.1 mg/kg, i.p.) anulou totalmente a mortalidade causada pela DL₅₀ do veneno da serpente *Bothrops atrox*.

As cabenegrinas A-I e A-II, a wedelolactona e o (-)-edunol guardam uma estreita semelhança do ponto de vista químico e biológico e mostraram efeito protetor contra o veneno ofídico. Suas estruturas químicas apresentam várias características que são relevantes para este tipo de atividade biológica, que são: um esqueleto isoflavonoide, funcionalidade deoxigenada e natureza ácida (MORS *et al.*, 1989; REYES-CHILPA; ESTRADA, 1995).

Entretanto, Borges *et al.* (1996) realizaram um estudo com o medicamento popular “Específico Pessoa” (este preparado fitoterápico é feito em Sobral-CE e a *Harpalyce brasiliiana* pode ser uma das possíveis espécies utilizadas nesta preparação) para verificar a eficácia desta poção em neutralizar as ações coagulante, hemorrágica e fosfolipásica do

veneno da serpente *Bothrops atrox*. Após o experimento, estes autores, concluíram que o medicamento foi ineficaz sob todos os aspectos.

Uma das melhores revisões sobre compostos químicos de plantas com supostas ações antiofídicas é a de Mors *et al.* em 2000. Estes autores citaram várias substâncias isoladas de plantas que neutralizam a ação letal do veneno da serpente *B. jararaca* em camundongos: triterpenos, compostos fenólicos, ácidos hidroxibenzoico, ácidos clorogênicos, curcuminóides, cumarinas, flavonóides, pterocarpanos, ácidos aristolóquicos, taninos e polissacarídeos. O grupo relatou que todas estas substâncias têm em comum o fato de pertencerem à mesma classe de metabólitos secundários, capazes de interagirem com receptores e enzimas dos venenos.

Recentemente, uma dissertação do nosso grupo de pesquisa, realizada por Ximenes (2009), mostrou que a cabenegrina A-II, isolada das raízes da planta *Harpalyce brasiliiana* foi capaz de diminuir a hemoconcentração, inibir a plaquetopenia, as alterações pressóricas, bem como, os efeitos bioquímicos, em ratos *Wistar*, envenenados experimentalmente pela serpente *Bothrops jararacussu*. O referido autor sugeriu que a ação da cabenegrina A-II no bloqueio dos efeitos pressóricos poderia estar relacionada à inibição enzimática das serinoproteases, calicreina-like ou, a inibição das miotoxinas que agem diretamente no miocárdio.

Trabalho realizado com a cabenegrina A-II mostrou que este pterocarpano tem alta afinidade pelos sítios ativos das toxinas BthTX-I e BthTX-II isoladas da serpente *Bothrops jararacussu*, principalmente o estereoisômero S da cabenegrina A-II. Este resultado revela que a atividade antiofídica da cabenegrina A-II pode ser pela inibição das enzimas presentes no veneno e não por antagonismo dos eventos fisiopatológicos (MORS *et al.*, 2000; DA SILVA *et al.*, 2004; XIMENES, 2009).

Diante do exposto, podemos sugerir que as cabenegrinas podem ter atuado, neste trabalho, através de dois mecanismos diferentes: Primeiro através da formação de um complexo entre as cabenegrinas e as proteínas ou enzimas presentes, inativando desta maneira o veneno. O segundo mecanismo seria a ligação das cabenegrinas com os íons metálicos divalentes, como zinco e cálcio, que são necessários para a atividade enzimática das metaloproteases e fosfolipases A₂, respectivamente, inativando dessa maneira essas enzimas.

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho constituiu em avaliar a ação das cabenegrinas no modelo *in vivo* e que os resultados demonstraram uma diminuição parcial das alterações hematológicas e uma redução total das alterações histológicas, podemos sugerir que as cabenegrinas A-I e A-II poderão no futuro ser utilizadas como coadjuvantes no tratamento dos acidentes ofídicos provocados pelas serpentes da espécie *B. neuwiedi*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No hemograma, com o uso de fosfolipase A₂, as alterações que apresentaram diferença estatística significativa foram a diminuição do VCM e o aumento do CHCM às duas horas; leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda, às duas e quatro horas e plaquetopenia de duas até 16 horas após o envenenamento.
- Com o uso de lectina C, as alterações que apresentaram significância estatística foram: o aumento do hematócrito e CHCM, às duas e quatro horas, respectivamente; neutrofilia com desvio à esquerda, as duas, quatro e oito horas e plaquetopenia de duas até 8 horas após o envenenamento.
- Com o uso de veneno total, o aumento do número de hemácias, a dosagem de hemoglobina e a neutrofilia com desvio à esquerda às duas horas foram significantes enquanto que a plaquetopenia apresentou diferença estatística significativa de duas até 8 horas após o envenenamento.
- Na medula óssea, com o uso de fosfolipase A₂, as alterações que mostraram significância estatística foram: o aumento do número de células eritróides (duas e quatro horas após o envenenamento), aumento do número de células mielóides (2 a 16 horas após o envenenamento) e aumento das células linfóides (2 horas após o envenenamento).
- Com o uso de lectina C, as alterações que foram estatisticamente significantes foram: o aumento do número de células eritróides e linfóides (2 e 4 horas após o envenenamento) e aumento do número de células mielóides (2 a 8 horas após o envenenamento).
- Com o uso de veneno total, o aumento do número de células eritróides (4 a 24 horas após o envenenamento), aumento do número de células mielóides (2 a 24 horas após o envenenamento) e diminuição de megacariócitos (2 e 8 horas após o envenenamento). Entre o veneno total e as duas frações, o veneno total teve ação mais persistente, pois o aumento das células eritróides e mielóides persistiu até 24 horas.

- No baço, houve um acréscimo do percentual das células mielóides e um decréscimo no percentual de células linfóides até 8 horas quando se fez uso de fosfolipase A₂. A única alteração significativa, com o uso de lectina C, foi o aumento das células mielóides após 4 horas do envenenamento. Com o uso de veneno total, ocorreu um acréscimo no percentual de células mielóides e na relação M/E nos tempos 2 a 16 horas após o envenenamento e um decréscimo no percentual de células linfóides nos tempos 2 a 8 horas, comparado ao grupo controle.
- O veneno total e frações lectina C e fosfolipase A₂ da serpente *Bothrops neuwiedi* provocaram alterações histológicas no baço, rins, baço e fígado, entretanto não provocaram necrose tubular aguda nos rins.
- As cabenegrinas A-I e A-II em todas as diluições utilizadas (A-I 2,5:1, A-I 5:1, A-II 2,5:1 e A-II 5:1), foram capazes de inibir a plaquetopenia.
- A cabenegrina A-I na diluição 2,5:1 e as cabenegrinas A-II nas diluições 2,5:1 e 5:1 inibiram o aumento do número neutrófilos segmentados, refletindo também no número de neutrófilos totais.
- Na medula, as cabenegrinas A-I e A-II em todas as diluições utilizadas (A-I 2,5:1, A-I 5:1, A-II 2,5:1 e A-II 5:1), foram capazes de inibir a hiperplasia das células mielóides.
- Na análise histológica dos rins, baço, fígado e coração, as cabenegrinas A-I 2,5:1, A-I 5:1, A-II 2,5:1 e A-II 5:1 associadas ao veneno total inibiram as alterações histológicas nestes órgãos.
- As cabenegrinas não conseguiram reverter às alterações quantitativas das células no baço, provocadas pelo veneno total da serpente *Bothrops neuwiedi*.

7 CONCLUSÕES

- As cabenegrinas A-I e A-II em todas as diluições utilizadas (A-I 2,5:1, A-I 5:1, A-II 2,5:1 e A-II 5:1), foram capazes de inibir a plaquetopenia do sangue do plexo retro-orbital, neutralizar a hiperplasia das células mielóides da medula óssea e inibir as alterações histológicas nos rins, baço, fígado e coração dos camundongos *Swiss* inoculados com o veneno total da serpente *B. neuwiedi*.
- A cabenegrina A-I na diluição 2,5:1 e as cabenegrinas A-II nas diluições 2,5:1 e 5:1 inibiram o aumento dos neutrófilos segmentados, refletindo também no número de neutrófilos totais em camundongos *Swiss* envenenados com veneno total da serpente *B. neuwiedi*.
- As cabenegrinas não conseguiram reverter às alterações quantitativas das células do baço, provocadas pelo veneno total da serpente *Bothops neuwiedi* em camundongos *Swiss*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA DE PÉREZ, O.; KOSCINCZUK, P.; NEGRETTE, M.S.; TEIBLER, P.; RUÍZ, R. Efectos del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina sobre músculo y distintos organos de ratones. **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, v.46, p.97-102, 1996.
- AIRD, S.D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v.40, p.335-393, 2002.
- AL-HAZIMI, H.M.G.; ALKHATHLAN, H.Z. Naturally occurring pterocarpanoids and related compounds. **J. King. Saud. Univ.**, v.12, p.93-112, 2000.
- AMARAL, C.F.S.; DA SILVA, O.A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v.23, p.877-885, 1985.
- AMICONI, G.; AMORESANO, A.; BOUMIS, G.; BRANCACCIO, A.; DE CRISTOFARO, R.; DE PASCALIS, A. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v.39, p.10294- 10308, 2000.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v.38, p.775-791, 2000.
- ANGULO, Y.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L.D.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) mummifer* snake venom, a new Lys 49 phospholipase A₂ homologue. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.32, p.63-71, 2000.
- ARAGÃO, A.P.; TOKARNIA, C.H.; GRAÇA, F.A.S.; FRANÇA, T.N.; COELHO, C.D.; CALDAS, S.A.; PEIXOTO, P.V. Envenenamento experimental por *Bothropoides jararaca* e *Bothrops jararacussu* em ovinos: aspectos clínico-patológicos e laboratoriais. **Pesq. Vet. Bras.**, v.30, n.9, p.717-728, 2010.
- ARAÚJO, R.M. **Flavonóides e Floroglucínóis de *Harpalyce brasiliiana*: aspectos químicos, biológicos e espectroscópicos**. 2008. 301f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- ARAÚJO, R.M.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Pterocarpan and a Novel Flavanone from *Harpalyce brasiliiana* Roots. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.20, n.5, p.935-938, 2009.
- AROCAS, V.; ZINGALI, R.B.; GUINLLIN M. C; BOM, C; JANDROT-PERRUS, M. Bothrojaracin: A potent two-site-directed thrombin inhibitor. **Biochemistry**, v.35, n.28, p.9083-9089, 1996.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; ASPERT, M.C.; MANDELBAUM, F.R. Isolations of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v.23, p.691-706, 1985.

ASUZU, I.U.; HARVEY, A.L. The antsnake venom activities of *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) stem bark extract. **Toxicon**, v.42, n.7, p.763-768, 2003.

AUNG-KHIN, M. Histological and ultrastructural changes of the kidney in renal failure after viper envenomation. **Toxicon**, v.16, p.71-75, 1978.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I.R.; BATISTA, I.F.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G.P.; RODRIGUES, V.M.; PERALES, J.; VALENTE, R.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. BnPI, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v.51, n.1, p.54-65, 2008.

BARBOSA, P.S.F.; HAVT, A.; FACÓ P.E.G.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I.S.A.M.; FONTELES, M.C.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.S.; MONTEIRO, H.S.A. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and main myotoxins. **Toxicon**, v.40, p.1427-1435, 2002.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **J.B.M.**, v.65, n.4, p.209-250, 1993.

BARRAVIERA, B.; COELHO, K.Y.R.; CURI, P.R.; MEIRA, D.A. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of São Paulo, Brazil). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.37, n.1 p.63-69, 1995.

BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.1, n.1, p.11-22, 1995.

BELLUOMINI, H.E. Conhecimento sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, v.12, n.45, p.82-96, 1984.

BIONDO, R.; PEREIRA, A.M.S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v.85, n.10, p.1017-1025, 2003.

BJARNASON, J.B.; FOX, W.J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v.26, p.325-372, 1994.

BOFF, G.J. Envenenamento por picada de serpente – gênero *Bothrops*: revisão. **Veterinária em Foco**, v.2, n.2, p.121-135, 2004/2005.

BORGES, C.C.; CAVALCANTI-NETO, A.J.; BOECHAT, A.L.; FRANCISCO, C.H.; ARRUDA, L.F.M.R.; SANTOS, M.C. Eficácia da espécie *Peltodon radicans* (Labiatae, Lameaceae) na neutralização da atividade edematogênica e ineficácia do extrato vegetal Específico Pessoa na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops atrox*. **Rev. Univ. Amazonas**, v.1, p. 97-113, 1996.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, 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. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.**, v.27, n.1, p.21-30, 2000.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; OLIVEIRA, F.; FRANSCHESCHI, 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, n.12, 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. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, p. 617-624, 2003.

BORJA-OLIVEIRA, C.R.; KASSAB, B. H.; SOARES, A.M.; TOYAMA, M.H.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Purification and n-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂, neuwieditoxin-I and neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) venom. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v.13, p.103-121, 2007.

BORTOLETO, R.K.; MURAKAMI, M.T.; WATANABE, L.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussina-I, a fibrinogen – clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.40, p.1307-1312, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde: **Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Fundação Nacional de Saúde, 2.ed, Brasília, 2001.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom acting on hemostasis. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.

BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure Appl. Chem.**, v.71, n.9, p.1663-1672, 1999.

BREYTENBACH, L.C.; LEIPOLDT, J.G.; GERHARDUS, J.H.; RAIL, J.H.; ROUX, D. Absolute configuration and conformation of a (-)-p-teocarpan, (-)-edunol. **South African J. Chem.**, v.36, n.1, p.4-6, 1982.

BUONONATO, M. **Cobras**. Disponível em: <<http://Portal.saofrancisco.com.br/alfa/classe-reptilia/cobras-2.php>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

BURDMANN, E.A.; BARCELLOS, M.A.; CARDOSO, J.L.; MALHEIRO, P.; ABDULKADER, R.C.; DAHER, E. Acute interstitial nephritis after snake bite. **Ren. Fail.**, v.11, p.51-52, 1989.

BÚRIGO, A.C.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, p. 106-111, 1996.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **J. Lipid Res.**, v.50, p.S237-S242, 2009.

CADILLO, E.M.; FERREYRA, C.B.; ZAVALETA, A. Actividad hemolítica de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus* (Serpentes: Viperidae y Elapidae). **Rev. Biol. Trop.**, v.39, n.2, p.311-314, 1991.

CALDAS, S.A.; TOKARNIA, C.H.; FRANÇA, T.N.; BRITO, M.F. GRAÇA, F.A.S. COELHO, C.D.; PEIXOTO, P.V. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento experimental por *Bothrops alternatus* em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.6, p.303-312, 2008.

CAMEY, K.U.; VELARDE, D.T.; SANCHEZ, E.F. Characterization and neutralization of the venoms used in production of botropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v.340, n.5, p.501-509, 2002.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S; WEN, F. H.; MALAQUE, S. A.; HADDAD, V. J. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica**. São Paulo: Sarvier, 2003, 468p.

CASTRO, H.C; DUTRA, D.L.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B. Bothraltemin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v.36 n.12, p.1903-1912, 1998.

CASTRO, H.C.; LEMOS, M.G.; BOM, C.; ZINGALI, R.B. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. **Toxicon**, v.41, p.525-5288, 2003.

CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; ALBUQUERQUE, M.G.; PUJOL-LUZ, M. RODRIGUES, C.R. Snake thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.6, n.7/8, p.843-856, 2004.

CASTRO, I.; BURDMANN, E.A.; SEGURO, A.C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon**, v.43, p.833-839, 2004.

CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O Mundo da Saúde**, v.30, n.4, p.644-653, 2006.

CASTRO, R.C.; LANDUCCI, E.C.T.; TOYAMA, M.H.; GIGLO, J.R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v.38, p.1773-1785, 2000.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado (SESA). Comissão Estadual de Controle de Zoonoses. **Zoonoses no Ceará um desafio a vencer**. [Fortaleza], 1991.

CESTA, M.F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. **Toxicol. Pathology**, v.34, p.455-465, 2006.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GUERRA, C.F.P.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v.41, p.667-678, 2003.

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon**, v.27, n.10, p.1085-1093, 1989.

CHIOATO, L.; WARD, R.J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v.42, p.869-883, 2003.

CHIPPAUX, J.P. Snakes-bites appraisal of the global situation. **Bull. WHO.**, v.76, p.515-524, 1998.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy, **Toxicon**, v.36, n.6, p.823-46, 1998.

COGO, J.C.; PRADO-FRANCISCHETTI, J.; GIGLIO, J.R.; CORRADO, A.P.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; DONATO, J.L.; LEITE, G.B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. **Toxicon**, v.36, n.10, p.1323-1332, 1998.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). **Princípios Éticos na Experimentação Animal** (1991). Disponível em:<http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>. Acesso em: março 2010.

CORRÊA JR, M.C.; MARIA, D.A.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; PIZZOCARO, K.F.; RUIZ, I.R. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v.40, n.6, p.739-48, 2002.

COSTA, H.C. **Galeria de CCostah**. Disponível em:
<<http://www.flickr.com/photos/45718694@N06/page3/>>. Acesso em: 28 jan. 2011.

COSTA, P.I.; DE LIMA, E.G.; LAURE, C.J. Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v.39, p.359-373, 1989.

COSTA, H.N.R.; SANTOS, M.C.; ALCÂNTARA, A.F.C.; SILVA, M.C.; FRANÇA, R.C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (Lamiaceae). **Quim. Nova**, v.31, n.4, p.744-750, 2008

DA SILVA, N.J.; AIRD, S.D.; SEEBERT, C.; KAISER L.L. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). **Toxicon**, v.27, p.763-771, 1989.

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

DIAZ, C.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; ROJAS, N.; SCHROIT, A.J.; GUTIÉRREZ, J.M. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic

phospholipases A₂: role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. **Arch. Biochem. Biophysics**, v.391, n.1, p.56-64, 2001.

DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, K.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; AGUIAR, F.B.; TOSCANO, M.G.; RIBEIRO, E.A.N. Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos *Swiss* e ratos *Wistar*. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde**, v.10, n.2, p.171-176, 2006.

DRICKAMER, K. Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. **Prog. Nucl. Acid Res.**, v.45, p.207-232, 1993.

DRICKAMER, K. C-type lectin like domains. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.9, p.585-590, 1999.

DUFTON, M.J.; HIDER, R.C. Classification of phospholipases A₂ according to sequence evolutionary and pharmacological implications. **Eur. J. Biochem.**, v.137, p.545-551, 1983.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.; GUTIÉRREZ, J.M. *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by α_2 -macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. **Toxicon**, v.43, p.213-217, 2004.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET JR, 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* (serpents: Viperidae). **Zool. J. of the Linnean Society**. v. 156, p.617-640, 2009.

FERREIRA JR, R.S.; BARRAVIERA, B. Management of venomous snakebites in dogs and cats in Brazil. **J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.10, n.2, p.112 – 132, 2004.

FLORIANO, S.; NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M. LAPOSY, C.B.; MOTA, Y.P.; SANGIORGIO, F.; DAVID, H.C.; NABAS, J.M. Effect of *Mikania glomerata* (Asteraceae) leaf extract combined with anti-venom serum on experimental *Crotalus durissus* (Squamata: Viperidae) envenomation in rats. **Rev. Biol. Trop.**, v. 57, n. 4, p.929-937, 2009.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v.275, n.12, p.3016-3030, 2008.

FRANCESCHI, J.P. Systemic activities of bothropic venoms. **Mem. Inst. Butantan**, n.52, p.41-42, 1990.

FREEDMAN, M.L.; KARPATKIN, S. Heterogeneity of rabbit platelets. Preferential splenic sequestration of megathrombocytes. **British J. of Hematol.**, v.31, p.255-262, 1975.

FREITAS, S.H.; EVÊNCIO NETO, J.; DÓRIA, G.S.; MENDONÇA, F.S.; SIMÕES, J.; CAMARGO, L.M. SÉBE, A.A. Aspectos macroscópicos, morfológicos e morfométricos do baço de ratos após o clampeamento total do pedículo hepático. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.10, n. 4, p.1216-1224, 2009.

FRY, B.G.; WINKEL, K.D.; WICKRAMARATNA, J.C.; HODGSON, W.C.; WÜSTER, W. Effectiveness snake antivenom: species and regional venom variation and its clinical impact. **J.Toxicol.**, v.22, p.23-24, 2003.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology**, v. 125, p. 281-288, 2008.

GAMBERO, A.; LANDUCCI, E.C.T.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; GIGLIO, J.R.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; DE NUCCI, G. ANTUNES, E. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipase A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. **Biochem. Pharmacol.**, v.63, p.65-72, 2002.

GARCIA, P.B. **Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilização celular e da hematopoese.** 1992, 2v. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

GARTNER, T.K.; STOKER, K.; WILLIAMS, D.C. Tromblectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Letters**, v.117, p.13-16, 1980.

GLASER, K.B.; MOBILIO, D.; CRESPO, M.S.; NIETO, M.L. Secretory phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. **Trends Pharmac. Sci.**, v.14, p.92-98, 1993.

GRAÇA F.A.S.; PEIXOTO, P.V.; COELHO, C.D.; CALDAS. S.A. TOKARNIA, C.H. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crotálico experimental em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n.6, p.261-270, 2008.

GONÇALVES, L.R.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators Inflamm.**, v.9, p.101-107, 2000.

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

GUTIÉRREZ, J.M. Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. **Rev. Biol. Trop.**, v.50, p.377-394, 2002.

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, 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, p.80-92, 2008.

GUTIÉRREZ, J.M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v.30, p.1-12, 2009.

HAAD, J.S. Accidentes humanos por las serpientes de los gêneros *Bothrops* e *Lachesis*. **Mem. Inst. Butantan.** v.44/45, p.403-423, 1981.

HAVSTEEN, B. Flavonoids a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.** v.32, n.7, p.1141-1148, 1983.

HAVT, A.; TOYAMA, M.H.; DO NASCIMENTO, N.R.; TOYAMA, D.O.; NOBRE, A.C.; MARTINS, A.M.; BARBOSA, P.S.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.37, n.1, p.130-41, 2005.

HAWGOOD, B.J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v.30, p.573-579, 1992.

HAWGOOD, B.J. Doctor Albert Calmette 1863 – 1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. **Toxicon**, v.37, p.1241-1258, 1999.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothroptoxin. **Toxicon**, v.26, p.615-627, 1988.

IUAN, F.C.; THOMAZINI, I.A.; CARVALHO, I.; CARREIRA, D.M.G.; CASSINELLI, V.J.; PEREIRA, P.C.M.; BARRAVIERA, B. Evaluation of platelet number and function and fibrinogen level in patients bitten by snakes of the *Bothrops* genus. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.28, n.1, p.19-24, 1995.

IZIDORO, L.F.M.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES, R.S.; FERRO, E.V.; HAMAGUCHI, A.; J.R. 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). **Biochimie**, v.85, n.669-675, 2003.

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

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev Assoc. Med. Brasil**, v.36, n.2, p.66-77, 1990.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A.; O'CONNELL, J.L. Prognostic factors for amputation in the case of envenoming by snakes of the *Bothrops* genus (Viperidae). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.93, n.4, p.401-408, 1999.

JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; HO, P.L. Survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pit viper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v. 299, p. 279-29, 2002.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.278, p.319-325, 1990.

KAMIGUTTI, A.S.; HAY, C.R.; THEAKSTON, R.D.; DESMOND, H.; HUTTON, R.A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 29, n.9, p.1097-1105, 1991.

KAMIGUTTI, A.S. HAY, C.R.; THEAKSTON, R.D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake veno metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, n.6, p.627-642, 1996.

KAMIGUTTI, 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. **Biochem. J.**, v.320, p.635-641, 1996.

KAMIGUTTI, A.S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, p.1041-1049, 2005.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 25-29, 2003.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Brit. Jour. Anest.** v.74, p.319-327, 1995.

KASSAB, B.H.; DE CARVALHO, D.D.; OLIVEIRA, M.A.; BAPTISTA, G.R.; PEREIRA, G.A.; NOVELLO, J.C. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. **Protein Expr. Purif.**, v.35, n.2, p.344-352, 2004.

KINI, R.M.; EVANS H.J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v.28, n.12, p.1387-1422, 1990.

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

KOSCINCZUK, P.; PÉREZ, O.A.; MAIDANA, H.R. Evolución y tratamiento del accidente ofídico por *Bothrops yarara* en caninos. **Rev. Med. Vet.**, v.76, n.5, p.310-318, 1995.

KOSCINCZUK, P.; BORDA, J.T.; MARUNAK, S.; ACOSTA DE PEREZ, O.; COPPO, N.N. Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. **Medicina (Buenos Aires)**, v.64, p.320-324, 2004.

KOSCINCZUK, P.; ORTEGA, H.; DAILLARD, B.; MUSSART, N.B. Valoración bioquímica, histopatológica e inmunohistoquímica del daño renal causado por veneno de *Bothrops neuwiedii* en ratas. **Rev. Med. Vet.**, v.18, n.1, p.14-19, 2007.

KUTER, D.J.; GMINSKI, D.; ROSENBERG, R.D. Botrocetin agglutination of rat megakaryocytes: a rapid method for megakaryocyte isolation. **Exp. Hematol.**, v.20, n.9, p.1085-1089, 1992.

LAGO, L.A.; MELO, M.M.; FERREIRA, P.M.; FACURY FILHO, E.J. Alterações hematológicas em bovinos submetidos ao envenenamento crotálico. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.1, n.1, p.7-13, 2001

- LALLO, D.G., THEAKSTON, R.D.G. Snake Antivenoms. **Journal of Toxicology**, v.41, n.3, p.277-290, 2003.
- LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; PEREIRA M.F.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.**, v.343, p.257-263, 1998.
- LEE, W.H.; DU, X.Y.; LU, Q.M.; CLEMETSON, K.J.; ZHANG, Y.; Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. **J. Thromb. Haemost.**, v.20, p.585-591, 2003.
- LEÓN, G.; SEGURA, A.; HERRERA, M.; OTERO R.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; WEN, F. H.; MEDEIROS, C. R.; PRADO, J.C.L.; MALAQUE, C.M.S.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Human heterophilic antibodies against equine immunoglobulins: assessment of their role in the early adverse reactions to antivenom administration. **Royal Society of Trop. Med. Hyg.**, v.102, n.11, p.1115-1119, 2008.
- LEMOS, M.S.; OLIVEIRA, F. Efeitos hematopoiéticos induzidos em camundongos pela peçonha bruta e uma miotoxina isolada da serpente *Bothrops moojeni*. In: IX ENCONTRO INTERNO & XIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2004, Uberlândia. **Anais do IX Encontro Interno & XIII Seminário de Iniciação Científica**, Universidade Federal de Uberlândia: Editora UFU, 2009. p.1-10.
- LIRA-DA-SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; BRAZIL, T.K.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; CARVALHO, F.M. Morbimortalidade por ofidismo no Nordeste do Brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, n.1, p.21-25, 2009.
- LOBO, T.; PEREAÑEZ, J.A.; ZAPATA, K.; GUTIÉRREZ, P.A.; LONDOÑO, M.; NUÑEZ, V.; ROJANO, B. Actividad inhibitoria de *Murraya paniculata* contra fosfolipasas A₂ miotóxicas. **Rev. Fac. Quím. Farmacéutica**, v.17, n.3, p.291-298, 2010.
- LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; RAMÍREZ, G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon**, v.28, n.1, p.75-81, 1990.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom analysis of edema formation, inflammatory cell and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v.17, p.93-105, 1993.
- 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, p.885-901, 2003.
- LOVERA, A.; BONILLA, C.; HIDALGO, J. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *Dracontium lorentense* (*Jergón sachá*) sobre la actividad letal del veneno de *Bothrops atrox*. **Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública**, v.23 n.3, p.177-181, 2006.
- MAGALHÃES, A.; FERREIRA, R.N.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; YARLEQUE, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; BLOCH, C.; SANCHEZ, E. F. Coagulant thrombin-like

enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snake. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.136, p.255-266, 2003.

MAGRO, A.J.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M. Crystal structures of BnPs-7 and BnSP-6, two lys-49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.311, p.713-720, 2003.

MAHANTA, M.; A. K. MUKHERJEE. Neutralisation of lethality, myotoxicity and toxic enzymes of *Naja kaouthia* venom by *Mimosa pudica* root extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v.75, n.1, p.55-60, 2000.

MANDELBAUM, F.R. Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan**, v.52, p.35-36, 1990.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LCHAT, J.J.; DE ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, n.5, p.615- 626, 1995.

MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R.R.; MARCINKIEWICZ, M.M.; DANIEL, J.L.; SMITH, J.B.; DANGELMAIER, C.; WEINREB, P.H.; BEACHAM, D.A.; NIEWIAROWSKI, S. Isolation and characterization of EMS16, a C-lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alpha2beta1 integrin. **Biochemistry**, v.39, p.9859-9867, 2000.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; RUEDA, A.Q.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; STABELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.7, p.743-756, 2007.

MARIA, D.A.; VASSÃO, R.C.; RUIZ, I.R. Haematopoietic effects induced in mice by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 42, n.6, p.579-85, 2003.

MARIANI, M.; PANINA-BORDIGNON, P. Analysis of homing receptor expression on infiltrating leukocytes in disease states. **J. Immunol. Methods**, v.273, p.103-114, 2003.

MARKLAND JR, F.S. Inventory of α -and β -fibrinogenases from snake venoms. **Thromb. Haemost.**, v.65, p.438-443, 1991.

MARKLAND JR, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, p.1749-1800, 1998.

MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon**, v.30, p.1131-1142, 1992.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y. TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **B.B.A.**, v.1477, p.146-156, 2000.

MEBS, D. Toxicity in animals: trends in evolution? **Toxicon**, v.39, p.87-96, 2001.

- MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P.G.P.; LAGO, L.A.; VERÇOSA JÚNIOR, D. HABERMEHL, G.G. Envenenamento botrópico. **Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG**, n.44, p.59-79, 2004.
- MELO, P.A.; 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.
- MENDES, M.M.; VALE, L.H.F.; OLIVEIRA, C.F.; LOPES, D.S.; ALCÂNTARA, T.M.; IZIDORO, L.F.M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Anti-Snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (caesalpinioideae) aqueous leaves extract. **Phytother. Res.**, v.22, p.859-866, 2008.
- MILITÃO, G.C.G.; PINHEIRO, S.M.; DANTAS, I.N.F.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Bioassay-guided fractionation of pterocarpanes from roots. **Bioorg. Med. Chem.**, v.15, p.6687-6691, 2007.
- MISE, Y.F.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; CASAIS-E-SILVA, L.L. Ação protetora da *Calendula officinalis* (Asteraceae; Compositae) sobre a atividade miotóxica do veneno de *Bothrops leucurus* (serpentes; viperidae). **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, p.50-55, 2009.
- MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLAPUCI, S.R.; OKWUTE, S.K. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **J. Nat. Prods.**, v.50, p.1025-1040, 1987.
- MOHAMED, A.H.; FOUAD, S.; EL AASAR, S.; SALEM, A.M.; ABDEL-AAL, A.; HASSAN, A.A.; ZAHRAN, F.; ABBAS, N. Effects of several snake venoms on serum and tissue transaminases, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase. **Toxicon**, v.19, n.5, p.605-609, 1981.
- MONTEIRO, R.Q.; FOGUEL, D.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B. Subunit dissociation unfolding and inactivation of bothrojaracin, a C-type lectin-like protein from snake venom. **Biochemistry**, v.42, n.2, p.509-515, 2003.
- MORA, R.; VALVERDE, B.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v.45, p.651-660, 2005.
- MORS, W.B.; DO NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P.; DA SILVA, M.H.; MELO, P.A.; SUAREZ-KURTZ G. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of the plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). **Toxicon**, v.27, p.1003-1009, 1989.
- 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.627-42, 2000.
- MOUNIER, C.; VARGAFTIG, B.B.; FRANKEN, P.A.; VERHEREIJ, H.M.; BOM, C.; TOUQUI, L. Platelet secretory phospholipase A₂ fails to induce rabbit platelet activation and to release arachidonic acid in contrast with venom phospholipase A₂. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1214, p.88-96, 1994.

NAKAGAWA, M.K.; 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.

NISENBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J.C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, v.24, n.3, p.259-72, 1986.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, M.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v.33, p.1843-1849, 1994.

NISHIJIMA, C.M.; RODRIGUES, C.M.; SILVA, M.A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILIGAS, W.; LIMA, C.A.H. Anti-hemorrhagic activity of four brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**, v.14, p.1072-1080, 2009.

NOGUEIRA, R.M.B; SAKATE, M. Clinical and hematological alterations in dogs during experimental envenomation with *Crotalus durissus Terrificus* venom and treated with antihidic serum. **J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v.12. n.2, p.285-296, 2006.

NOGUEIRA, R.M.B; SAKATE, M. SANGIORGIO, F.; LAPOSY, C. B.; MELERO, M. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antihidic serum - part I: clinical evaluation, hematology and myelogram. **J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v.13, n.4, p.800-810, 2007.

NAPATHORN, S.; TEJACHOKVIWAT, M.; MANEESRI, S.; KASANTIKUL, V. Effects of Russell's viper venom on human erythrocytes *in vitro*. **J. Natl. Toxins**, v.7, n.1, p.73-85, 1998.

OGILVIE, M.L.; BYL, J.W.; GARTNER, T.K. Platelet aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. **J. Thromb. Haemost.**, v.62, p.704-707, 1989.

OLIVEIRA, A.L.; PINTO, J.L.F.; FONSECA, A.L.A.; CAPUTTO, L.Z.; FONSECA, F.L.A. Avaliação epidemiológica e laboratorial de pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Miracatu (Vale do Ribeira, São Paulo). **Rev. Patol. Trop.** v.37 n.3, p. 268-274, 2008.

OLIVEIRA, L.P.C.; SAKATE, M.; MADRUGA, R. A.; BARBOSA, N. P.U. Biochemical and hematological study of goats envenomed with natural and ⁶⁰Co- irradiated venom. **J. Venom Anim.Toxins Incl. Trop. Dis.**, v.13 n.3, p. 576-597, 2007.

OLIVEIRA, N.J.F.; RIBEIRO, E.L.; LÚCIA, M.; MELO, M.M. Perfil hematológico de bovinos experimentalmente inoculados com veneno de *Bothrops alternatus*. **Rev. Bras. Ci. Vet.**, v.17, n.1, p.38-45, 2010.

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-1, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw (Guaçatonga). **J. Venom Toxins Incl. Trop. Dis.** v.11, n.4, p.465-478, 2005.

OWNBY, C.L.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v.37, p.411-445, 1999.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys40 and Asp49 mitotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: syntetic Lys49 myotoxin II- (115-129) peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, v.253, p.452-461, 1998.

PETRESKI, J.H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C.P.; ALVES, E.W.; KIPNIS, T.L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.33, n.11, p.1293-1300, 2000.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.47, n.1, p.24 -29, 2001.

PINHO, F.M.O.; OLIVEIRA, E.S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.50, n.1, p.93-96, 2004.

PINTÃO, M.C.T; FRANCO, R.F. Coagulação intravascular disseminada. **Medicina**, v.34, p.282-291, 2001.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **J. Thromb. Haemost.**, v.79, p.675-683, 1998.

RAPOSO, J.B.; MÉNDEZ, M.C.; BAIALARDI, C.E.G.; RAFFI, M.B. Acidente ofídico em equino no sul do Brasil – relato de caso. **Revista da FZVA**, v.7/8, n.1, p.51-57. 2000/2001.

REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Proteolytic specificity of moojeni protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon**, v.33, n.2, p.187-194, 1993.

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

REYES-CHILPA, R., F.; ESTRADA, M.J. Química de las plantas alexiteras. **Interciencia**, v.20, n.5, p.257-263, 1995.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, v.32, n.6, p.436-442, 1990.

RIBEIRO, L.A.; MIGUEL, T.J.; LEBRÃO, M.L. Prognostic factors for local necrosis in *Bothrops jararaca* (Brazilian pit viper) bites. **Trans. Royal Society Trop. Med. Hyg.**, v.95, p.630-634, 2001.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B; PEREIRA, N.A. Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas de animais, especialmente veneno de cobra. **Rev. Bras. Farm.**, v.69, n.4, p.82-86, 1988.

- ROCHA, S.L.G.; FRUTUOSO, V.S.; DOMONT, G.B.; MARTINS, M.A.; *jararaca* venom by an antibothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon**, v.38 p.875-880, 2000.
- RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom **Arch. Biochem. Biophys.**, v.15. n.2, p.213-24, 2000.
- RODRIGUES, V.M.; IZIDORO, L.F.M.; RODRIGUES, R.S.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Hemostatic system alterations induced by neuwiedase: a metalloproteinase isolated from snake venom *Bothrops neuwiedi*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.9, n.2, p.357-588, 2003.
- ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; SEGRE, L. Fisiopatología y diagnóstico del ataque por serpientes venenosas: una breve actualización. **Rev. Med. Vet.**, v.77, p.64-71, 1996.
- ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; HAJOS, S.E.; FERNANDEZ, T.; SEGRE, L. Capacidad neutralizante de los sueros antiofidicos frente al veneno de *Bothrops moojeni* (Caisaca, Lanzadera). **Medicina**, v.57, n.6, p.667-676, 1997.
- ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; DOKMETIAN, J.C.H.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J.C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venom. **Toxicon**, v. 38, n.6, p.865-873, 2000.
- ROJAS, C.A.; GONÇALVES, M.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Epidemiology of snake in the northwestern region of the state of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.3, p.193-204, 2007.
- ROSING, J.; GOVERS-RIEMSLAG, J.W.; YUKELSON, L.; TANS, G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. **Haemostasis**, v.31, p.241-246, 2001.
- RUCAVADO, A.; SOTO, M.; ESCALANTE, T.; LORÍA, G.D.; ARNI, R.; GUTIÉRREZ, J.M. Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. **Thromb. Haemost.**, v.94, n.1, p.123-31, 2005.
- RUIZ, C.E.; SCHAEFFER, R.C.; JR WEIL, M.H.; CARLSON, R.W. Hemostatic Changes following Rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*) venom in the dog. **J. Pharm. Exp. Therapeutics**, v. 213, n.2, p.414-417, 1980.
- RUIZ DE TORRENT, R; ACOSTA DE PÉREZ, O; TEIBLERT, P; MARUÑAK, S; KOSCINCZUK, P; SÁNCHEZ NEGRETTE, M. Toxic and enzymatic activities of the *Bothrops moojeni* venom from Argentina. **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, v.49, n.3, p.177-183, 1999.
- RUPPELT, B.M.; PEREIRA, E.F.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom I: analgesic and antiinflammatory activities. **Mem. Inst. Butantan**, v.86, n.2, p.203-206, 1991.

SALEM, M.M.; WERBOVETZ, K.A. Isoflavonoids and other compounds from *Psoralea argyrea* with antiprotozoal activities. **J. Nat. Prod.**, v.69, p.43-49, 2006.

SALVINI, T.F.; AMARAL, A.C.; MIYABARA, E.H.; TURRI, J.A.O.; DANELLA, P.M.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v.39, p.1141-1149, 2001.

SANO MARTINS I.S. Hematological disturbances induced by *Bothrops* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v.52, p.39-40, 1990.

SANO-MARTINS, I. S.; SANTORO, M. L.; MORENA, P.; SOUZA-e-SILVA, M.C.C.; TOMY, S.C.; ANTONIO, L.C.; NISHIKAWA, A.K.; GONÇALVES, I.L.C.; LARSSON, M.H.A.; HAGIWARA, M.K.; KAMIGUTTI, A.S. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.303-312, 1995.

SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M. L.; CASTRO, S.C.B.; FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C.; THEAKSTON, D.G. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. **Thromb. Res.**, v.87, n.2, p.183-195, 1997.

SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. **Thromb Haemost.** v.92, n.2, p.369-83, 2004.

SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S.; FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v.51, p.1440-1448, 2008.

SANTOS, M.M.B.; MELO, M.M.; JACOME, D.O.; FERREIRA, K.M.; SABAINI, R.M. Hemograma de cães envenenados experimentalmente com *Bothrops alternatus* após diferentes tratamentos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.4, n.1, p.1-11, 2003

SEGEV, G.; SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; HARRUS, S.; KASS, P.; AROCH, I. *Vipera palaestinae* envenomation in 327 dogs: a retrospective cohort study and analysis of risk factors for mortality. **Toxicon**, v.43, n.6, p.691-699, 2004.

SELVAM, C.; JACHAK, S.M.; OLI, R.G.; THILAGAVATHI, R.; CHAKRABORTI, A.K.; BHUTANI, K.K. A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from *Indigofera aspalathoides*: structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking. **Tetrahedron Lett.**, v.45, p.4311-4314, 2004.

SERRANO, S.M.T.; FOX, J.W. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, n.45, v.8, p. 969-985, 2005.

SERRANO, S.M.T.; MAROUN, R.C. Snake venom serineproteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, p.1115-1132, 2005.

SERRANO, S.M.T.; SAMPAIO, C.A.M.; MANDELBAUM, F.R. Basic proteinase from *Bothrops moojeni* (Caissaca) Venom- II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP1 and MSP2. **Toxicon**, v.31, n.4, p.483-492, 1993.

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

SILVA, J. O.; FERNANDES, R. S.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, C. Z.; MAZZI, M. V.; RANCO, 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, p.283-291, 2007.

SILVA, V.X. **Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)**. São Paulo, 2000. v.1 e 2. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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.

SILVEIRA, A.M.V.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R.; OLIVEIRA, E.B. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. **Int. J. Biochem.**, v.21, p.863-872, 1989.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. **Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico**. Fortaleza: Expressão gráfica, 2005, 213p.

SINGH, R.S.; TIWARY, A.K.; KENNEDY, J.F. Lectins: source, activities and applications. **Crit. Rev. Biochem.**, v.19, p.145-178, 1999.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). **Acidentes por animais peçonhentos**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso: março de 2011.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1488, n.1-2, p.1-19, 2000.

SMITH, T. A.; FIGGE, H.L. Treatment of snakebite poisoning. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v.48, n.10, p.2190-2196, 1991.

SMOLKA, M.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v.36, n.7, p.1059-1063, 1998.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.373, p.7-15, 2000.

SOARES, A.M.; JANUÁRIO, A.H.; PEREIRA, A.M.S.; LOURENÇO, M.V.; PEREIRA, P.S. Neutralizing Effects of Snake Venoms Exhibited by Brazilian Plants. REVIEW. **Drugs of the Future**, v.29, n.11, p.1105-1117, 2004.

SOARES, A.M.; TICLI, F.K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; AMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Med. Chem.**, v.12, p.2625-2641, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA (SBH 2005). **Lista de espécie de répteis do Brasil**. Disponível em: <<http://www2.Sbherpetologia.org.br/checklist/répteis.htm>>, Acesso em: 02 out. 2010.

SOERENSEN, B.; NETO, L.Z.; OLIVEIRA, A.M.; SANTOS, R.V.; MESSIAS, C.V. Aspecto clínico e laboratorial do envenenamento botrópico e crotálico em bovinos. **Unimar Ciênc.**, v.4, p.28-33, 1995.

STRUCHINER, C.J.; BOCHNER, R. Recording of venomous bites and stings by National Information Systems in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n.3, p.735-146, 2002.

SUTTIE, A.W. Histopathology of the Spleen. **Toxicol. Pathology**, v.34, p.466-503, 2006.

TAKAHIRA, R. Hemostatic, hematological and biochemical changes in dogs induced by experimental envenomation by *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) and *Bothrops neuwiedi* Wagler, 1824. **J. Venom Anim. Toxins**, v.8, p.85-85, 1998.

TANIGAWA, M.; MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; SHIMAYA, K.; ANAI, K.; MIHARA, H. Clearance and distribution of a haemorrhagic factor purified from *Bothrops jararaca* venom in mice. **Toxicon**, v.32, p.583-593, 1994.

TARASIUK, A.; SOFER, S. Effects of adrenergic-receptor blockade and ligation of spleen vessels on the hemodynamics of dogs injected with scorpion venom. **Critical Care Med.**, v.25, p.365-372, 1999.

TEIXEIRA, C.F.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, 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, p.449-459, 2003.

TEIXEIRA, C.F.; CHAVES, F.; ZAMUNER, R.S.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FERNANDES, I.; GUTIÉRREZ, J.M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.86, p.107-115, 2005.

TENG, C.M.; KO, F.N. Comparison of the platelet aggregation induced by three trombin-like enzymes of snake venoms and thrombin. **J. Thromb. Haemost.**, v.59, p.304-309, 1988.

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.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil; **Pesq. Vet. Bras.**, v.26, n.2, p.55-68, 2006.

TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M., MARAGONI, S.; AMARAL M.E.C.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A.C. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collineatus* venom. **J. Protein Chem.**, v.20, p.662-671, 2001.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? **Biochimie**, v.82, p.815-831, 2000.

VARKI, A. Sialic acid as ligands in recognition phenomena. **FASEB J.**, v.4, p.248-255, 1997.

VERONESE, E.L.G.; L.E. ESMERALDINO, A.P.F.; TROMBONE, A.E.; SANTANA, G.H.; BECHARA, I.; KETTELHUT, A.C.O.; CINTRA, J.R.; GIGLIO, S.V.; SAMPAIO. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A.D.C. (Apocynaceae). **Phytomedicine: Internat. J. Phytoth & Phytoph.**, v.12, p.112-123, 2005.

WEINSTEIN, S.A.; KARDONG, K.V. Properties of Duvernoy's secretion from *opisthoglyphous* and *aglyphous* colubrid snake. **Toxicon**, v.32, p.1161-1185, 1994.

WEISS, J.; WRIGTH, G.; BECKER, A.C.A.P.A.; VAN DER BERGH, C.J.; VERHEIJ, H.M. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* treated with the bactericidal/permeability-increasing protein. **J. Biol. Chem.**, v.266, p.4162-4167, 1991.

WEISS, D.J. Leukocyte response to toxic injury. **Toxicol. Pathol.**, v.21, n.2, p.135-140, 1993.

WINKLER, I. G.; LÉVESQUE, J. P.; Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. **Exp. Hematol.**, v. 34, p. 996-1009, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Progress and Characterization of Venom and Standardization of Antivenoms**. Offset Publication n.58, p.1-4, Geneva, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality control methods for medicinal plants materials**. Library Cataloguing in Publication p.115, Geneva, 1998.

WU, W.; GUAN, X., KUANG, P.; JIANG, S.; YANG, J.; SUI, N.; CHEN, A.; KUANG, P.; ZHANG, X. Effect of batroxobin on expression of neural cell adhesion molecule in temporal infarction rats and spatial learning and memory disorder. **J. Tradit. Chin. Med.**, v.21, p.294-298, 2001.

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***

jararacacussu em ratos. Fortaleza, 2009. 125f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

YAMAMOTO, C.; TSURU, D.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M.; HATTORI, S.; KIM, S.T. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology**, v.107, p.111-117, 2002.

YARLEQUÉ, A. Investigación en venenos de serpientes. **Alma Máter UNMSM**, v.2, p.61-77, 1992.

YOUNG, B.A.; KARDONG, K.V. Dentitional surface features in snake (reptilia, serpentes). **Amphibia-Reptilia**, v.17, p.261-276, 1996.

ZAMUNER, S.R.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMION. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v.44, p.259-271, 2004.

ZENI, A.L.B.; BECKER, A.; KRUG, M.; ALBUQUERQUE, C.A.C. Histological and biochemical effects induced by sublethal DOSES OF *Bothrops jararacussu* venom in mice. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.13, n.3, p.664- 676, 2007.

ZINGALI, R.B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v.32, p.10794-10802, 1993.

APÊNDICES

Tabela 1 – Alterações histopatológicas provocadas pela fração fosfolipase A₂ de *Bothrops neuwiedi* no coração de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	25	25	25
Edema	25	-	-
Hemorragia	50	25	25
Congestão	75	100	50

Tabela 2 – Alterações histopatológicas provocadas pela fração lectina de *Bothrops neuwiedi* no coração de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	25	25	25
Edema	25	-	25
Hemorragia	50	25	25
Congestão	75	75	50

Tabela 3 – Alterações histopatológicas provocadas pelo veneno total de *Bothrops neuwiedi* no coração de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	25	-	25
Edema	-	-	25
Hemorragia	25	25	
Congestão	75	100	100

Tabela 4 – Alterações histopatológicas provocadas pela fração fosfolipase A₂ de *Bothrops neuwiedi* nos baços de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Hiperplasia da Polpa Branca	75	75	75
Hiperplasia da Polpa Vermelha	50	75	75
Congestão	100	50	50
Pigmentação hemossiderina	25	25	25
Hemorragia	25	50	50
<i>Edema</i>	-	25	25

Tabela 5 – Alterações histopatológicas provocadas pela fração lectina de *Bothrops neuwiedi* nos baços de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Hiperplasia da Polpa Branca	75	75	25
Hiperplasia da Polpa Vermelha	50	75	75
Congestão	25	50	50
Pigmentação hemossiderina	25	-	25
Hemorragia	25	50	25
<i>Edema</i>	-	25	25

Tabela 6 – Alterações histopatológicas provocadas pelo veneno total de *Bothrops neuwiedi* nos baços de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Hiperplasia da Polpa Branca	25	100	50
Hiperplasia da Polpa Vermelha	50	75	100
Congestão	50	50	50
Pigmentação hemossiderina	25	25	25
Hemorragia	25	-	25
<i>Edema</i>	-	25	25
Processo inflamatório	-	25	25

Tabela 7 – Alterações histopatológicas provocadas pela fração fosfolipase A₂ de *Bothrops neuwiedi* nos rins de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	50	25	25
Processo inflamatório	50	-	25
Congestão	100	100	75
Hemorragia	25	25	-
Edema	25	25	-

Tabela 8– Alterações histopatológicas provocadas pela fração lectina de *Bothrops neuwiedi* nos rins de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	50	25	25
Processo inflamatório	50	-	25
Congestão	100	75	75
Hemorragia	25	25	-
Edema	-	25	25

Tabela 9 – Alterações histopatológicas provocadas pelo veneno total de *Bothrops neuwiedi* nos rins de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	75	50	100
Processo inflamatório	25	25	-
Congestão	100	100	100
Hemorragia	25	25	25
Edema	25	25	25

Tabela 10 – Alterações histopatológicas provocadas pela fração fosfolipase A₂ de *Bothrops neuwiedi* nos fígados de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	50	100	100
Processo inflamatório	-	25	-
Edema	25	25	25
Hemorragia	-	25	-
Congestão	100	75	100

Tabela 11 – Alterações histopatológicas provocadas pela fração lectina de *Bothrops neuwiedi* nos fígados de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	50	75	100
Processo inflamatório	-	25	-
Edema	25	25	25
Hemorragia	-	-	-
Congestão	75	100	75

Tabela 12 – Alterações histopatológicas provocadas pelo veneno total de *Bothrops neuwiedi* nos fígados de camundongos *Swiss* (n=4)

Alterações histopatológicas	Tempo		
	2 horas	4 horas	24 horas
	% de animais afetados		
Degeneração Hidrópica	50	50	75
Processo inflamatório	25	-	-
Edema	25	50	25
Hemorragia	-	25	-
Congestão	75	75	100

ANEXO



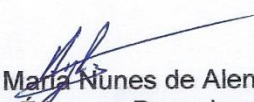
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº32/10, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS HEMOTOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS INDUZIDOS PELO VENENO BRUTO DA SERPENTE *BOTHROPS NEUWIEDI* EM CAMUNDONGOS *SWISS* E ESTUDO DA ATIVIDADE DAS CABENEGRINAS A-I E A-II FRENTE A ESTAS ALTERAÇÕES.”** de responsabilidade de Alcínia Braga de Lima Arruda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 09 de setembro de 2010.

Fortaleza, 23 de setembro de 2010.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA