

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

IÊDA PEREIRA DE SOUZA

**Alterações hematológicas e funcionais causadas por
venenos de subespécies brasileiras de *Crotalus durissus*
e suas frações isoladas**

**FORTALEZA
2006**

IÊDA PEREIRA DE SOUZA

**Alterações hematológicas e funcionais causadas por
venenos de subespécies brasileiras de *Crotalus durissus*
e suas frações isoladas**

Tese submetida à Coordenação de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito para a obtenção do
grau de Doutora em Farmacologia.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Primavera Borelli

FORTALEZA

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

S715a Souza, Iêda Pereira de
Alterações hematológicas e funcionais causadas por
venenos de subespécies brasileiras de *Crotalus durissus*
e suas frações isoladas / Ieda Pereira de Souza.
- Fortaleza, 2006.
156f.: il.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro
Tese (Doutorado). Universidade federal do Ceará.
Faculdade de Medicina.

1. Moléculas de adesão celular. 2. Fagocitose.
Pseudópodes. 4. *Crotalus durissus*. I. Monteiro, Helena
Serra Azul (Orient.) II. Título

CDD: 615.95

IÊDA PEREIRA DE SOUZA

**Alterações hematológicas e funcionais causadas por
venenos de subespécies brasileiras de *Crotalus durissus*
e suas frações isoladas**

Tese submetida à Coordenação de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito para a obtenção do
grau de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em: 27/11/2006

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama
Campus do Litoral Paulista, São Vicente - UNESP

Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^ª. Dr^ª. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

**In memória a meus pais Raimundo
Perelra de Souza e Maria do Carmo de Souza, pela
grande lição de vida e amor a nós deixadas.**

**Prof^a. Dr^a. Helena Serra Azul Monteiro nosso
agradecimento, pelo desprendimento, dedicação ao
ensino, valiosa amizade e orientação criteriosa e segura.**

**“Aprendi que um homem só tem o direito de
olhar um outro de cima para baixo para ajudá-
lo a levantar-se”.**

Anônimo

AGRADECIMENTOS

- A Deus, meu mentor intelectual, que está comigo em todos os momentos.
- Aos meus familiares, pelo amor, carinho, dedicação e apoio sempre presentes.
- A minha Co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Primavera Borelli, pelo apoio fundamental para o fim triunfal desta jornada.
- A Prof^a. Dr^a. Maria Elisabete Amaral de Moraes, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela valiosa colaboração e apoio.
- A Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves, Chefe do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará pela amizade e grande apoio durante o transcurso da Tese.
- As amigas da disciplina de Hematologia, Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves e Prof^a. Alcínia Braga de Lima Arruda, pela força, amizade e companheirismo.
- A todos os professores do curso de doutorado do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, que com suas experiências enriqueceram meus conhecimentos.
- A todos os professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio sempre que solicitado durante o transcorrer da tese.
- A Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins e ao Bolsista de Pro-Doc Alexandre Havt Binda amigos de todas as horas.
- Ao doutorando do Departamento de Fisiologia e Farmacologia René Duarte pelo prestimoso apoio no transcorrer dos experimentos.
- Aos Técnicos Antônio Eduardo de Castro Barros e Francisca Maria dos Santos, do setor de Hematologia, pelo companheirismo e colaboração durante todos esses anos e pelo inestimável auxílio na execução deste trabalho.

- Ao Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará, setor de Microbiologia, pela grande amizade, carinho com que nos acolheu em seu laboratório.
- As doutorandas Ivany Maria S. Costa e Silva e Daniela Nascimento Amora, e ao aluno de Iniciação Científica Daniel Freire, pelo inestimável auxílio na execução deste trabalho.
- A doutoranda Daniela Nascimento Amora, pela grande amizade e pelos conselhos valiosos durante a elaboração das análises estatísticas.
- A Farmacêutica-Bioquímica Francisca Raimunda Felizardo Guerreiro e a técnica de laboratório Suely Pascoal de Alencar do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará (HEMOCE) pelo prestimoso auxílio no transcorrer desse trabalho.
- As colegas do curso de pós-graduação, Mônica Façanha e Noelia Lima Leal, pelo carinho e amizade.
- À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro que me proporcionou condições ideais para a dedicação exclusiva ao curso de Doutorado.
- À bibliotecária Norma de Carvalho Linhares da Biblioteca do centro de Saúde da Universidade Federal do Ceará, pela correção das referências bibliográficas.
- Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração do presente trabalho.

RESUMO

Os acidentes ofídicos de serpentes representam um sério problema de Saúde Pública nos países tropicais, tanto pela frequência com que ocorrem e/ou pela morbi-mortalidade que ocasionam. As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil pela espécie *Crotalus durissus*, a qual se divide em seis subespécies. Nosso trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos venenos das serpentes *Crotalus durissus cascavella* originadas do estado do Ceará (Cdcc) e Maranhão (CdcM); *Crotalus durissus collilineatus* (Cdcol); *Crotalus durissus ruruima* (Cdru) e suas frações, Crotoxina (CTXru) e Fosfolipase A₂ (PLA₂ru), nos processos biológicos de espraiamento celular, fagocitose, atividade fungicida e alterações hematológicas. Camundongos Swiss, machos, foram inoculados por via intraperitoneal com os venenos descritos acima, nas doses de 120, 50, 27, 20 (venenos) e 10µg/Kg (frações), respectivamente. Duas horas após inoculação foram coletadas amostras de sangue do plexo orbital e o exsudato peritoneal. A análise estatística utilizada foi o teste t de Student com significância de 95%. Os animais tratados foram comparados com o grupo controle (inoculados com salina 0,9%). CdcM e a CTXru causaram as maiores alterações no eritrograma. 37,5% dos eritrócitos apresentaram morfologia macrocítica e microcítica; 25,5% hipocrômia; 25% com anisocitose e presença de policromasia. Foram observados 16,8% de corpúsculos de Howell Jolly. A contagem global de leucócitos foi reduzida significativamente após administração do Cdcc (82,9%), CdcM (70,1%) e Cdru (83,8%). A celularidade foi alterada depois da inoculação de Cdcc, Cdru e CTXru, em todos os tipos de células. A contagem global de células do peritônio aumentou após inoculação de Cdcc, Cdcol, Cdru e a CTXru. Em adição, o macrófago foi à célula predominante na contagem diferencial de células peritonais, contudo, somente a Cdcol apresentou significância estatística para macrófago (62,3%). Foi encontrada redução significativa do espraiamento celular depois da administração de todos os venenos variando de 52,7 a 65,7%. A fagocitose foi estatisticamente reduzida pela Cdcc nos períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Cdru reduziu a fagocitose apenas em 30, 60 e 120 minutos, CdcM em 30 e 90 minutos e CTXru nos tempos de 60 e 120 minutos. A Cdcol, e a CTXru mostraram significância na atividade fungicida contra *C. albicans* nos períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos, mas a Cdcc mostrou resultado similar em 60, 90 e 120 minutos. Conclui-se que o veneno interfere diferentemente na resposta hematológica e funcional. Em adição pode-se postular que os macrófagos foram responsáveis por estas alterações. Estudos futuros deverão ser realizados na perspectiva da identificação de provável ação fungicida de venenos ofídicos e suas frações.

Palavras Chaves: Espraiamento celular, Fagocitose, Atividade fungicida, *Crotalus durissus*.

ABSTRACT

Venomous snake accidents represent a serious public health problem in tropical countries, as much as for their frequency of occurrence and/or morbidity and mortality that they caused. In Brazil, the genus *Crotalus* comprise only one species, termed *Crotalus durissus*, which is divided into six subspecies. The aim of our study was to evaluate the effects promoted by venoms of *Crotalus durissus cascavella*, originated from the States of Ceará (Cdcc) and Maranhão (CdcM); *C. durissus collilineatus* (Cdcol); *C. durissus ruruima* (Cdru) and its isolated components, such as crotoxin (CTXru) and phospholipase A₂ (PLA₂ru), in the biological processes of cellular spreading, phagocytosis, hematological alterations and antifungal activity. Male Swiss mice were inoculated intraperitoneally with the venom doses of 120, 50, 27, 20, 10 and 10 µg/Kg, respectively to the snakes described above. After two hours of inoculation blood samples and exudate were collected from orbital plex and peritoneum, respectively. Statistical evaluation was performed using Student-T test with significance level set at 95%. We compared the treated animals with a control group, where animals were inoculated with saline 0.9%. CdcM and CTXru caused the most severe alterations in the erythrogram. We noticed that 37.5% of the erythrocytes showed macrocytic and microcytic morphology; 25.5% were hipocromic; 25% showed anisocytosis and the presence of polycromasia. We also found Howell Jolly bodies in 16.8% of the examined erythrocytes. The total counting of leukocytes was reduced statistically after administration of Cdcc (82.9%), CdcM (70.1%) and Cdru (83.8%). Cellularity was altered after the inoculation of Cdcc, Cdru and CTXru for all evaluated cells. We noticed a statistic increase of peritoneum total cells caused by Cdcc, Cdcol, Cdru and CTXru. In addition, macrophage was the most predominant cell after peritoneum differential cell counting. However, only Cdcol showed a statistic increase of macrophages (62.3%). We found significant reduction of cellular spreading after administration of all venoms ranging from 52.7 to 65.7%. Phagocytosis was statistically reduced by Cdcc in the periods of 30, 60, 90 and 120 minutes. However, Cdru reduced phagocytosis only at 30, 60 and 90 minutes, CdcM decreased phagocytosis at 30 and 90 minutes and CTXru in the periods of 60 and 120 minutes. Cdcol and CTXru showed significant fungicide activity against *C. albicans* in the periods of 30, 60, 90 and 120 minutes, but Cdcc showed similar results at 60, 90 and 120 minutes. We conclude that distinct venoms interfered differently in the intensity of each functional and hematological response. In addition, we postulate that macrophages maybe partially responsible for these alterations. Further studies should be evaluated for the use of venoms as fungicides.

Keywords: Cellular spreading, Phagocytosis, Antifungal activity, *Crotalus durissus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta no Brasil no período de 1990 a 1993.....	26
FIGURA 2	Representação esquemática da diferencial de macrófagos durante a vida adulta.....	40
FIGURA 3	Esquema demonstrativo do processo da fagocitose (resposta imune inespecífica) contra o antígeno, e os processos da digestão intracelular.....	44
FIGURA 4	Camundongos sendo pesados.....	50
FIGURA 5	Camundongo anestesiado em câmara anestésica saturada com éter etílico.....	51
FIGURA 6	Coleta de amostra sanguínea através de punção do plexo orbital..	51
FIGURA 7	Coleta de macrófagos na cavidade peritoneal.....	52
FIGURA 8	Contagem total das células na câmara de Neubauer.....	53
FIGURA 9	Lâminas sendo confeccionada na citocentrífuga.....	53
FIGURA 10	Laminas corada pelo May-Grunwald-Giemsa, modificada (ROSENFELD, 1947).....	54
FIGURA 11	Protocolo Experimental	55
FIGURA 12	Coleta de Macrófagos Residentes.....	56
FIGURA 13	Coleta de Macrófagos Estimulados.....	57
FIGURA 14	A capacidade de espraiamento de macrófagos.....	59
FIGURA 15	<i>Candida albicans</i> em meio agar-Sabouroud.....	60
FIGURA 16	Preparação da suspensão de <i>Candida albicans</i>	60
FIGURA 17	Atividade fagocítica e fungicida com <i>Candida albicans</i>	63
FIGURA 18	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de Hemácias	66

FIGURA 19	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a concentração de Hemoglobina.....	66
FIGURA 20	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o valor do volume hematócrito.....	67
FIGURA 21	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o Volume Corpuscular Médio (VCM).....	37
FIGURA 22	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM).....	68
FIGURA 23	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).....	68
FIGURA 24	Fotomicrografia das figuras A - Policromasia e B - Howell-Jolly.	69
FIGURA 25	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de Leucócitos no Sangue.....	69
FIGURA 26	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de neutrófilos em forma de anel (valores expressos em porcentagem)...	70
FIGURA 27	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de neutrófilos segmentados (valores expressos em porcentagem.....	71
FIGURA 28	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de eosinófilos (valores expressos em porcentagem).....	71
FIGURA 29	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de linfócitos (valores expressos em porcentagem).....	72
FIGURA 30	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de monócitos (valores expressos em porcentagem.....	72
FIGURA 31	Fotomicrografia da Celularidade no sangue.....	73
FIGURA 32	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de neutrófilos em forma de anel (valores expressos em milímetros cúbicos).....	74
FIGURA 33	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de neutrófilos segmentados (valores expressos em milímetros cúbicos)	74
FIGURA 34	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de eosinófilos (valores expressos em milímetros cúbicos).....	75
FIGURA 35	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de linfócitos (valores expressos em milímetros cúbicos).....	75

FIGURA 36	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de monócitos (valores expressos em milímetros cúbicos).....	76
FIGURA 37	Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total de células presentes na cavidade peritoneal.....	77
FIGURA 38	Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total neutrófilos segmentados (valores expressos em percentagem) presentes na cavidade peritoneal.....	78
FIGURA 39	Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total eosinófilos (valores expressos em percentagem) presentes na cavidade peritoneal.....	78
FIGURA 40	Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total de linfócitos (valores expressos em percentagem) presentes na cavidade peritoneal.....	79
FIGURA 41	Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total de macrófagos (valores expressos em percentagem) presentes na cavidade peritoneal.....	79
FIGURA 42	Fotomicrografia: A - Macrófago Normal e B - Macrófago ativado.....	80
FIGURA 43	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de neutrófilos segmentados presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos).....	81
FIGURA 44	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos).....	81
FIGURA 45	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de linfocitos presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos).....	82
FIGURA 46	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de macrófagos presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos).....	82
FIGURA 47	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o Espriamento e macrófagos peritoneais (valores expressos em percentagem).....	83
FIGURA 48	Fotomicrografia evidenciando o Espriamento.....	83
FIGURA 49	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoneais após 30 minutos de teste.....	84

FIGURA 50	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoneais após 60 minutos de teste.....	85
FIGURA 51	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoneais após 90 minutos de teste.....	85
FIGURA 52	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoneais após 120 minutos de teste.....	86
FIGURA 53	Fotomicrografia evidenciando Macrófago fagocitando <i>C. albicans</i>	86
FIGURA 54	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoneais após 30 minutos de teste.....	87
FIGURA 55	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoneais após 60 minutos de teste.....	88
FIGURA 56	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoneais após 90 minutos de teste.....	88
FIGURA 57	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoneais após 120 minutos de teste.....	89
FIGURA 58	Fotomicrografia das figuras A, B e C evidenciando a Atividade Fungicida em Score.....	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição e nomenclatura de fagócitos mononucleares.....	41
TABELA 2	Substâncias biologicamente ativas produzidas pelos macrófagos...	45
TABELA 3	Critérios estabelecidos por Corazzini (1993) para expressar o “score” de <i>Candida albicans</i> fagocitadas.....	62
TABELA 4	Resumo do eritrograma no sangue periférico.....	91
TABELA 5	Resumo da contagem total de leucócitos no sangue periférico e sua celularidade em porcentagem.....	91
TABELA 6	Resumo da contagem total de leucócitos no sangue periférico e sua celularidade em milímetros cúbicos.....	92
TABELA 7	Resumo da contagem total de leucócitos no peritônio e sua celularidade em porcentagem.....	92
TABELA 8	Resumo da contagem total de leucócitos no peritônio e sua celularidade em milímetros cúbicos.....	93
TABELA 9	Resumo da atividade funcional de macrófagos.....	93
TABELA 10	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre o Eritrograma (Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito e os Índices Hematimétricos).....	131
TABELA 11	Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de Leucócitos no Sangue.....	132
TABELA 12	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Sangue em porcentagem.....	133
TABELA 13	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Sangue em milímetros cúbicos.....	134
TABELA 14	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Global de Células do Peritônio.....	135
TABELA 15	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Peritônio em porcentagem.....	136
TABELA 16	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Peritônio em milímetros cúbicos.....	137

TABELA 17	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre o Espreadimento em porcentagem.....	138
TABELA 18	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica em porcentagem.....	139
TABELA 19	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em porcentagem.....	140
TABELA 20	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 30 minutos.....	141
TABELA 21	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 60 minutos.....	142
TABELA 22	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 90 minutos.....	143
TABELA 23	Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 120 minutos.....	144

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase.
APCs	Células “Profissionais” Apresentadoras de Antígenos.
AST	Dosagens séricas de aspartato.
ATP	Adenosina Trifosfato.
BFU-E	Unidade Formadora de “burst” Eritróide.
BSP	Bromossulfaleína.
C3b	Complemento.
CA	Componente Acida da Crotoxina.
Ca²⁺	Cálcio.
CB	Componente Básico da Crotoxina.
CD3	Cluster of differentiation 3.
CD4	Cluster of differentiation 4.
Cdc	<i>Crotalus durissus cascavella</i> .
Cdcc	<i>Crotalus durissus cascavella</i> – Ceará.
Cdcm	<i>Crotalus durissus cascavella</i> – Maranhão.
Cdcol.	<i>Crotalus durissus collilineatus</i> .
Cdm	<i>Crotalus durissus marajoensis</i> .
Cdru	<i>Crotalus durissus ruruima</i> .
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i> .
Cdtg	<i>Crotalus durissus trigonicus</i> .
CFU	Unidades Formadoras de Colônia.
CFU-Eo	Unidade Formadora de Colônia para Eosinófilos.
CFU-G	Unidade Formadora de Colônia para Granulócitos.

CFU-GEMM	Unidade Formadora de Colônia para Granulócito, Eritrócito, Monócito e Megacariócito.
CFU-M	Unidade Formadora de Colônia para Monócitos.
CK	Creatina-quinase.
CO₂	Gás Carbono.
CTH	Célula-Tronco Hematopoiética.
CTXru	Crotoxina fração da ruruima.
DLH	Desidrogenase láctica.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DNFB	2-4-dinitrofluorbenzeno.
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético.
ER	Reticulo endoplasmático.
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos.
FLA	Forma Leucocitária Absoluta.
FLR	Forma Leucocitária Relativa.
GM-CFU	Unidade Formadora de Colônia para Granulócitos e Monócitos.
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia para Granulócitos e Monócitos.
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio.
HSA	Soro albumina humana.
IFN-γ	Interferon- γ .
IgG	Imunoglobulina G.
IL	Interleucina.
IL-10	Interleucina-10.
IL-1β	Interleucina-1 β .
IL-3	Interleucina-3.

IL-4	Interleucina-4.
IL-5	Interleucina-5.
IL-6	Interleucina-6.
Kg	Kilograma.
LThelper	Linfócito T helper.
Mg²⁺	Magnésio.
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade.
MHC-I	Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe I.
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II.
mL	Mililitro.
NHS	Soro Homólogo Normal.
NO	Óxido nítrico.
NUROF	Núcleo Regional de Ofiologia.
O₂⁻	Anion Superóxido.
OS	Fosfatidilserina.
PA	Ácido fosfatídico.
PBS	Tampão Salina Fosfato.
PC	Fosfatidilcolina.
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas.
PGE₂	Prostaglandina E ₂ .
PLA₂ru	Fosfolipase A ₂ Fração da ruruima.
PSGL-1	Glicoproteína P-selectina 1.
RCT	Receptor da célula T.
RIC	Resposta Imune Celular.

RNA	Ácido ribonucléico.
SESA-CE	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.
•OH	Radical Hidroxil.
µg	Micrograma.
TAP	Transportador para a Apresentação do Antígeno.
TCR	Receptor presente em todos os linfócitos.
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento.
TNFα	Fator de necrose tumoral.
TP	Tempo de protrombina.
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada.
TXA₂	Tromboxano A ₂ .
UI	Unidade Internacional.
µL	Microlitro.
µM	Micromol.
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular.
Zn²⁺	Zinco.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Venenos Ofídicos	25
1.2	Hematopoese e Alterações Funcionais dos Macrófagos	36
1.3	Justificativa	46
2	OBJETIVOS	47
2.1	Gerais	48
2.2	Específicos	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	Animais	50
3.2	Veneno	50
3.3	Sangue	51
3.4	Obtenção de Macrófagos Peritoniais	52
3.4.1	Obtenção de Macrófagos Residentes	52
3.4.2	Obtenção de Macrófagos Estimulados	52
3.5	Contagem do Número de Células Presentes na Cavidade peritoneal	53
3.6	Protocolo Experimental	55
3.7	Esquema Experimental	56
3.8	Teste de Espriamento de Macrófagos Peritoniais	58
3.9	Determinação do Teste de Fagocitose e da Atividade Fungicida, "In Vivo", (Killing) de Macrófagos Peritoniais	59
3.9.1	Obtenção de Soro Homólogo Normal (NHS)	59
3.9.2	Preparo e Opsonização da Suspensão de <i>Cândida albicans</i>	60

3.9.3	Obtenção da Suspensão de Macrófagos Peritoniais	60
3.9.4	Ensaio	61
3.9.4.1	Avaliação da Fagocitose	61
3.9.4.2	Avaliação da Atividade Fungicida ("Killing")	61
3.10	Estatística	61
4	RESULTADOS	64
4.1	Eritrograma no Sangue	65
4.2	Contagem Global de Leucócitos no Sangue	69
4.2.1	Contagem de Leucócitos no Sangue Expressa em Percentagem	70
4.2.2	Contagem de Leucócitos no Sangue Expressa em Milímetros Cúbicos	73
4.3	Contagem Global das Células na Cavidade Peritoneal	76
4.3.1	Contagem das Células Presentes na Cavidade Peritoneal Expressa em Percentual	76
4.3.2	Contagem das Células Presentes na Cavidade Peritoneal Expressa em Milímetros Cúbicos	80
4.4	Teste de Espreadimento	83
4.5	Atividade Fagocítica, "In Vitro" de Macrófagos Peritoniais	84
4.6	Atividade Fungicida, "In Vitro" de Macrófagos Peritoniais	87
5	DISCUSSÃO	94
6	CONCLUSÃO	103

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	ANEXOS	130

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Venenos Ofídicos

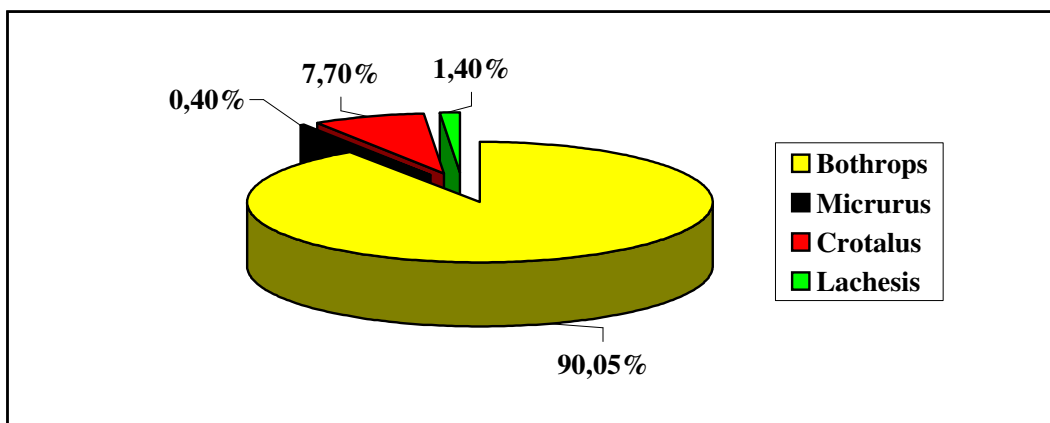
Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais, tanto pela frequência com que ocorrem como pela morbi-mortalidade que ocasionam. Existem no mundo aproximadamente três mil espécies de serpentes, sendo que apenas 410 são consideradas venenosas. No Brasil estão catalogadas, até o momento, 256 espécies sendo 69 venenosas e (ou) peçonhentas e 187 não-venenosas e (ou) não-peçonhentas (BARRAVIERA, 1993; FEITOSA et al., 1997; PINHO et al., 2000).

Das 69 espécies venenosas, 32 pertencem ao gênero *Bothrops*, seis ao gênero *Crotalus*, duas ao gênero *Lachesis* e 29 ao gênero *Micrurus* (BARRAVIERA, 1993).

A Organização Mundial de Saúde estima que, anualmente, ocorra no mundo 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas, resultando em 30.000 a 40.000 mortes (PINHO et al., 2000). De acordo com os dados publicados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 1998), ocorrem no Brasil aproximadamente 20.000 casos de acidentes ofídicos por ano (**Figura 1**). No Ceará existem poucos trabalhos sobre ofidismo (FEITOSA et al., 1997). GUIMARÃES et al. (1989) fizeram levantamento estatístico na Divisão de Epidemiologia da Secretária de Saúde do Estado, no período de 1986 a 1988, onde verificaram a ocorrência de 1079 casos de acidentes por serpentes peçonhentas, com 17 óbitos e letalidade de 1,6%. Segundo dados da Secretaria de Saúde do Estado, de 1987 a 1990 ocorreram 1.256 casos, com 18 óbitos e letalidade de 1,4% (FEITOSA et al., 1997). No ano de 2002, foram registrados 1003 casos de acidentes por serpentes peçonhentas, sendo, portanto um problema de saúde pública (SESA-CE, 2003).

Dentre as serpentes peçonhentas encontradas no Brasil e de interesse clínico, existem as pertencentes à família *Viperidae*, subfamília *Crotalinae*, com os gêneros *Bothrops* (conhecida popularmente como jararaca ou urutu), *Crotalus* (vulgarmente chamada de cascável ou maracambóia) e *Lachesis* (também conhecida como surucucu); e as pertencentes à família *Elapidae* com subfamília *Elapinae* representada pela espécie *Micrurus* - conhecida como coral verdadeira ou boicorá (NOGUEIRA; SAKATE, 2004; DU et al., 2006).

As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por apenas uma espécie, a *Crotalus durissus* e classificadas nas subespécies *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), encontrada nas zonas altas e secas do Brasil sul oriental e meridional, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais. Sua denominação popular é cascável ou boiquira; *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc), distribuídas nas regiões secas do Centro-Oeste do Brasil, desde o Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e no norte de São Paulo. Suas denominações populares são cascável ou maracabóia; *Crotalus durissus cascavella* (Cdc) onde podemos encontrar a espécie característica do Ceará (Cdcc) e a do Maranhão (Cdc), encontrada nas áreas de caatinga da região Nordeste do Brasil, desde o Maranhão até o norte do Estado de Minas Gerais. As denominações populares são cascável de quatro ventas; *Crotalus durissus ruruima* (Cdru), observada em algumas regiões do território de Roraima e estados do Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia, denominando-se popularmente boicininga, boiçununga e maracá; e a *Crotalus durissus marajoensis* (Cdm), encontrada na Ilha de Marajó, onde recebe as denominações populares de boicininga, boiçununga e maracá; *Crotalus durissus trigonicus* (Cdtg), encontrada no território de Roraima (BARRAVIERA, 1993; PINHO; PEREIRA, 2001; MARTINS et al., 2003).



Fonte: Brasil, 1998.

Figura 1 - Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta no Brasil no período de 1990 a 1993.

Por afetar as células sanguíneas, proteínas plasmáticas e componentes da parede vascular, os venenos das famílias Viperidae, Crotalinae e Elapinae apresentam diversos efeitos tóxicos sobre o sistema cardiovascular (DU et al., 2006).

O sistema cardiovascular e o sistema da coagulação são regulados por constante integração de sinais e atividades da parede vascular, onde circulam as células sanguíneas e proteínas plasmáticas. A deficiência dessas proteínas pode levar ao rompimento da hemostasia. Como exemplo, podemos citar, pacientes portadores de hemofilia A, que apresentam deficiência do fator VIII da coagulação e pacientes com a síndrome de Bernard-Soulier, tem deficiência da glicoproteína Ib da plaqueta. Estas patologias contribuem para a diátese sanguínea. Fenômeno similar ocorre com as toxinas de serpentes que causam ruptura do sistema cardiovascular e produzem efeitos nocivos para os pacientes ao interferir com as funções das proteínas plasmáticas ou células do sangue (DU et al., 2006).

A composição do veneno crotálico é complexa e constituída de enzimas, toxinas e peptídeos (BERCOVICH et al., 1987). As toxinas de serpentes podem causar inibição no rearranjo dos fatores da coagulação, incluindo fibrinogênio, protrombina, fator V, fator IX, fator X e trombina (DU et al., 2006).

Existe uma grande variedade em relação aos venenos de serpentes que depende de suas propriedades biológicas, composição química, toxicidade, ações biológicas e características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. O veneno da *Crotalus* é considerado um dos mais perigosos para a espécie humana, pois possui uma variedade de proteínas tóxicas incluindo a crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina, enzima trombina-*símile*, além de induzir atividades tóxicas causando neurotoxicidade, paralisia respiratória, hipotensão, insuficiência renal aguda, miotoxicidade, hepatotoxicidade, alterações hemorrágicas, e choque (JIMÉNEZ-PORRAS, 1964; MAKLAND, 1998; TOYAMA et al., 2000; FRANCISCHETTI et al., 2000; CRUZ et al., 2005; AMORA, 2005).

Na literatura já esta bem estabelecida a letalidade e a toxicidade do veneno das serpentes do gênero *crotalus* que pode variar de acordo com a idade, sexo e estado nutricional, o qual depende da região geográfica onde o animal foi capturado (THOMAS; POUGH, 1979; CHIPPAUX et al., 1991; DALTRY et al., 1996; CRUZ et al., 2005).

Na incidência da picada de serpentes existe uma marcada variação sazonal, onde o pico ocorre geralmente nos períodos chuvosos. Há uma alta incidência na América do Sul, Índia, Paquistão, Bangladesh, Oeste da África e Sudeste da Ásia (GREGORY-DWYER et al., 1986; JAYANTHI; GOWDA, 1988; ACOSTA et al., 2000).

Estudos experimentais mostraram que os venenos de certas espécies de serpentes podem levar a uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (CRUZ et al., 2005).

A crotoxina, principal fração do veneno crotálico, tem como principais componentes a fosfolipase A₂ (PLA₂) e o polipeptídeo crotapotina, com função de inibir a resposta imune humoral por interferir com a síntese da imunoglobulina G (IgG) (Sampaio *et al.*, 2001). A atividade antiinflamatória descrita pela crotapotina esta baseada na observação da atividade inibitória de fosfolipídios sobre a resposta edematogênica induzida por carragenina (LANDUCCI et al., 1995).

Os ecosanoides, prostaglandina E₂ (PGE₂) e tromboxano A₂ (TXA₂), estão envolvidos nos eventos inflamatórios. TXA₂ tem potencialidade nas ações proinflamatórias e as PGE₂ tem ações as quais podem ser consideradas ambas pro- e antiinflamatórias (JAMES et al., 2001).

O resultado positivo da resposta inflamatória é a eliminação dos fatores químicos, físicos ou infecciosos os quais podem desencadear um quadro inflamatório e evitar que ele impeça a reparação e/ou regeneração do tecido afetado. Os macrófagos ativados são reconhecidos como células que exercem um importante papel nos processos infecciosos, pois são elas que iniciam, mantêm e controlam a resposta imune específica. Em resposta ao veneno, o macrófago secreta o óxido nítrico (NO) e citocinas proinflamatórias tais como, o fator de necrose tumoral (TNF α), interleucina-1 (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) (CRUZ et al., 2005).

A produção de citocinas pró e anti-inflamatórias são estritamente controladas pelo complexo mecanismo de *feedback* (VAN DISSEL et al., 1998). As citocinas proinflamatórias são responsáveis por iniciar o combate contra o patógeno endógeno. Embora, excessivos produtos destes mediadores podem contribuir significativamente para o choque, falência de órgãos e até a morte. Em contraste as citocinas antiinflamatórias são cruciais para a baixa regulação no processo inflamatório e mantêm a homeostasia para o correto funcionamento dos órgãos considerados vitais (CRUZ et al., 2005; DINARELLO 1996).

O termo macrófago ativado foi introduzido extensivamente na literatura por Mackaness em 1960 para descrever o aumento da atividade microbicida de macrófagos em animais com infecção imune adquirida por bactéria intracelular. O mecanismo da

imunidade celular é baseado na capacidade do macrófago para adquirir e expressar aumento no mecanismo microbicida. Essas células exibem um aumento pronunciado da membrana plasmática aumentando assim, sua capacidade de aderir, espriar sobre superfícies, sua capacidade de fagocitar conseqüentemente aumentando o número de fagolissomos e vesículas endocíticas (MACKANESS, 1962/1968; KARNOVSKY; LAZDINS, 1978; NORTH, 1978).

O macrófago ativado apresenta alta capacidade em secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e importante atividade microbicida e tumoricida (KARNOVSKY; LAZDINS, 1978; SAMPAIO et al., 2001), além disso, importante ação funcional, especialmente a atividade metabólica com alta capacidade para utilização de glicose e glutamina (ARDAWI; NEWSHOLME, 1983; SAMPAIO et al., 2001). Esses metabólitos provêm do ATP e são precursores para síntese de DNA, RNA, proteína e lipídeos que são importantes para atividade secretora dessas células e para a síntese de nova membrana celular depois da atividade fagocítica (YASSAD et al., 1997; SAMPAIO et al., 2001).

Ainda que a patofisiologia do envenenamento seja complexa e ainda não esteja bem esclarecida, o veneno é conhecido por iniciar a liberação de citocinas. No modelo do processo inflamatório sistêmico produzido por injeção intravenosa de alta dose de veneno ou produtos derivados do veneno, o aumento na produção de citocinas proinflamatória contribui significativamente para a falência de órgãos podendo levar até a morte. Essas citocinas iniciam a cascata de eventos decorrentes do envenenamento, tais como: febre, anorexia e também eventos fisiológicos no hospedeiro como, ativação da vasodilatação, hipotensão, e aumento da permeabilidade vascular (CRUZ et al., 2005).

Cardoso e Mota (1997) demonstraram que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* inibe a resposta imune humoral em camundongos ao utilizarem ratos BALB/c imunizados com o soro albumina humana (HSA) mais AI (OH), produto como a resposta do anticorpo principalmente do isotipo de IgG1 e que o veneno do Cdt suprime a resposta do anticorpo, mas não a reação da sensibilidade do contato a 2-4-dinitrofluorbenzeno (DNFB) sugerindo que o veneno da cdt modula as células TH₂ negativamente sem afetar as células TH₁, e que o veneno tem um efeito inibitório em algumas atividades do macrófago, tais como, fagocitose, espriamento e atividade fungicida (MOSMANN; MOORE, 1991; SAMPAIO et al., 2001/2003). Desde então o

macrófago tem sido considerado de fundamental importância para a resposta imune em casos de envenenamento, pressupondo que o resultado final de muitos eventos inibitórios pode ser alterado pela função de macrófagos (SAMPAIO et al., 2001/2003). Embora a descrição detalhada dos eventos provocados pelo envenenamento que são inibidas pela ativação dos macrófagos, ainda não estejam bem esclarecidos (CRUZ et al., 2005).

A maioria dos venenos ofídicos exerce seus efeitos em quase todas as células e tecidos; e suas propriedades farmacológicas são determinadas pela quantidade de um constituinte específico e biologicamente ativo que se acumula num sítio de reconhecimento onde é capaz de produzir injúria (RUSSEL et al., 1996; CUMMINGS et al., 2000). Além disso, em acidentes ofídicos ocorrem reações inflamatórias intensas com a liberação de muitos mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, as citocinas, a bradicinina, as frações do complemento e o fator de agregação plaquetária (PETRICEVICH, 2004; TEIXEIRA ET AL., 2003).

Os venenos de serpentes apresentam uma infinidade de substâncias com estruturas simples e complexas, cuja proporção e características específicas variam entre as espécies (VARANDA; GIANNINI, 1994). Entre 90 e 95% do peso seco dos venenos ofídicos têm propriedade protéica, e são estas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados. A natureza proteínica desses venenos foi estabelecida em 1843 por Lucien Bonaparte (BON, 1997; MAKLAND, 1998; PONCE-SOTO et al., 2002).

Entre as inúmeras atividades exercidas pelos componentes protéicos, destacam-se a ação enzimática e a presença de toxinas protéicas específicas, crotamina, crotapotina, fosfolipase A₂, giroxina, convulxina e as enzimas trombina-símile (KAMIGUTI; CARDOSO, 1989; BARRAVIERA, 1993; PINHO; PEREIRA, 2001; CRUZ et al., 2005).

A peçonha crotálica apresenta-se como um complexo tóxico-enzimático, onde são encontradas as enzimas fosfodiesterase, 5-nucleotidase e toxinas como a crotoxina, convulxina, crotamina e giroxina (DU; CLEMETSON, 2002; RANGEL-SANTOS et al., 2004).

As serpentes do gênero *Crotalus* possuem venenos com ações miotóxica, atividades tóxicas causando neurotóxicidade, nefrotóxica, hematológica e hepatotóxica

(JORGE; RIBEIRO, 1990; BARRAVIERA, 1991; BARRAVIERA, 1993; SANOMARTINS, et al., 2001; CRUZ et al., 2005).

O veneno das serpentes do gênero crotálico apresenta efeitos importantes sobre os músculos esqueléticos (AZEVEDO et al., 1985; AZEVEDO et al., 1987; AZEVEDO et al., 1990; BARRAVIERA, 1993), sistema nervoso (BARRAVIERA, 1993), rins (SILVA et al., 1979; AMARAL et al., 1986; BARRAVIERA, 1993) e sangue (AMARAL et al., 1980; COSTA et al., 1989; THOMAZINI et al., 1991; BARRAVIERA, 1993;). Outros órgãos, tais como o fígado (SALIBA et al., 1983; BARRAVIERA; PEREIRA, 1991; BARRAVIERA, 1993), também podem ser acometidos.

Recentemente foi demonstrado que as subunidades da crotoxina, isolada do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*, induziam aumento na secreção de insulina (BOWTON et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2005). Os autores sugerem que este aumento na secreção de insulina pode estar relacionado à liberação de ácido araquidônico pela fosfolipase A₂ dentro das células B do pâncreas.

Apesar da crotoxina apresentar um perfil eletroforético semelhante nas subespécies *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, existem diferenças em suas atividades, talvez relacionadas à existência de isoformas desta proteína (KINI; EVANS, 1989; RANGEL-SANTOS et al., 2004). Além de serem encontradas em venenos de serpentes, as PLA₂ secretórias ocorrem em uma grande variedade de fluidos biológicos como secreções pancreáticas, exsudatos inflamatórios e venenos de artrópodes e de moluscos (CHACUR et al., 2003).

O veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) da América do Sul possui uma mistura de muitas proteínas incluindo a crotoxina (CTX), a qual representa a maior neurotoxicidade presente no veneno. A molécula da crotoxina é composta de duas subunidades, uma ácida e não tóxica chamada componente A (CA) e uma básica fracamente tóxica fosfolipase A₂ chamada componente B (CB) (FAURE et al., 1994; CARDOSO; MOTA, 1997; BERCHOVICI et al., 2004; SAMPAIO et al., 2006)

Inúmeras atividades inflamatórias têm sido descritas para as fosfolipases A₂ de venenos como indução de edema, recrutamento de células inflamatórias, degranulação de mastócitos entre outras (FRANSON et al., 1974; VADAS; PRUZANSKI, 1986; CHACUR et al., 2003).

Alguns autores (DEMPSTER et al.,1980; GOPALAKRISHNAKORE et al.,1984; BARRAVIERA, 1993) têm estudado o efeito da crotoxina, da crotapotina e da fosfolopase A₂ sobre o músculo esquelético de animais. As alterações anátomo-patológicas ocorrem quatro a seis horas após a inoculação da crotoxina e são lesões subsarcolêmicas, com edema intramitocondrial. Após 24 a 48 horas as mitocôndrias apresentam depósitos densos, com elevada concentração de cálcio.

A inoculação de diferentes quantidades de crotapotina no músculo não evidencia lesões histológicas. Já quando se inoculam diferentes quantidades de fosfolopase A₂ ocorre aumento do peso muscular, além de se verificar necrose frente a quaisquer doses utilizadas. Dessa maneira, a associação entre fosfolopase A₂ e crotapotina, leva a uma potencialização dos efeitos miotóxicos. Além disso, foi possível observar que o local primário da ação da crotoxina no músculo são as membranas plasmáticas, estando relacionada à hidrólise de fosfolipídios (BARRAVIERA, 1993).

A atividade miotóxica sistêmica (AZEVEDO et al., 1985; MAGALHÃES; RIBEIRO,1986; AZEVEDO et al.,1987; CUPO et al.,1988; AZEVEDO et al.,1990; AZEVEDO; CUPO, 1990; CUPO et al.,1990; CHAVES et al., 1992; BARRAVIERA, 1993), caracterizada pela liberação de mioglobina para o sangue e a urina, está bem estabelecida com base em observações clínicas, dados laboratoriais e comprovação através de biópsia muscular. O diagnóstico de rabdomiólise pode ser comprovado pela elevação dos níveis séricos de creatina-quinase (CK), desidrogenase láctica (DLH) e aspartato aminotransferase (AST).

A crotamina (CHANG; TSENG, 1978), miotoxina de peso molecular entre 4.000 a 5.000 daltons, é capaz de induzir a despolarização do potencial de membrana das células musculares. É possível que esta miotoxina atue nos canais de sódio da membrana plasmática das células musculares, induzindo um influxo deste cátion (VITAL BRAZIL, 1993; LOMONTE et al., 2003).

As frações neurotóxicas do veneno crotálico são aquelas que produzem efeitos tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico. A principal fração neurotóxica do veneno da *Crotalus durissus terrificus* é a crotoxina, que causa paralisia em todas as espécies animais estudadas, semelhantes ao efeito causado pelos curares. Estudos em animais mostram também a presença de vômitos, salivação intensa, diarreia e albuminúria, além de convulsões. Um dos importantes efeitos da crotoxina é o bloqueio da transmissão neuromuscular. Estes achados sugerem que as paralisias motoras e respiratórias no acidente crotálico sejam decorrentes do

bloqueio da junção neuromuscular, permitindo concluir que esta neurotoxina atue na pré-sinapse, inibindo a liberação de acetilcolina (VITAL BRAZIL, 1972; BARRAVIERA, 1993).

Outras toxinas, tais como convulxina e giroxina, contribuem sobremaneira para produzir convulsões, perturbações circulatórias e respiratórias em animais de experimentação (BARRAVIERA, 1993).

Ação hepatotóxica – as alterações hepáticas foram propostas pela primeira vez em 1989 por Barraviera et al. Naquela oportunidade os autores observaram um doente que evoluiu para óbito e que apresentou, no exame anátomo-patológico do fígado, extensas áreas de necroses. Posteriormente, Barraviera (1991) avaliou a função hepática de 15 doentes, por meio da prova da retenção de bromossulfaleína (BSP) e dosagens séricas de aspartato (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Verificou um aumento da retenção da BSP em 53,34% dos doentes e aumento de AST e ALT em 86% e 66%, respectivamente. Em estudo experimental o mesmo autor (BARRAVIERA, 1991) inoculou veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar e verificou aumento nas concentrações séricas de AST e ALT em todos os animais estudados. A análise do fígado pela microscopia eletrônica de transmissão demonstrou lesões mitocondriais caracterizadas por edema importante, desaparecimento completo das cristas, rarefação da matriz e em alguns casos perda do conteúdo mitocondrial. Muitas das lesões observadas foram consideradas irreversíveis (BARRAVIERA, 1993).

As alterações renais nos acidentes crotálicos são verificadas desde 1952 por Amorim e Mello (AMARAL, 1985; BARRAVIERA, 1993;) que autopsiaram doentes picados por cascavel que foram a óbito, encontrando nefrose do néfron intermediário. Estudos realizados por esses autores em animais confirmaram tais achados, tendo-se concluído que, além do veneno agir indiretamente sobre os rins, ainda apresenta uma possível ação direta na produção das lesões.

A ação indireta sobre células renais seria causada pela mioglobinúria, decorrente da rabdomiólise, atualmente bem comprovada no acidente crotálico (WHO, 1981; BARRAVIERA, 1993). A associação entre rabdomiólise e insuficiência renal aguda está bem estabelecida, embora a patogenia dessa combinação não se encontre totalmente elucidada. Entre os mecanismos propostos para explicá-la encontramos a obstrução tubular por cilindros de mioglobina e a lesão tóxica direta dos túbulos pelo miopigmento. Outros fatores, tais como desidratação, hipotensão arterial, acidose metabólica e choque, podem estar associados à rabdomiólise e contribuem para a

instalação da lesão renal (WHO, 1981; REID; THEAKSYON, 1883; BARRAVIERA, 1993).

Ações hematológicas – as alterações hematológicas encontradas estão relacionadas aos eritrócitos (KELEN, 1960/62; SALIBA et al.,1983), leucócitos (WAJCHENBERG et al., 1954/55; COSTA et al.,1989;), plaquetas (THOMAZINI et al.,1991) e fatores de coagulação (RAW et al., 1986; JORGE; RIBEIRO, 1988; JORGE; RIBEIRO,1989). O veneno crotálico causa hemólise *in vitro*, porém este fenômeno não foi observado *in vivo*. A velocidade de hemossedimentação varia inversamente com o tempo de coagulação. Em geral é baixa, tendo-se verificado casos em que é praticamente zero, aumentando com a normalização do tempo de coagulação (BARRAVIERA, 1993). O número de leucócitos encontra-se aumentado, com valores em geral acima de 15.0000/mm³ e desvio à esquerda escalonado, com predomínio de neutrófilos segmentados (BARRAVIERA, 1993). Em relação às plaquetas, as alterações encontradas estão relacionadas ao número e à agregação. Em geral, o número pode estar normal ou diminuído, além de diminuição ou ausência de agregação plaquetária nos primeiros dois dias após o acidente (BARRAVIERA, 1993; SANTOS et al., 2000).

As alterações observadas nos fatores de coagulação estão relacionadas à presença de enzima tipo trombina, sendo esta uma das frações do veneno que tem capacidade de transformar fibrinogênio em fibrina *in vitro*, levando a um consumo de fatores da coagulação e, por fim incoagulabilidade sangüínea (MARSH, 1974; BARRAVIERA, 1993). A contagem das plaquetas pode se apresentar normal ou diminuída e os fatores da coagulação estão diminuídos. Como conseqüência, teremos alterações nas diferentes vias da coagulação, ou seja, a via extrínseca (tempo de protrombina - TP) ou via intrínseca (tempo de tromboplastina parcial ativada - TTPA) encontram-se aumentados. Independente do mecanismo de ativação da cascata da coagulação, o efeito resultante será principalmente o consumo de fibrinogênio (BARRAVIERA, 1990).

As enzimas *trombina-símile* ou tipo trombina estão presentes em um número variado de espécies das subfamílias *Crotalinae* e *Viperinae*. Apresentam ação pró-coagulante por atuarem no fibrinogênio, transformando-o em fibrina. Diferentemente, essas enzimas liberam preferencialmente o fibrinopeptídeo A ou B, enquanto a trombina sérica libera ambos. Isso caracteriza a formação de um complexo de fibrina facilmente degradada por plasmina, gerando, assim, um quadro de

incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio (RUSSEL, 1983; SANOMARTINS, et al., 2001).

A fosfolipase A₂ (PLA₂) tem efeito hemolítico sobre os eritrócitos. Essa atividade hemolítica torna-se dependente das cargas da PLA₂ e do substrato fosfolipídico. Algumas PLA₂ de serpentes são enriquecidas com fosfatidilserina (PS) ou ácido fosfatídico (PA). Quanto aos resultados, algumas PLA₂ básicas tendem a ter altas atividades hemolíticas, propriedade confirmada pela análise estrutural da PLA₂ básica do veneno da *Agkistrodon halys pallas*. As PLA₂ apresentam dois grupos de resíduos básicos localizados perto do sítio da interfase de reconhecimento e tem como assimetria a distribuição de carga positiva. Essas estruturas conferem à enzima uma atividade esterásica forte para PS mais não para fosfatidilcolina (PC). Ao contrário a PLA₂ ácida de alguns venenos prefere o substrato PC, mas não o PS. A carência da carga positiva da PLA₂ ácida na superfície de sua estrutura diminui a atividade hemolítica. Além disso, a carga do fosfolipídio, substrato específico da PLA₂ pode também ser dependente da saturação da cadeia de ácido graxo em fosfolipídios como demonstrado por alguns pesquisadores (SIX; DENNIS, 2000; DOLEY et al., 2004; DU et al., 2006).

As lectinas do veneno de serpentes podem também ter como células alvo os eritrócitos. Essas lectinas contêm carboidratos ligados aos domínios e são dependentes de cálcio. Os domínios existem essencialmente como hemodímeros e são também hábeis para aglutinar eritrócitos, causando interação as quais podem ser inibidas pela galactose e etileno diaminotetraético (EDTA) (DU et al., 2006).

A função dos leucócitos tem sido reportada por atenuar a via das metaloproteínas rompendo a ligação glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1) ou pelas desentegrinas e PLA₂ através de outros mecanismos, fazendo com que o veneno modifique sua função. Várias proteínas dos venenos de serpentes têm sido também reportadas por afetar a micro circulação por modulação da vasculogênese ou induzindo apoptose (SUHR; KIM, 1996; PLATT et al., 1998; DU et al., 2006).

Grandes avanços nas pesquisas com toxinas e enzimas ofídicas desenvolveram-se nos últimos trinta anos com o advento das análises da estrutura bioquímica, principalmente dos venenos elapídicos, em consequência de sua maior letalidade. Contudo, novas descobertas como das toxinas das cascavéis americanas e hipotensinas dos venenos botrópicos geraram grande interesse para os estudos com a família *Viperidae* (BARRAVIERA, 1993).

1.2 Hematopoese e Alterações Funcionais dos Macrófagos

O tecido hematopoético deve ser visto não só como um tecido de autoduplicação, mas também de diferenciação celular, e assim, faz-se necessário considerar a existência de compartimentos neste tecido, bem como a estrutura de cada um (METCALF, 1984, WILLIAMS et al., 1991).

Funcionalmente a medula óssea pode ser entendida como tendo três compartimentos, o de proliferação, o de diferenciação e o de maturação celular (WILLIAMS et al., 1991).

O compartimento de proliferação constitui-se de células primitivas (ou pluripotentes ou unidades formadoras de colônias - CFU) com grande capacidade proliferativa e pouca diferenciação (METCALF, 1984/1986; NILSSON et al., 1997; WILLIAMS et al., 1991; SZILVASSY et al., 1999).

O compartimento de diferenciação envolve células primitivas já comprometidas com determinada(s) linhagem (ns) celular (es), as unidades formadoras de colônias grânulo-monocíticas (GM-CFU), onde predominam os mieloblastos e monoblastos, respectivamente; a unidade formadora de colônia eritróide-megacariocítica, originando proeritroblastos e megacarioblastos, respectivamente, e as células primitivas linfóides produzindo os progenitores linfóides. As células destes compartimentos são sensíveis à ação de fatores de crescimento específicos como GM-CSF (fator estimulador de colônia para granulócitos e monócitos), e as interleucinas (ILs), IL-1, IL3, IL4, IL5 e IL6, produzidos por células maduras e do estroma da medula óssea, que funcionam como fatores de crescimento para multilinhagens, induzindo “in vitro” a formação de colônias para as linhagens eritróides (BFU-E - unidade formadora de “burst” eritróide); eosinófilos (CFU-Eo - unidade formadora de colônia para eosinófilos e multipotencial (CFU-GEMM - unidade formadora de colônia). As células respondem à ação dos fatores de crescimento específico como, CFU-GM (granulócitos e macrófagos), CFU-G (granulócitos) e CFU-M (monócitos) (**Figura 2**) (BOT et al., 1989; WILLIAMS et al., 1991; MCCLURE et al., 2001; OOSTENDORP et al., 2002; CARVALHO; BUZATO, 2005).

Os eventos hematopoéticos em camundongos têm início no saco vitelino no 7º dia de gestação, transferindo-se para o fígado e baço no meio da gestação e para medula óssea antes do nascimento (DZIERZAK et al., 1998).

Vários tecidos e/ou órgãos dentro do embrião humano serve de reservatório ou formadores de atividade hematopoiética. Em camundongos temos principalmente, o saco vitelino, fígado, baço e timo. No embrião de camundongos, o timo e o baço exercem sua função no final da gestação e estão envolvidas na proliferação e diferenciação de células (DZIERZAK et al., 1998).

Os monócitos circulam pela corrente sanguínea por cerca de três dias no homem e de um dia no camundongo. O número total de monócitos é de aproximadamente $1,7 \times 10^9$ em um homem adulto e corresponde a 1-6% do total de células brancas do sangue. Os monócitos deixam a circulação sanguínea e se distribuem pelos tecidos. De acordo com a sua localização e do microambiente, os macrófagos recebem diferentes nomes e podem diferir quali e quantitativamente em suas características bioquímicas, estruturais e funcionais (**Tabela 1**) (PAPADIMITRIOU; ASHMAN, 1989; EPSTEIN et al., 1991; ROBBINS et al., 1991; CARVALHO; BUZATO, 2005). Entretanto, os macrófagos, independentemente de sua localização, compartilham de algumas das propriedades gerais que os tornam semelhantes entre si, ou seja, propriedades de espraiamento, de fagocitose e atividades fungicida, bactericida e tumoricida (VAN FURTH et al., 1969; JOHNSTON Jr., 1988; RAPAPORT, 1990; ROBBINS et al., 1991). Contudo, Auger e Ross (1992) afirmam que a heterogeneidade fenotípica, funcional, e morfológica possa estar refletida na dependência do local onde se encontre o macrófago, podendo daí advir uma modulação de vários processos fisiológicos e patológicos.

O termo macrófago foi dado em 1892 por Elie Metchnikoff, a uma grande célula mononuclear que apresentava a capacidade de aderir ao endotélio, migrar através dos mesmos, ingerir e destruir microrganismos (PAPADIMITRIOU; ASHMAN, 1989; KELLY et al., 1994).

O macrófago é uma célula terminalmente diferenciada caracterizada por sua motilidade, alto poder secretório e grande atividade fagocítica. Essas células têm como papel central às respostas inflamatória e imunológica. Elas são encontradas em vários órgãos e cavidades serosas. Nos tecidos ou órgãos essas células podem ficar em estado quiescente, ou seja, células residentes com atividade funcional (CALDER, 1995; SAMPAIO et al., 2001).

A vida média dos macrófagos não é precisamente conhecida, mas há evidências de que permaneçam vivos e ativos durante vários meses (CARVALHO; BUZATO, 2005).

Uma vez nos tecidos, os macrófagos provavelmente não retornam à circulação, podendo sobreviver extravascularmente por vários meses. São os chamados macrófagos residentes (SLAUSON; COOPER, 1990).

A capacidade migratória dos macrófagos dos tecidos também é pouco conhecida. Entretanto, sabe-se que células de K pffer e macrófagos alveolares, por exemplo, são capazes de migrar para gânglios linfáticos próximos, respectivamente do fígado e dos pulmões. Apesar da fun o fagocítica ser comum a todos os macrófagos, célula isolada de diferentes sítios anat micos apresentam heterogeneidade fenotípica. Isso se deve, em parte, aos diferentes microambientes a que os macrófagos estão expostos. Os estímulos a que os macrófagos estão expostos em ambientes estéril e relativamente anaeróbico do baço e da cavidade peritoneal, por exemplo, são muito diferentes daqueles encontrados nos pulmões, um tecido aeróbico e em contato com fatores externos (CARVALHO; BUZATO, 2005).

A fagocitose é um dos principais mecanismos in nato, contribuindo para a resistência de *Cândida albicans* em indivíduos saudáveis, mas a habilidade dos fagócitos mononucleares de destruir a *C. albicans* em hospedeiros não comprometidos é um pouco controverso (LEHRER; CLINE, 1969; LEVITZ, 1992) e, apenas os leucócitos polimorfonucleares são bem conhecidos pelo seu grande poder como agente candid cida. O mecanismo fungicida de macrófagos peritoneal murina não tem sido bem estabelecido. Alguns autores atribuem a atividade fungicida dessas células a substâncias proteic neas, outros que são dependentes da mieloperoxidase e outros que o mecanismo   responsável pelo burst oxidativo (REMENTERÍA et al., 1995).

O mecanismo pelo qual o neutrófilo polimorfonuclear destrói o microorganismo inclui a conversão do oxig nio da célula pelo anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\bullet OH$), e possivelmente oxig nio singlete. Embora o mecanismo microbicida de macrófagos peritoneais de camundongos para responder a fagocitose ou as perturba es da membrana plasmática tenha mostrado a libera o de H_2O_2 e O_2^- , sugerindo que o mecanismo microbicida possa ser similar ao apresentado pelos neutrófilos (SASADA; JOHNSTON Jr, 1980; BOKOCH, 1995; GILLAMAIGNERE, 2003).

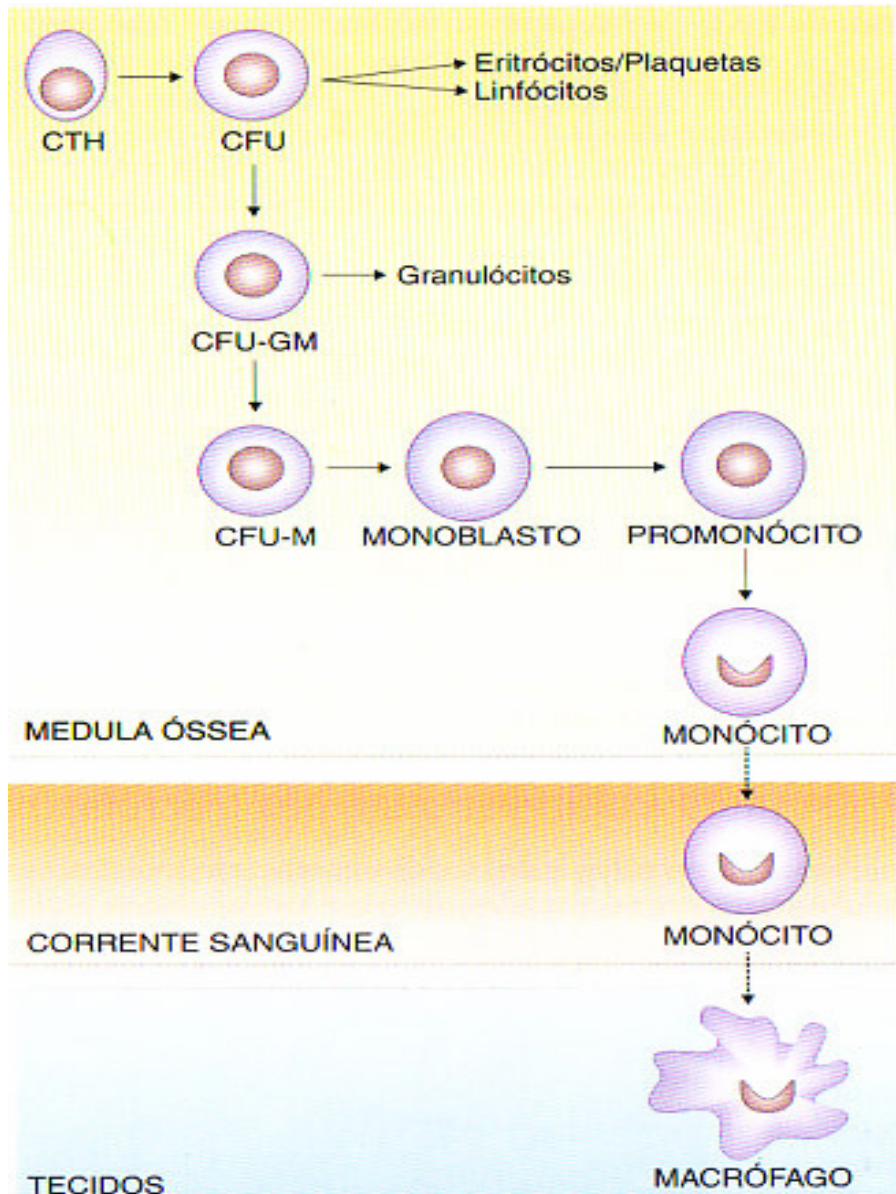
A produ o de óxido nítrico pelos macrófagos foi reportada pela primeira vez em 1985 por Stuehr e Marletta. Posteriormente foi revelado que óxido nítrico (NO)   um intermediário ativo também responsável pela atividade funcional microbicida de macrófagos (REMENTERÍA et al., 1995).

Cenci et al. (1993) e Vazquez-Torres et al. (1994) reportaram a morte de *C. Albicans* por macrófagos peritoniais murinos ativados por interferon- γ (IFN- γ), e a correlação desse evento com a produção de NO por macrófagos.

A fagocitose pode ser dividida em várias fases, quimiotaxia, adesão, fagocitose ou ingestão de partículas e pós-fagocitose - eventos estes que incluem a formação de vacúolos fagocíticos, degranulação e mudanças metabólicas específicas - conduzindo à morte intracelular ou degradação de substâncias inertes (partículas de látex e zymosan, por exemplo) (GROSS; NEWBERNE, 1980; SLAUSON; COOPER, 1990), sendo que o processo pode ocorrer por vias dependentes ou independentes do oxigênio.

Para que ocorra a fagocitose, as fases de reconhecimento e aderência ao elemento estranho são importantes. Na aderência, após a ativação de receptores para moléculas de adesão (fibronectina, vitronectina e laminina, entre outras) e presentes na superfície celular, ocorre rearranjo do citoesqueleto (LEWIS, 1986; LEWIS; MCGEE, 1992).

O antígeno tem papel central na resposta imune específica. Os antígenos das células T não interagem com o antígeno intacto inteiro, mas sim com um pequeno segmento de aminoácidos (antígeno peptídico) derivado do antígeno inteiro por proteólise, os quais se ligam a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) para geração do complexo peptídeo-MHC. As moléculas do MHC mantêm o antígeno peptídico preso dentro de uma fenda. O que é reconhecido pelo receptor da célula T, entretanto, é a combinação das estruturas formadas pelo antígeno peptídico e as paredes da fenda das moléculas do MHC (PEAKMAN; VERGANI, 1999). O reconhecimento desse complexo peptídeo-MHC é mediado por células T e/ou regulado por várias reações imune celular, eles também regulam a função das células B para produzirem antígenos protéicos responsáveis pela imunidade humoral que ocorre dentro do fagossomo e fagolisossomo. (HARDING, 1995; PEAKMAN; VERGANI, 1999).



Fonte: Carvalho; Buzato, 2005

Figura 2: Representação esquemática da diferenciação de macrófagos durante a vida adulta. Na medula óssea a célula-tronco hematopoética (CTH), após vários ciclos de divisão, originam células CFU que dão origem a precusores das células do sangue, entre elas a CFU-GM. Mais alguns ciclos de diferenciação darão origem a CFU-M, monoblastos e promonócitos. O resultado desse processo é a produção de monócitos que circulam pelo sangue e se estabelecem nos tecidos como macrófagos.

Tabela 1: Distribuição e nomenclatura de fagócitos mononucleares.

Localização	Denominação
Medula óssea	Precusores (monoblastos e promonócitos), monócito
Sangue periférico	Monócitos
Pulmão	Macrófagos alveolares
Tecido conjuntivo e pele	Histiócitos
Baço, gânglios linfáticos e timo	Macrófagos
Fígado	Células de kúpfer
Tecido ósseo	Osteoclastos
Rim	Células fagocíticas mesangiais
Sistema nervoso	Microglia
Cavidades serosas (pleura e peritônio)	Macrófagos

Fonte: Carvalho; Buzato, 2005.

As células do antígeno T são mediadas por duas classes de moléculas – MHC-classe I (MHC-I) e o MHC-classe II (MHC-II) – os quais utilizam distintos mecanismos de processamento de antígenos. A molécula MHC-II esta associada a uma cadeia invariável, a qual se liga o peptídeo a molécula de MHC-II dentro do retículo endoplasmático (ER) e contem sinais dentro do citoplasmático causando a formação da complexa cadeia invariável-MHC-II para o compartimento endocítico. A molécula do MHC-II tem sido também observada dentro do fagossomo e fagolisossomo (HARDING, 1995).

Os macrófagos, células dendríticas e células T são todos células “profissionais” apresentadoras de antígenos (APCs), sendo os macrófagos responsáveis pela fagocitose primária da APCs (células dentriticas pode apresentar função fagocítica). Esses peptídeos antigênicos são derivados de antígenos “exógenos” que são internalizados para o espaço extracelular ou “endógeno” sintetizado dentro da célula que tem como alvo o compartimento vacuolar (HARDING, 1995).

Desde que as moléculas de MHC-I não estão associadas com a cadeia invariável, estão livres para se ligar a peptídeos no ER e não se movem geralmente para

compartimentos endocíticos. Os antígenos que estão presentes no citosol (por exemplo: núcleo-proteína viral) parecem ser clivados por proteasomas para produzir os peptídeos que são transportados através de um transportador para a apresentação do antígeno (TAP) no lúmen do ER, onde ligam às moléculas de MHC-I. Depois que esses peptídeos estejam ligados, as moléculas de MIC-I e de MIC-II são transportadas à superfície da célula onde serão reconhecidas por células T (HARDING, 1995) (**Figura 3**).

Os macrófagos são células especializadas que tem o poder de internalizar grande número de materiais particulado, como bactérias, protozoários ou partículas inertes não-degradadas. Durante esse processo essas partículas são seqüestradas pela membrana para o interior da célula unindo-se as organelas presentes no citoplasma para formar o fagossomo os quais exibe uma composição bioquímica semelhante à membrana plasmática. O fagossomo é extensivamente modificado através de reações químicas para que ocorra a degradação e morte do microorganismo internalizado (DESJARDINS et al., 1994).

Três processos podem estar envolvidos na transformação bioquímica do fagossomo: Primeiro - moléculas são removidas do fagossomo por eventos via reciclagem; Segundo – novas proteínas são adicionada ao fagossomo através do caminho biosintético ou via recrutamento para o citoplasma. Neste processo o fagossomo envolve a microbactéria e recruta do citoplasma o próton ATPase para a acidificação da organela e para que ocorra o processo final para atividade da hidrolase; Terceiro – o fagossomo recebe proteínas durante esse processo de fusão com as organelas endocíticas. Nesta rede de eventos e processo de transformação ocorrem novas propriedades funcionais pelo fagossomo que provavelmente está incluso a habilidade de fusão das organelas endocíticas, ocorrendo a degradação e morte do microorganismo (DESJARDINS et al., 1994).

Na década de 1920, os estudos de FENN mostraram que a fagocitose requer o espraiamento do citoplasma da célula sobre a superfície da partícula (SOUSA-E-SILVA et al., 1996; SAMPAIO et al., 2001). Posteriormente, North (1978) demonstrou a ocorrência do fenômeno de espraiamento de macrófagos peritoniais de cobaias, em meio contendo soro, quando colocadas em superfícies recobertas com complexo antígeno-anticorpo.

Rabinovitch e Destefano (1973), Bumol e Douglas (1977) demonstraram que o espraiamento pode ser induzido pelo tratamento de macrófagos peritoniais de ratos com enzimas proteolíticas, sendo o processo dependente de magnésio.

O espraiamento de macrófagos requer a presença de alguns íons sendo o principal, o magnésio (Mg^{2+}) ou zinco (Zn^{2+}) (FRIEDERICH; TU, 1971) enquanto o cálcio (Ca^{2+}) é considerado o menos efetivo. Esse processo é dependente da temperatura, sendo favorecido pelo pH ácido do meio e a diminuição do citocromo B ou pelo soro (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973). Três mecanismos são essenciais para que ocorra o espraiamento de macrófagos: a) alteração estrutural e funcional em sua membrana; b) efeitos sobre o substrato; c) efeitos intracelulares. Essas alterações resultam no aumento de adesividade da membrana e/ou deformação da célula (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973).

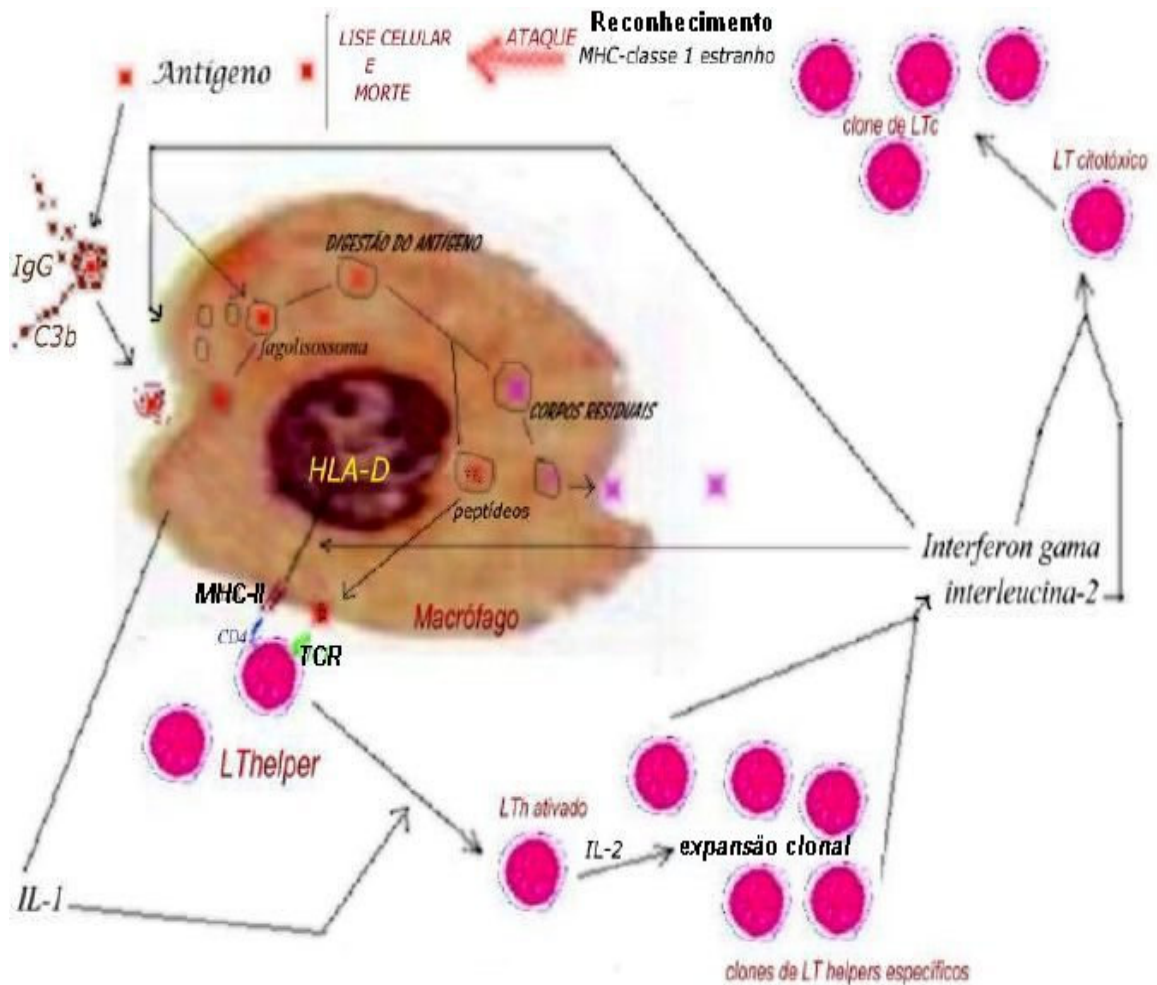
Os macrófagos são conhecidos como as células de limpeza do organismo, Esta atividade conhecida desde o tempo de Metchnikoff, é uma das funções mais importante (CARVALHO; BUZATO, 2005).

Os macrófagos também fagocitam células senescentes do organismo. Estima-se que sejam eles os responsáveis pela retirada diária da circulação de cerca de 10^{11} hemácias envelhecidas (CARVALHO; BUZATO, 2005).

Uma outra importante função dos macrófagos relaciona-se com sua capacidade de produzir e secretar mais de cinquenta substâncias biologicamente ativas. Algumas são enzimas hidrolíticas que degradam componentes do tecido conjuntivo, outras são citocinas que afetam vários tipos celulares e algumas são mediadoras da inflamação, tais como proteínas do complemento e prostaglandinas (NATHAN, 1987; CARVALHO; BUZATO, 2005).

Para compreender a complexidade e os diversos efeitos dos mediadores biológicos produzidos pelos macrófagos é necessário lembrar que a maioria dessas substâncias tem efeitos pleiotrópicos, isto é: i) um único produto biológico pode ter mais de uma função; ii) uma atividade biológica pode refletir a ação de vários produtos agindo simultaneamente; iii) fatores são produzidos exclusivamente pelos macrófagos; e iv) algumas substâncias são produzidas e secretadas continuamente, enquanto outras são apenas liberadas após estímulos extensos (isto é, os macrófagos devem estar estimulados ou ativados) (NATHAN, 1987; CARVALHO; BUZATO, 2005).

A **Tabela 2** lista alguns dos principais fatores e sua importância em processos fisiológicos e patológicos.



Fonte: RESPOSTA ..., 2006.

Figura 3 - Este esquema demonstra o processo da fagocitose (resposta imune inespecífica) contra o antígeno vermelho, e os processos da digestão intracelular.

A fagocitose é opsonizada (facilitada) pelo C3b(complemento) e IgG. Da digestão do fagolisossoma sai uma vesícula contendo peptídeos (epítomos) que é levada à superfície do macrófago e apresentada ao linfócito T helper-1. Cada epítomo se liga a um LThelper, no receptor TCR, que vai ativar o linfócito (unido ao CD3). O MHC-II se liga ao CD4. O macrófago ativado vai liberar IL-1 (co-estimulador) que vai ativar os LT helpers, que vão produzir e liberar a IL-2, que estimula a expansão clonal (proliferação) dos linfócitos juntamente com o interferon gama (IFN-gama) que vai estimular a fagocitose e também é capaz de ativar o mecanismo de transcrição do gene HLA-D que é o gene do MHC-classe II. Os linfócitos T citotóxicos intensamente estimulados pelo IFN-gama e IL-2 farão a RIC (resposta imune celular) específica. Os LTC ativos e vão reconhecer o MHC-1 estranho presente em células rejeitadas, tumorais ou infectadas por vírus e causar a morte (lise celular) destes.

A lista de substâncias produzidas pelos macrófagos será ainda mais extensa com o desenvolvimento de novos métodos de cultura e as análises genômica e proteômica (CARVALHO; BUZATO, 2005).

Tabela 2: Substâncias biologicamente ativas produzidas pelos macrófagos.

Produtos	Funções
Interleucinas 1 e 6 e TNF- α (fator de necrose tumoral α)	Inflamação e febre
Elastase, colagenase e FGF (fator de crescimento de fibroblastos)	Reorganização tecidual
Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (H ₂ O ₂ , -O ₂ , NO)	Toxicidade para microrganismos e tumores
VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), FGF, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)	Angiogênese
Fatores de coagulação II, VII, IX, X e XIII, apoproteína III, ativadores de protrombina e plasminogênio	Coagulação
Interferon α	Atividade antiviral
M-CSF, GM-CSF e G-CSF	Diferenciação de macrófagos
TGF- β (fator transformador de crescimento)	Antimitótico de linfócitos

Fonte: NATHAN, 1987; CARVALHO; BUZATO, 2005.

1.3 Justificativa

Nosso grupo de pesquisa, desde 1993, vem se dedicando ao estudo de toxinas (microcystina-LR) (NOBRE et al., 1999) e venenos de serpentes brasileiras, *Bothrops jararacaca* (MONTEIRO; FONTELES, 1999), *Bothrops jararacussu* (HAVT et al., 2001), *Bothrops moojeni* (BARBOSA et al., 2002), *Crotalus durissus terrificus* (MONTEIRO et al., 2001), *Crotalus durissus cascavella* (MARTINS et al., 1998, MARTINS et al., 2002), veneno do peixe *Thalassophryne nattereri* e estudo dos venenos crotálicos e suas frações, bem como as lectinas, em relação aos efeitos renais, cardiovasculares e intestinais (AMORA et al., 2006).

Estudos demonstram que grande parte das PLA₂ purificadas de veneno de serpentes afetam a agregação plaquetária (VALENTIM; LAMBEAU, 2000), mas foi baseado nos efeitos que as fosfolipases exercem na proliferação celular e na atividade antibacteriana que nosso grupo resolveu estudar e caracterizar aspectos funcionais de macrófagos peritoniais de ratos, bem como as alterações hematológicas causadas pelo veneno e frações.

Em estudos com o veneno da *B. jararacussu* (HAVT et al., 1999) foi observado alterações renais e hematológicas com eritrocitopenia, trombocitopenia, redução de proteínas plasmáticas, neutrofilia e monocitose sem desvio a esquerda no leucograma.

O interesse deste projeto reside em estudar o efeito sobre as alterações do hemograma, traçando o perfil hematológico e alterações funcionais em macrófagos, espraiamento, atividades fagocítica e fungicida, causadas pelos venenos de *Crotalus durissus cascavella* – *Ce* (Cdcc); *Crotalus durissus cascavella* – *Ma* (Cdcem); *Crotalus durissus collilineatus* (Cdcol) e *Crotalus durissus ruruima* (Cdru), A *C.d.ruruima* foi o veneno bruto que apresentou maiores alterações durante nossa padronização, sendo incluído duas de suas frações: a crotoxina (CTXru) e a fosfolipase A₂ (PLA₂ru).

Este trabalho, portanto, propõe continuar o estudo dos venenos crotálicos e suas frações, na regulação das alterações do hemograma e da atividade funcional de macrófagos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais:

Avaliar os efeitos dos venenos das serpentes *Crotalus durissus cascavella* – Ce; *Crotalus durissus cascavella* – Ma; *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus ruruima* e as frações, crotoxina e fosfolipase A₂, nos processos de espraiamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos em camundongos.

2.2 Específicos:

- a) Estudar as alterações hematológicas dos venenos brutos das serpentes *Crotalus durissus cascavella* – Ce; *Crotalus durissus cascavella* – Ma; *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus ruruima* e as frações; crotoxina e fosfolipase A₂;
- b) Avaliar atividade fagocítica e o espraiamento dos venenos brutos das serpentes *Crotalus durissus cascavella* – Ce; *Crotalus durissus cascavella* – Ma; *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus ruruima* e as frações; crotoxina e fosfolipase A₂;
- c) Estudar atividade fungicida dos venenos brutos das serpentes *Crotalus durissus cascavella* – Ce; *Crotalus durissus cascavella* – Ma; *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus ruruima* e as frações; crotoxina e fosfolipase A₂, em relação ao grupo controle;

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, pesando 25 a 30 gramas (**Figura 4**), mantidos desde o início do experimento sob as mesmas condições ambientais e com ciclo de luz de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.



Figura 4 – Camundongos sendo pesados.

3.2 Veneno

Os venenos liofilizados foram gentilmente cedidos por: da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (Cdcoll) pela Dr^a. Marta R. Magalhães da Universidade Católica de Goiás; o veneno da *Crotalus durissus cascavella* – Ce (Cdcc) pela Prof^a. Dr^a. Diva Verdosa Nojosa, diretora do NUROF (Núcleo Regional de Ofiologia) da UFC, os venenos da *Crotalus durissus ruruima* (Cdru) e as frações; Crotoxina (CTXru) e Fosfolipase A₂ (PLA₂ru) e *Crotalus durissus cascavella* – Ma (Cdcma) pelo Prof. Dr. Marcos H. Toyama da UNESP/UNICAMP. Todos os venenos foram armazenados a -20°C. Os venenos foram dissolvidos em solução salina (0,9% v/v) no momento do uso e

administrados por via peritoneal nas seguintes doses: Cdcc-120 μ g/Kg; CdcM-50 μ g/Kg; Cdcol-27 μ g/Kg; Cdru-20 μ g/Kg; CTXru-10 μ g/Kg; PLA₂ru-10 μ g/Kg. Os venenos foram administrados 2:00h antes de serem coletadas as células peritoneiais.

3.3 Sangue

Os animais foram anestesiados em câmara anestésica saturada com éter etílico (**Figura 5**) duas horas após a administração do veneno sendo, a seguir colhidas amostras sanguíneas através de punção do plexo orbital (**Figura 6**) e acondicionados em tubos plásticos de hemólise, utilizando-se como anticoagulantes a heparina (Liquemine® Roche) na concentração de 50 UI/mL. O sangue foi mantido em banho de gelo pelo período máximo de 2 horas.



Figura 5: Camundongo anestesiado em câmara anestésica saturada com éter etílico.

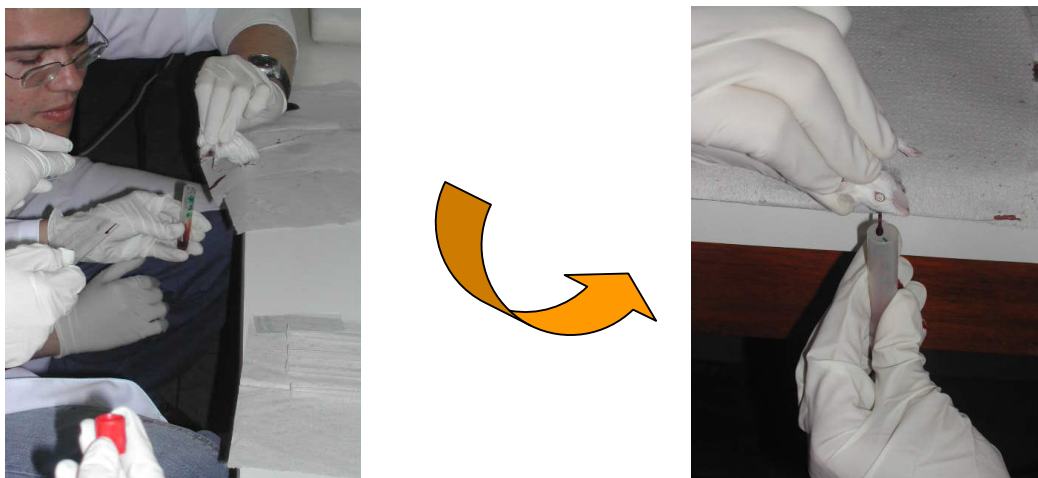


Figura 6: Coleta de amostra sanguínea através de punção do plexo orbital.

3.4 Obtenção de Macrófagos Peritoniais

3.4.1 Obtenção de Macrófagos Residentes

Os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. A cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de tampão salina fosfato gelado (PBS) Dubelcco, pH 7,4, estéril, contendo 20 UI heparina/mL (Liquemine® Roche). Após leve massagem abdominal, aspirou-se o líquido peritoneal com pipeta tipo Pasteur, o qual foram acondicionados em tubos plásticos (Figura 7), estéreis e mantidos em banho de gelo até a realização das provas, no prazo máximo de 2 horas.



Figura 7: Coleta de macrófagos na cavidade peritoneal.

3.4.2 Obtenção de Macrófagos Estimulados

Os animais foram inoculados intra- peritonealmente com os venenos: Cdcc - 120µg/Kg; Cdcn - 50µg/Kg; Cdcol - 20µg/Kg e Cdru - 20µg/Kg e as frações; CTXru - 10µg/Kg e PLA₂ru - 10µg/Kg, após 2 horas foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. A cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de tampão salina fosfato gelado (PBS) Dubelcco, pH 7,4, estéril, contendo 20 UI heparina/mL (Liquemine® Roche). Após leve massagem abdominal, aspirou-se o líquido peritoneal com pipeta tipo Pauster, o qual foi acondicionado em tubos plásticos,

estéreis e mantido em banho de gelo até a realização das provas, no prazo máximo de 2 horas.

3.5 Contagem do Número de Células Presentes na Cavidade peritoneal

A contagem total das células foi realizada em câmara de Neubauer (**Figura 8**) e a viabilidade celular determinada através da solução de Azul de Tripán a 0,1% (KING et al., 1959; FALLON et al., 1962; CZARNETZKY et al., 1975;) sendo consideradas viáveis as amostras contendo viabilidade maior que 95%. Foram contadas 200 células e consideradas viáveis aquelas que não permitiam a penetração do corante em seu interior. A análise morfológica e a contagem diferencial das células foram realizadas em lâminas obtidas após a citocentrifugação (**Figura 9**) das suspensões celulares (900 rpm, por 5 minutos) e submetidas à coloração de May-Grunwald-Giemsa (**Figura 10**), modificada (ROSENFELD, 1947). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.



Figura 8: Contagem total das células na câmara de Neubauer.



Figura 9: Lâminas sendo confeccionada na citocentrífuga.



Figura 10: Lâminas coradas pelo May-Grunwald-Giemsa, modificada (ROSENFELD, 1947).

3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

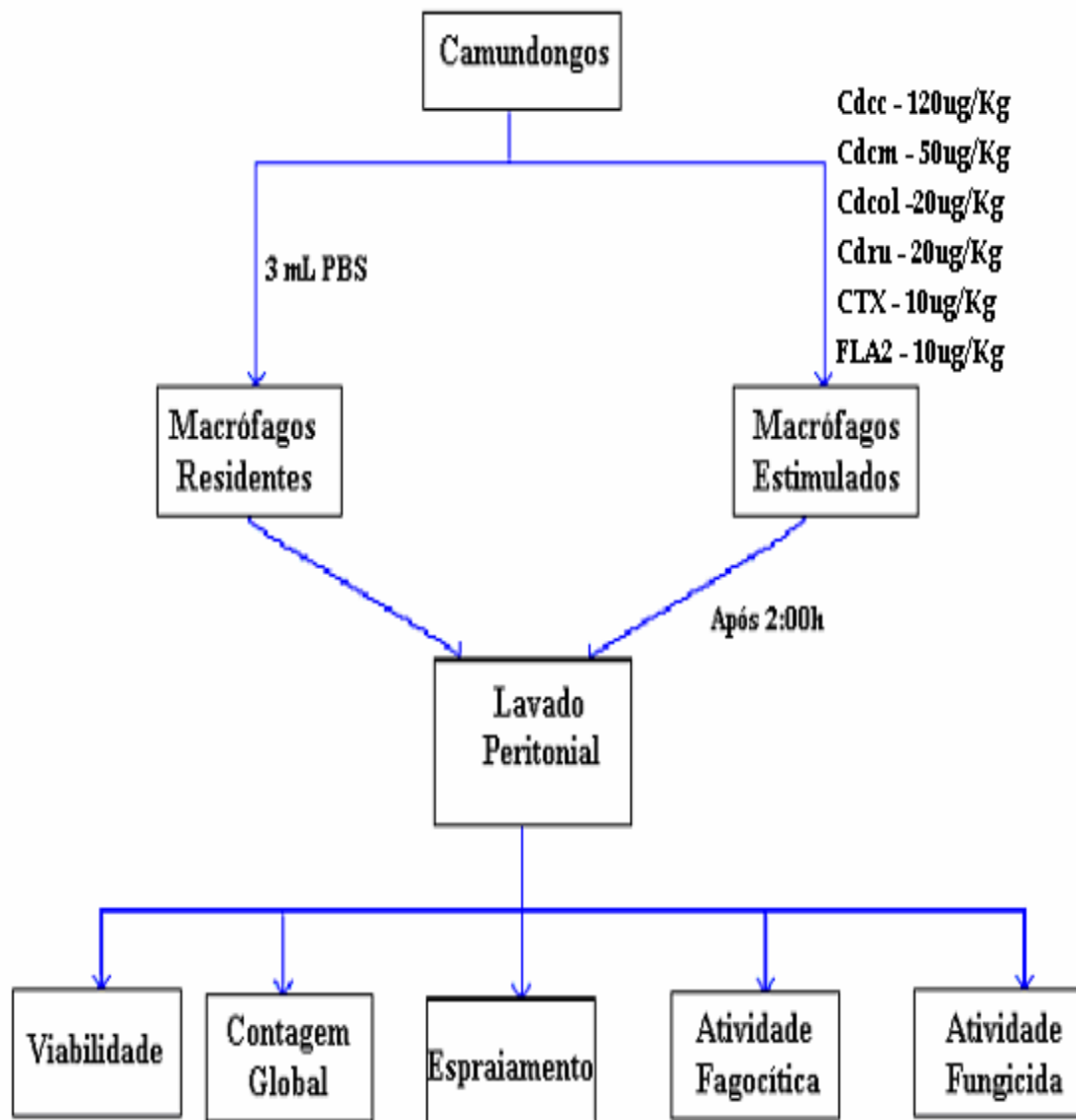


Figura 11: Protocolo Experimental

Legenda:

Cdcc- *Crotalus durissus cascavella* - Ceará

CdcM - *Crotalus durissus cascavella* - Maranhão

Cdcol - *Crotalus durissus collilineatus*

Cdru - *Crotalus durissus ruruima*

CTX ru – Crotoxina

PLA₂ru– Fosfolipase A₂

3.7 ESQUEMA EXPERIMENTAL

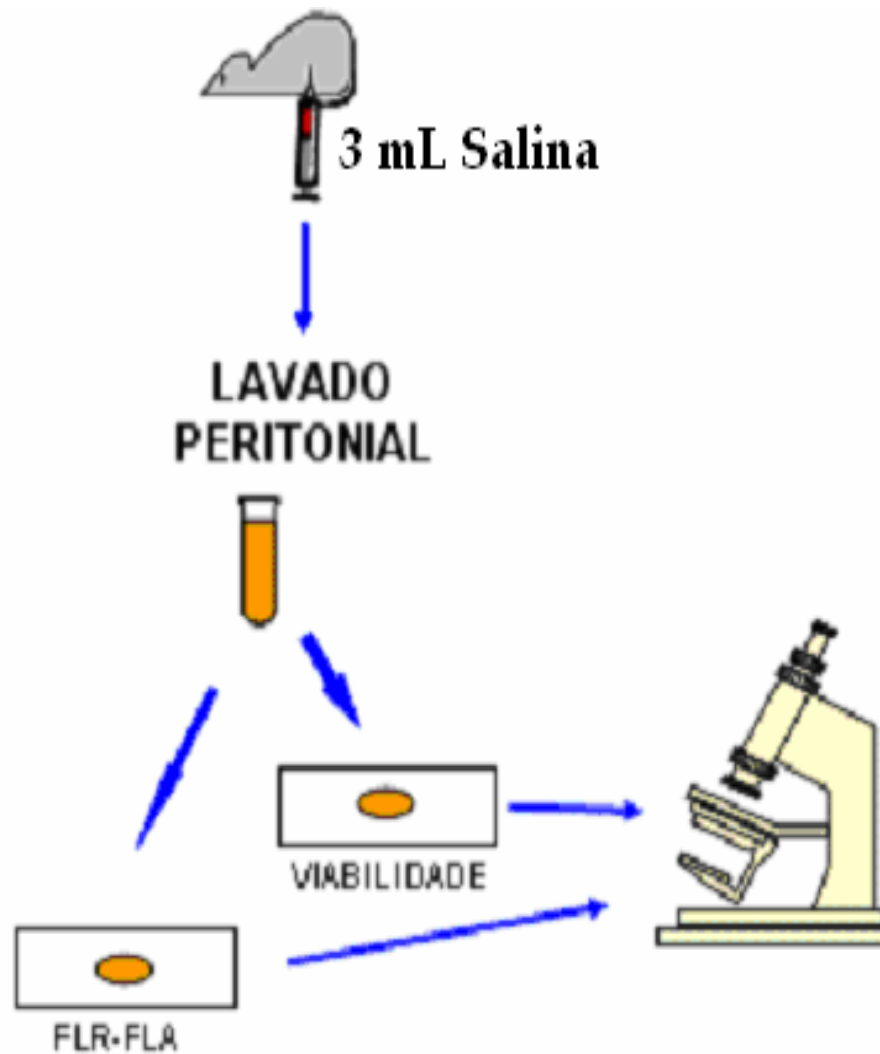


Figura 12: A cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de tampão salina fosfato gelado (PBS) - Coleta de Macrófagos Residentes.

Legenda:

FLR – Forma leucocitária relativa.

FLA – Forma leucocitária absoluta.

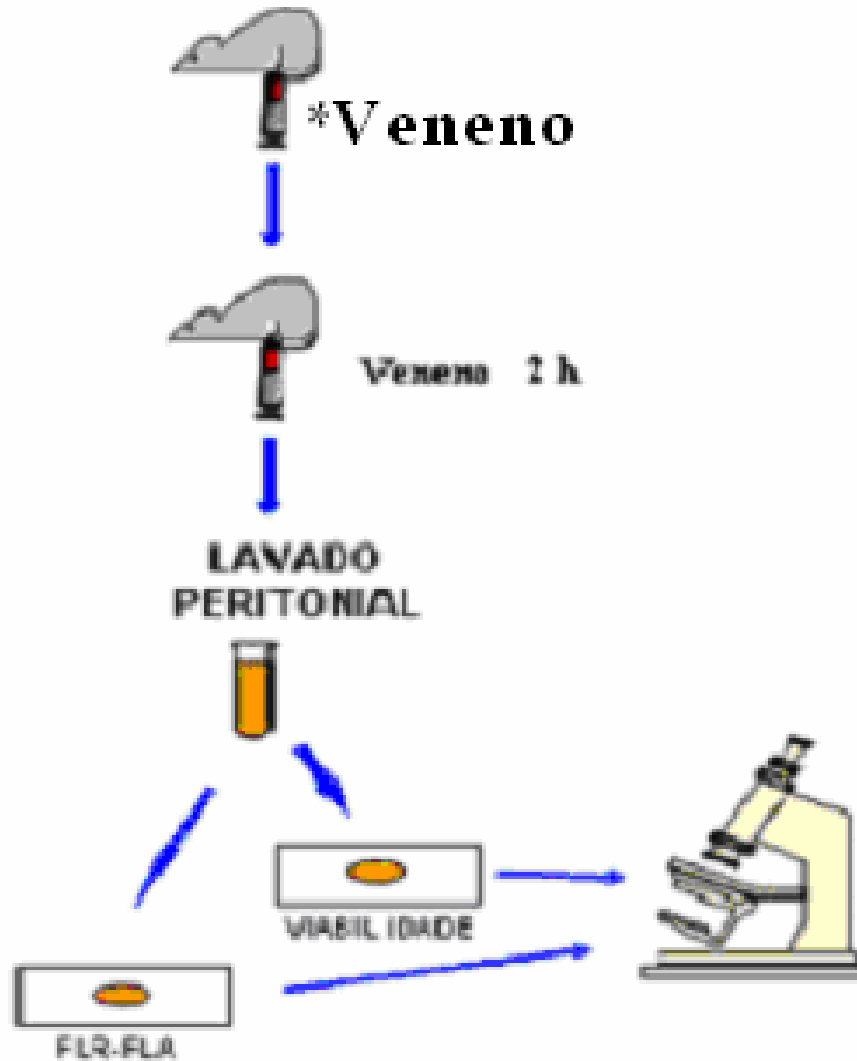


Figura 13: A cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de tampão salina fosfato gelado (PBS)

* Coleta de Macrófagos Estimulados (*Cdcc*-120 μ g/Kg; *Cdcm*-50 μ g/Kg; *Cdcol*-27 μ g/Kg; *Cdru*-20 μ g/Kg; *CTXru*-10 μ g/Kg; *PLA₂ru*-10 μ g/Kg)

Legenda:

FLR – Forma leucocitária relativa.

FLA – Forma leucocitária absoluta.

3.8 Teste de Espreadimento de Macrófagos Peritoniais

A capacidade de espreadimento de macrófagos (**Figura 14**) foi estimada de acordo com o método descrito por Rabinovitch e Destefano, 1973. Em lamínulas de vidro de 18 x 18mm, previamente lavadas e esterilizadas, colocou-se sobre as mesmas 200 µL da suspensão de macrófagos peritoniais, sendo as lamínulas mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as mesmas foram lavadas com solução tampão PBS Dubelcco, pH 7,4, estéril, e recobertas com 4 mL do meio de cultura RPMI 1640 estéril, (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1967) e incubadas durante 1:00h em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação, as lamínulas foram novamente lavadas com solução tampão PBS Dubelcco, pH 7,4, estéril, e a seguir fixadas, durante 20 minutos, com glutaraldeído a 2,5% (SIGMA[®]). As lamínulas foram submetidas à coloração de May-Grunwald-Giemsa, modificada (ROSENFELD, 1947), sendo contadas 200 células em objetiva de imersão, diferenciando-se as células aderidas daquelas espreadas, sendo o resultado expresso percentualmente. Considera-se como sendo células espreadas àquelas que aderirem à superfície de vidro emitindo pseudópodes, e quando observadas ao microscópio óptico lembrar a imagem de um "ovo frito" (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973).

ESPRAIAMENTO

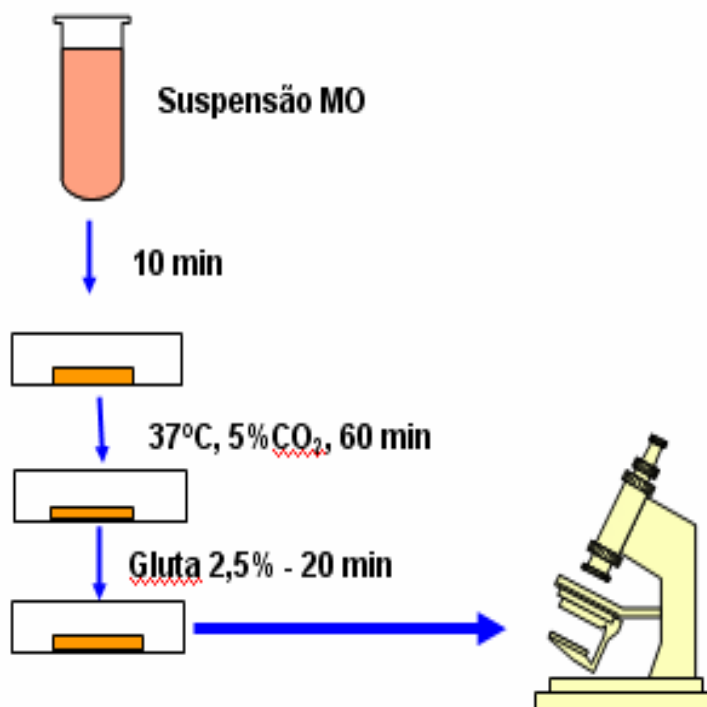


Figura 14: Espriamento de macrófagos.

3.9 Determinação do Teste de Fagocitose e da Atividade Fungicida, "In Vivo", (Killing) de Macrófagos Peritoniais

3.9.1 Obtenção de Soro Homólogo Normal (NHS)

A coleta de sangue foi realizada em 6 camundongos normais da linhagem Swiss, machos, adultos, por punção do plexo orbital. Após retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (4^o C, 3000 rpm, por 15 minutos). O soro foi separado, constituindo-se um "pool", o qual foi aliqüotado em volumes de 2 mL e congelado a -70° C. Este "pool" foi utilizado para posterior opsonização de *Candida albicans*. Todo o processamento foi realizado em condições assépticas e o material utilizado, previamente esterilizado.

3.9.2 Preparo e Opsonização da Suspensão de *Cândida albicans*

As leveduras foram obtidas após cultura de 12 horas em meio de ágar-Sabouroud (**Figura 15**). Preparou-se uma suspensão (**Figura 16**) de leveduras em 1 mL de tampão PBS Dubelcco, pH 7,4, estéril, (suspensão A) e a seguir uma suspensão (B) contendo: 1 mL da suspensão A, 5 mL de PBS Dubelcco, pH 7,4, estéril e 1 mL de NHS (ítem 4.9.1). As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e sua viabilidade avaliada através da solução aquosa de azul de metileno 0,1% (somente utilizadas suspensões de leveduras que apresentaram viabilidade acima de 95%). A suspensão B foi incubada a 37° C, 30 minutos, sob agitação contínua a 10 rpm e ajustada para 4×10^7 *Candida albicans* / mL.

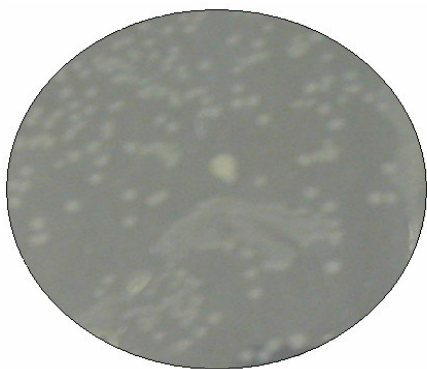


Figura 15: *Candida albicans* em meio ágar-Sabouroud .



Figura 16: Preparação da suspensão de *C. albicans*.

3.9.3 Obtenção da Suspensão de Macrófagos Peritoniais

Os macrófagos peritoniais foram obtidos segundo os ítems 3.4.1 e 3.4.2. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para 4×10^6 células / mL com solução tampão PBS Dubelcco, pH 7,4, estéril e mantida em banho de gelo (suspensão C).

3.9.4 Ensaios

Em tubos plásticos, estéreis, adicionamos 500 µL da suspensão de macrófagos (suspensão C) e 500 µL da suspensão opsonizada de *Candida albicans* (suspensão B), mantendo-se uma proporção de 1 célula/10 leveduras (item 3.5), constituindo-se assim a suspensão D. Os tubos foram incubados à 37°C, em sistema rotatório, à velocidade de 10 rpm, durante 30, 60, 90 e 120 minutos. O controle da reação constou de tubos contendo 500 µL de PBS Dubelcco, pH 7,4, estéril (Suspensão A), e de 500 µL da suspensão de macrófagos (Suspensão C).

Após os tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, as lâminas foram preparadas pela citocentrifugação de alíquotas de 50 µL da suspensão D, imediatamente fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947).

3.9.4.1 Avaliação da Fagocitose

Para avaliação da fagocitose foram contadas, no mínimo, 200 células, sendo considerados contendo atividade fagocítica os macrófagos que apresentaram mais de três *Candida albicans* internalizadas. Os valores foram expressos em percentagem.

3.9.4.2 Avaliação da Atividade Fungicida ("Killing")

A atividade fungicida foi avaliada através da técnica de coloração proposta por Herscowitz et al. (1981), modificada por Corazzini (1993). Nesta técnica, as leveduras vivas, intracelulares, coram-se em azul pelo corante de May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), enquanto que as leveduras mortas não se coram. A atividade fungicida foi avaliada contando-se, ao menos, 200 macrófagos que fagocitam *Candida albicans* e foram expressas através de "score" conforme critério estabelecido por Corazzini (1993) e abaixo descrito (**Tabela 03**)

3.10 Estatística

Utilizou-se um computador PC Pentium (333 Hz) e o programa GraphPad Prisma 3.0 para análise estatística dos dados, e elaboração de gráficos e tabelas. Os

dados foram expressos por média \pm E.P.M. e comparados com o grupo controle utilizando a teste t de Student e significância de *p < 0,05.

Tabela 03: Critérios estabelecidos por Corazzini (1993) para expressar o “score” de *Candida albicans* fagocitadas.

RESULTADO	" SCORE "
Nº de Macrófagos sem <i>Candida albicans</i> mortas	x 0
Nº de Macrófagos com 1 a 2 <i>Candida albicans</i> mortas	x 1
Nº de Macrófagos com 3 a 4 <i>Candida albicans</i> mortas	x 2
Nº de Macrófagos com + 4 <i>Candida albicans</i> mortas	x 3

ATIVIDADE FAGOCÍTICA E FUNGICIDA

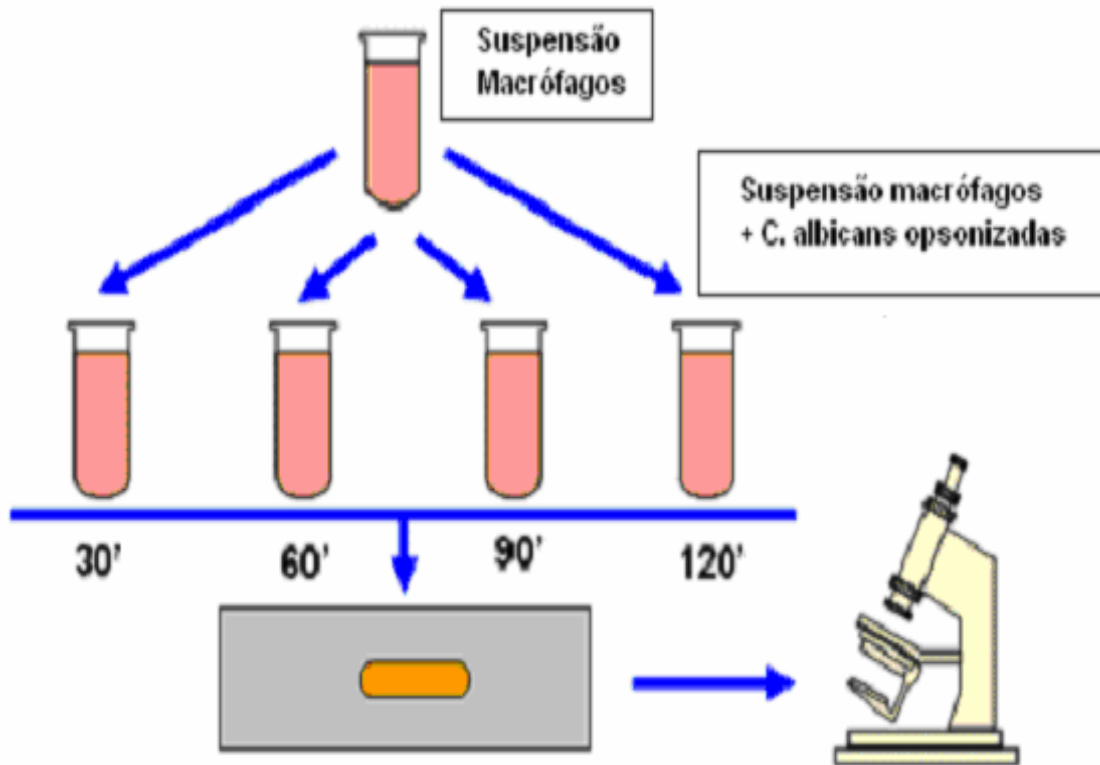


Figura 17: Atividade fagocítica e fungicida com *Candida albicans*.

LEGENDA:

- 30' – 30 minutos
- 60' – 60 minutos
- 90' – 90 minutos
- 120' – 120 minutos

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Foram realizados o Hemograma (Eritrograma e Leucograma) no sangue periférico, a contagem total e diferencial das células presentes no líquido colhido na cavidade peritoneal, bem como os testes de espriamento e a atividade fagocítica e fungicida frente a *Cândida albicans*. Os exames acima citados foram realizados no grupo Controle (sem estímulo) e nos grupos ativados com venenos da *Crotalus durissus cascavella* – Ce (120µg/Kg); *Crotalus durissus cascavella* – Ma (50µg/Kg); *Crotalus durissus collilineatus* (27µg/Kg) e *Crotalus durissus ruruima* (20µg/Kg) e as frações; Crotapotina (10µg/Kg) e Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram avaliados pelo programa Graph Prism. Para a elaboração das Tabelas e Figuras optamos para utilizar a média ± erro padrão das médias (E.P.M.). Os dados foram submetidos a análises estatísticas do teste t-Student e feito à comparação entre o Controle e os diferentes grupos com significância de 5%. As tabelas encontram-se reunidas em ANEXO.

4.1 Eritrograma

Com relação à contagem de Hemácias (**Figura 18, Tabela 10**), praticamente não houve diferença entre os grupos e todas as contagens se apresentaram dentro da faixa de normalidade. Com relação à dosagem de hemoglobina (**Figura 19, Tabela 10**) os grupos tratados com a Cdru e CTXru apresentaram resultados com significância estatística. O valor do volume hematócrito apresentou valores mais elevados e com significância estatísticas para os grupos tratados com Cdcmm (**Figura 20, Tabela 10**).

Nos valores dos índices hematimétricos, o Volume Corpuscular Médio (VCM) (**Figura 21, Tabela 10**) apresentou resultados com significância estatística apenas nos animais inoculados com o veneno da *Cascavella* do Maranhão e do Ceará (aumentados) e nos inoculados com CTXru e PLA₂ru (reduzidos). O valor de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) (**Figura 22, Tabela 10**) apresentou significância estatística apenas nos animais inoculados com o veneno da *Cascavella* do Ceará (aumentado) e os valores da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) (**Figura 23, Tabela 10**) foram reduzidos apenas para os grupos inoculados com os venenos da *Cascavella* Maranhão e Ceará. Vale salientar que apenas 16,6% dos

animais estudados apresentaram hemólise após coleta do sangue, embora sem significância estatística.

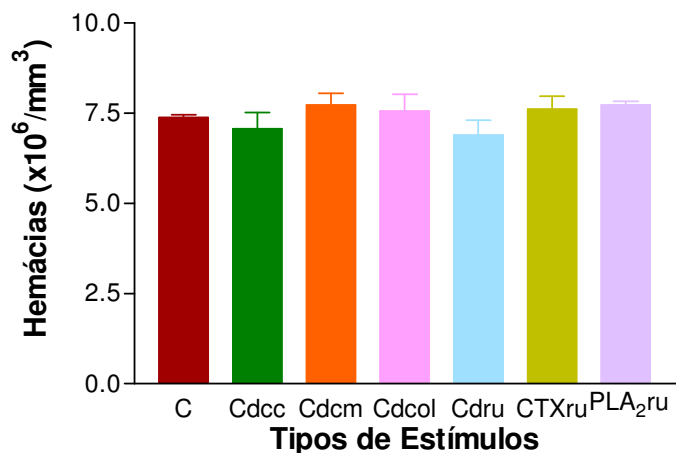


FIGURA 18: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de Hemácias.

Legenda: C=Controle; cá (120µg/Kg); cão (50µg/Kg); c(27µg/Kg); car (20µg/Kg); CTXru=Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru=Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

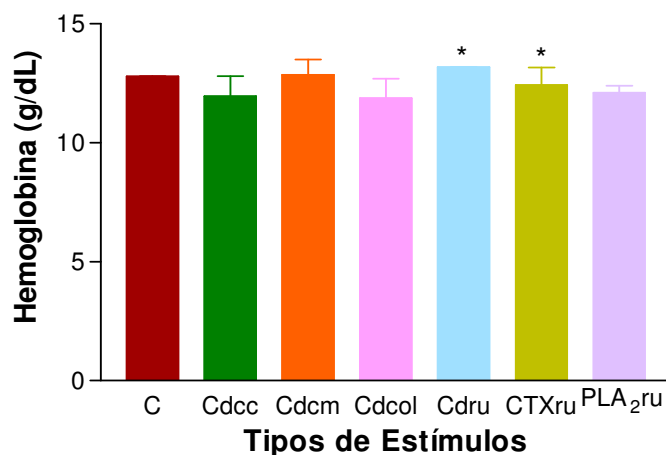


FIGURA 19: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a concentração de Hemoglobina.

Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

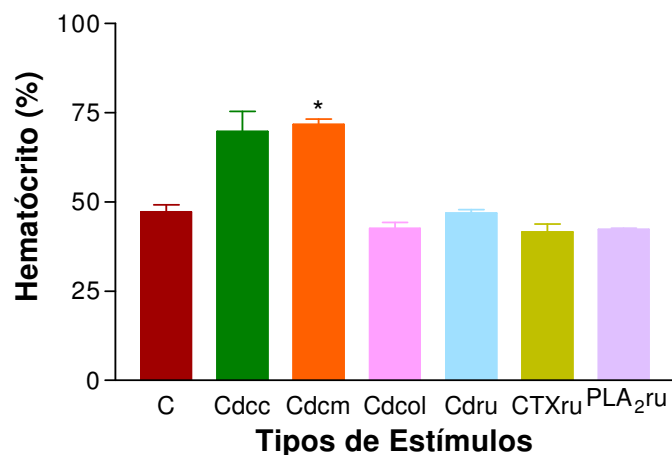


FIGURA 20: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o valor do volume hematócrito. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdcm = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

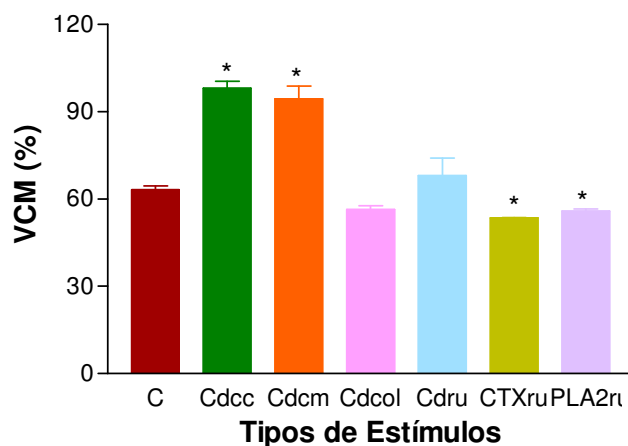


FIGURA 21: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o Volume Corpuscular Médio (VCM). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdcm = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *Cdruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

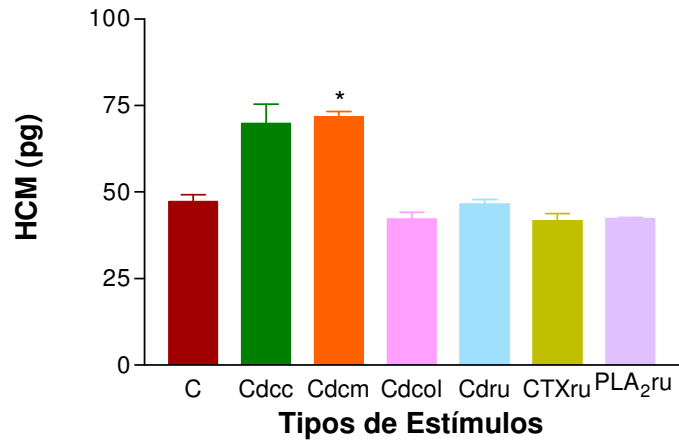


FIGURA 22: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Hemoglobina Corpuscular Média (HCM). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavela*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavela*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

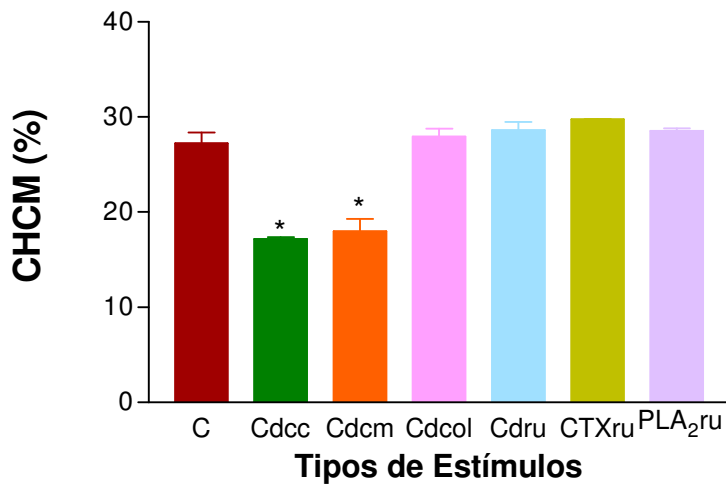


FIGURA 23: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavela*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavela*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle

Foram encontradas alterações morfológicas das hemácias, microcitose, macrocitose, presença de policromasia em 100% e Howell Jolly (**Figura 24**).

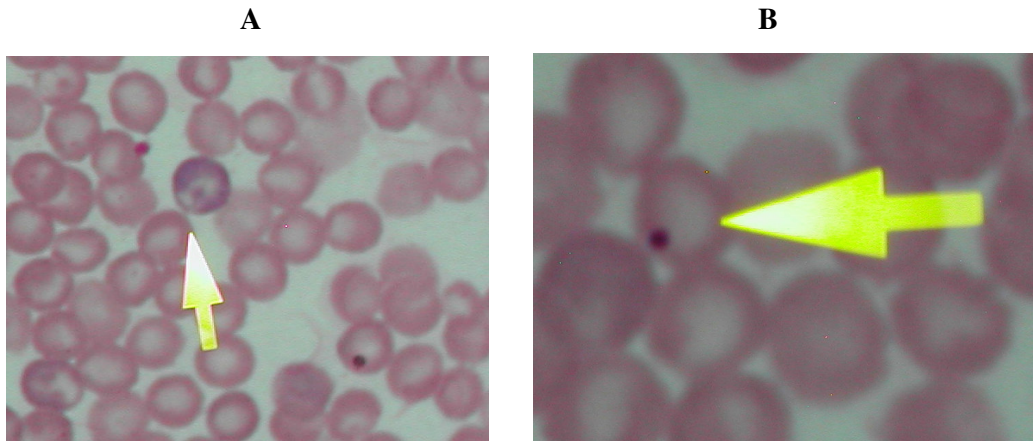


Figura 24: Fotomicrografia das figuras A - Policromasia e B - Howell-Jolly, coloração de May-Grunwald-Giemsa, aumento de 1000x.

4.2 Contagem Global de Leucócitos no Sangue

Na análise do leucograma (**Figura 25, Tabela 11**), observamos na contagem global de leucócitos uma significativa redução do número de leucócitos nos animais inoculados com venenos da *Cascavella* do Ceará e Maranhão e na *C.d.ruruima*.

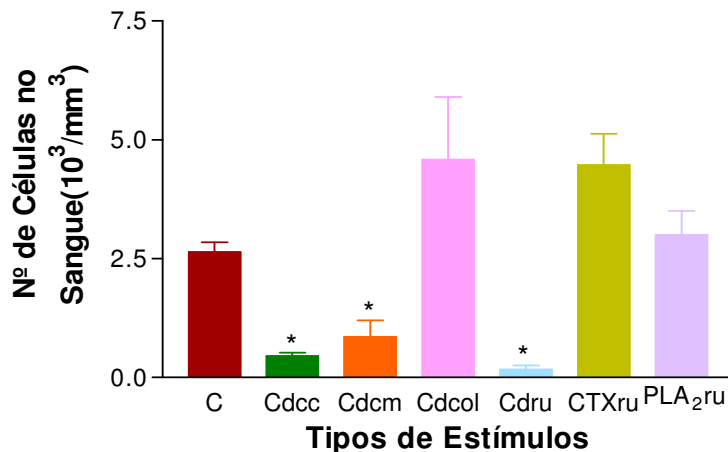


FIGURA 25: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de Leucócitos no Sangue. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

4.2.1 Contagem de Leucócitos no Sangue Expressa em Percentagem

Ao observarmos a **Tabela 12** verificamos aumento significativo de neutrófilos na forma em anel (**Figuras 26**) apenas nos animais inoculados com o veneno da *Cascavella* do Maranhão; todos os estímulos induziram aumento na fase de neutrófilos segmentados, porém sem significância estatística (**Figuras 27**). Nos animais inoculados com veneno da *C.d.collilineatus* o número de eosinófilos foi significativamente reduzido (**Figuras 28**).

Os linfócitos foram às células predominantes no sangue periférico dos camundongos estudados e, independente do estímulo, não houve diferença significativa entre os grupos quer no número de linfócitos quer no de monócitos (**Figuras 29 e 30**, respectivamente). Na **Figura 31** estão representados a celularidade no sangue.

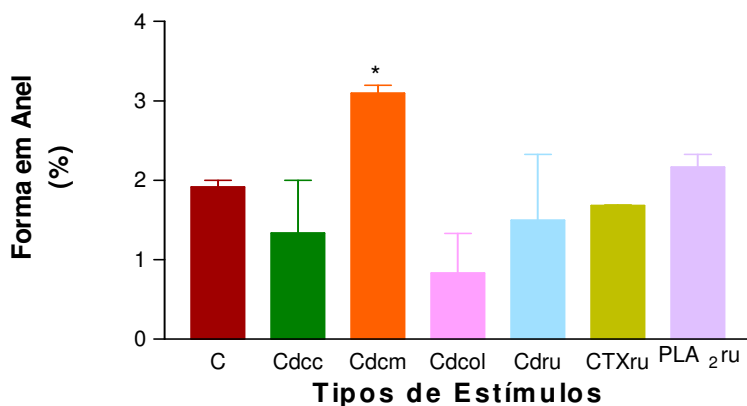


FIGURA 26: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de neutrófilos em forma de anel (valores expressos em porcentagem). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

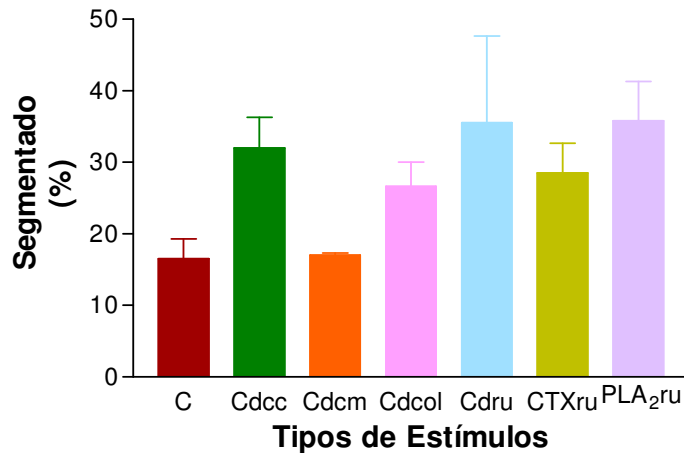


FIGURA 27: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de neutrófilos segmentados (valores expressos em porcentagem. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

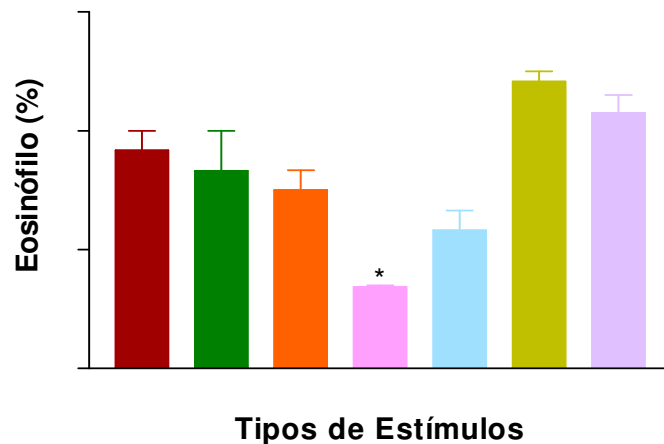


FIGURA 28: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de eosinófilos (valores expressos em porcentagem). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

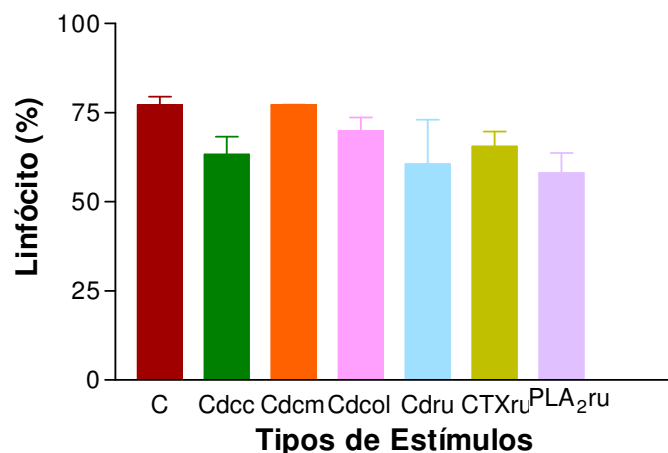


FIGURA 29: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de linfócitos (valores expressos em porcentagem). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120 μ g/Kg); Cdcm = *C.d.cascavella*-Maranhão (50 μ g/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27 μ g/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20 μ g/Kg); CTXru = Crotoxina (10 μ g/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10 μ g/Kg). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p \leq 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

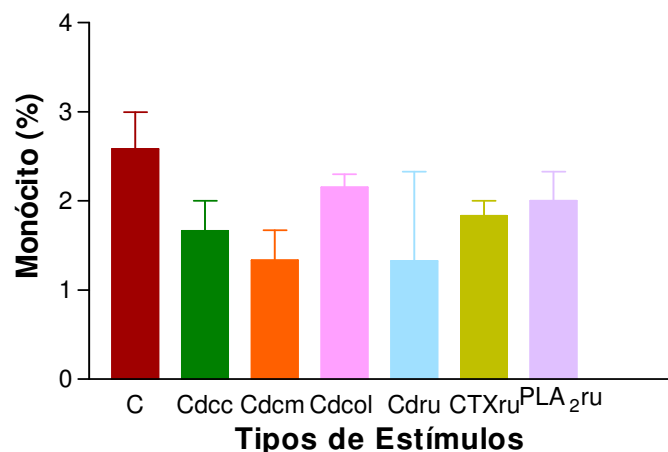


FIGURA 30: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número de monócitos (valores expressos em porcentagem). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120 μ g/Kg); Cdcm = *C.d.cascavella*-Maranhão (50 μ g/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27 μ g/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20 μ g/Kg); CTXru = Crotoxina (10 μ g/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10 μ g/Kg). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p \leq 0,05, diferença significativa em relação ao Controle

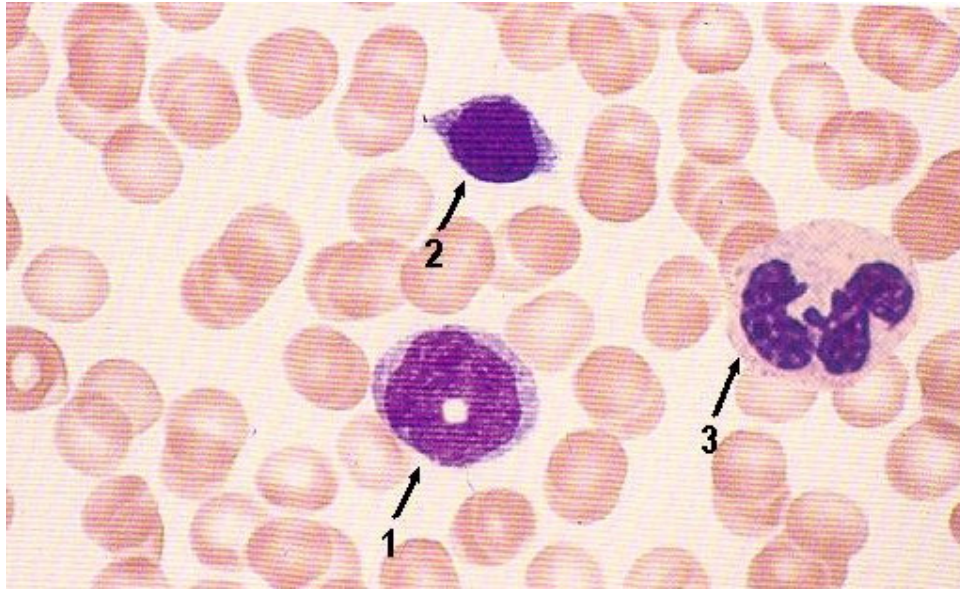


Figura 31: Fotomicrografia da Celularidade no sangue: Forma em Anel (1), Linfócito (2) e Segmentado (3), coloração de May-Grunwald-Giemsa, aumento de 1000x.

4.2.2 Contagem de Leucócitos no Sangue Expressa em Milímetros Cúbicos

Na **Figura 32** e **Tabela 13** verificamos aumento significativo apenas na forma em anel nos animais inoculados com o veneno da Crotoxina, contudo os venenos da *Cascavella* do Ceará e da *C.d.ruruima* induziram redução significativa. O grupo de animais inoculados com Crotoxina apresentou valores significativamente maiores de segmentados em relação ao grupo controle nos segmentados (**Figura 33**). Nos animais inoculados com o veneno da *Cascavella* do Ceará e Maranhão e a *C.d.ruruima* apresentaram valores de eosinófilos e linfócitos significativamente reduzidos (**Figuras 34 e 35** respectivamente) o mesmo ocorrendo com os monócitos, exceto para *Cascavella* do Maranhão (**Figuras 36**).

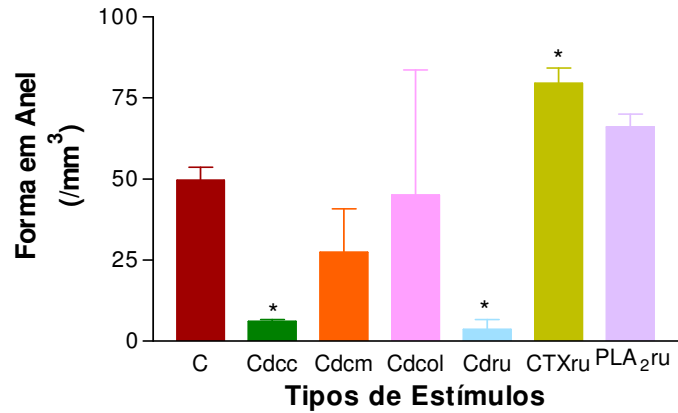


FIGURA 32: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de neutrófilos em forma de anel (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

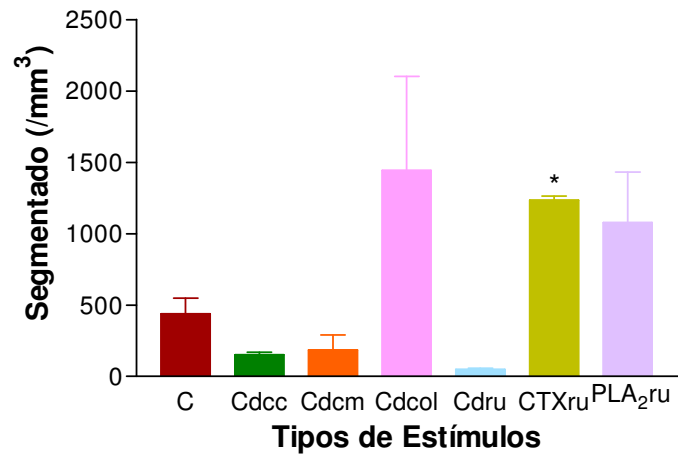


FIGURA 33: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de neutrófilos segmentados (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

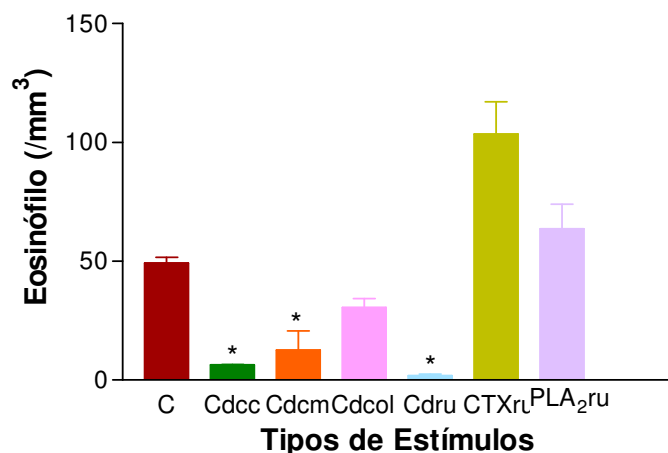


FIGURA 34: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de eosinófilos (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdc = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., para 6 animais por grupo. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

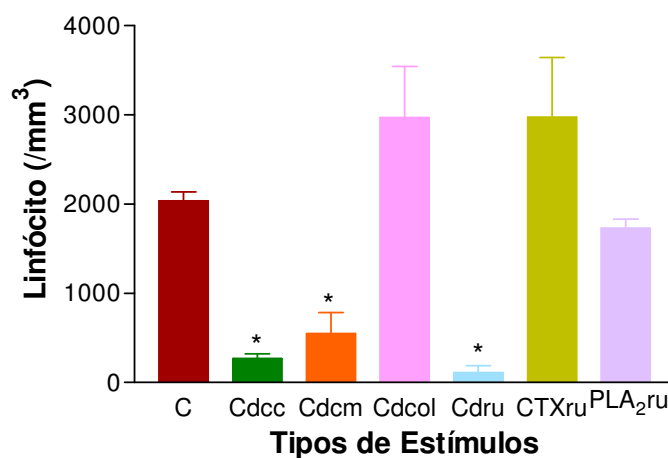


FIGURA 35: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de linfócitos (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdc = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

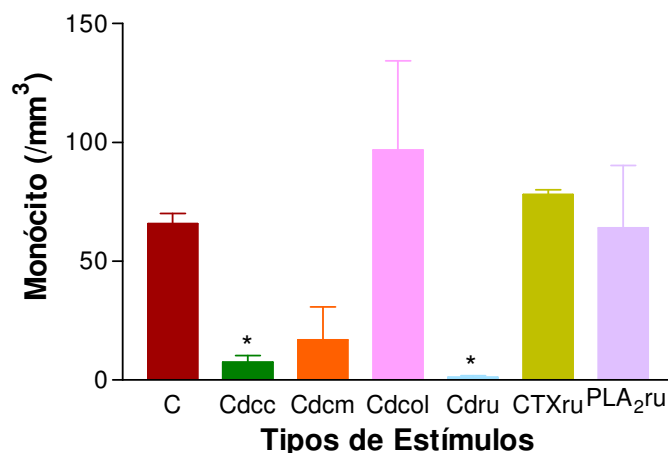


FIGURA 36: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de monócitos (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *Cascavella-Ceará* (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavela*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

4.3 Contagem Global dos Leucócitos na Cavidade Peritoneal

Verificamos na **Figura 37, Tabela 14** que todos os estímulos induziram aumento no número total de células presentes na cavidade peritoneal, sendo que este aumento foi significativo estatisticamente nos grupos de animais que receberam, intaperitonealmente, veneno da *Cascavella-Ceará*, *C.d.collilineatus*, *C.d.ruruima* e a fração da Crotoxina.

4.3.1 Contagem dos Leucócitos na Cavidade Peritoneal Expressa em Percentual

Ao observarmos a **Tabela 15** verificamos duas horas após a inoculação dos diferentes venenos, houve aumento significativo tanto nos segmentado (**Figuras 38**) quanto nos eosinófilos (**Figuras 39**) para a *Cascavella-Ceará*, *C.d.collilineatus* e para a fração da Crotoxina. O número de linfócitos (**Figuras 40**) foi menor em todos os grupos em relação ao controle, porém não houve diferença estatística.

Os macrófagos (**Figuras 41**) foram às células predominantes na cavidade peritonias (em média 62,27% da celularidade total). Após a administração do veneno de

C.d.collilineatus houve significativa redução do número de macrófagos da cavidade peritoneal. Na **Figuras 42** estão representados os macrófagos normais e ativados, respectivamente, na cavidade peritoneal.

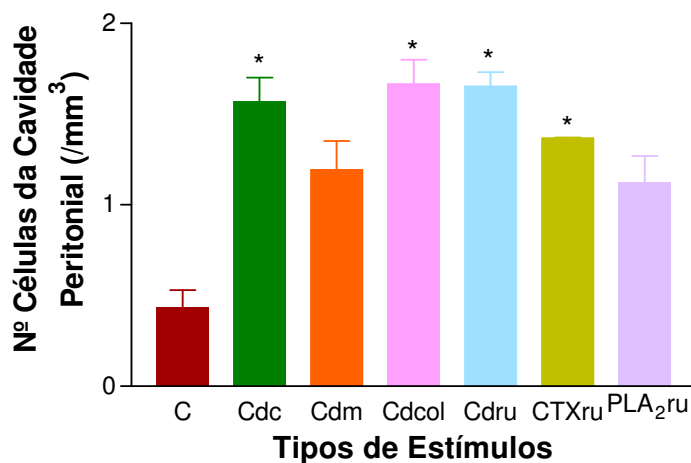


FIGURA 37: Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total de células presentes na cavidade peritoneal. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdc = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

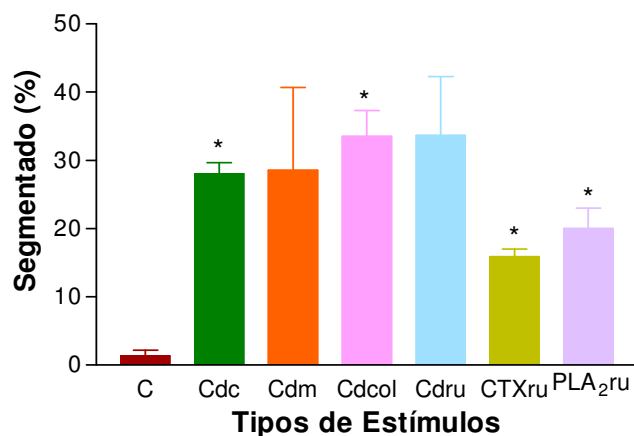


FIGURA 38: Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total neutrófilos segmentados (valores expressos em porcentagem) presentes na cavidade peritoneal. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120 μ g/Kg); Cdcem = *C.d.cascavella*-Maranhão (50 μ g/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27 μ g/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20 μ g/Kg); CTXru = *Crotoxina* (10 μ g/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10 μ g/Kg). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p \leq 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

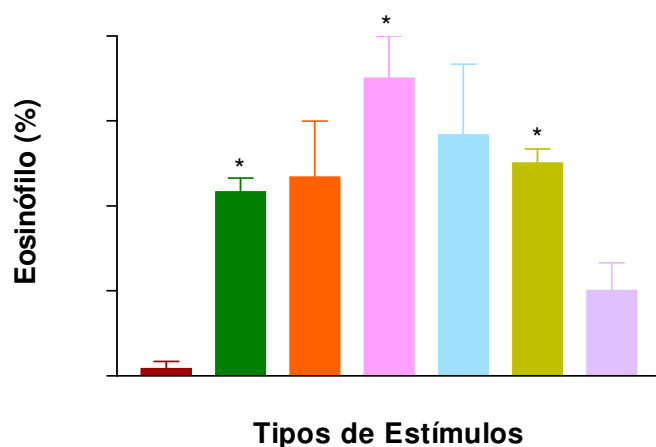


FIGURA 39: Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total eosinófilos (valores expressos em porcentagem) presentes na cavidade peritoneal. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120 μ g/Kg); Cdcem = *C.d.cascavella*-Maranhão (50 μ g/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27 μ g/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20 μ g/Kg); CTXru = *Crotoxina* (10 μ g/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10 μ g/Kg). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p \leq 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

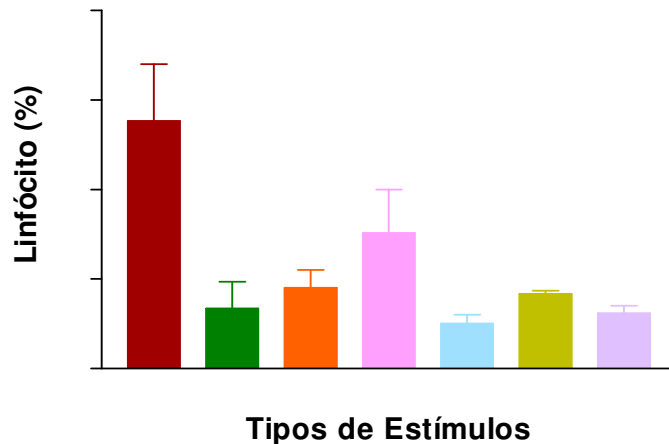


FIGURA 40: Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total de linfócitos (valores expressos em percentagem) presentes na cavidade peritoneal. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdcem = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcoll = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdruru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significante em relação ao Controle.

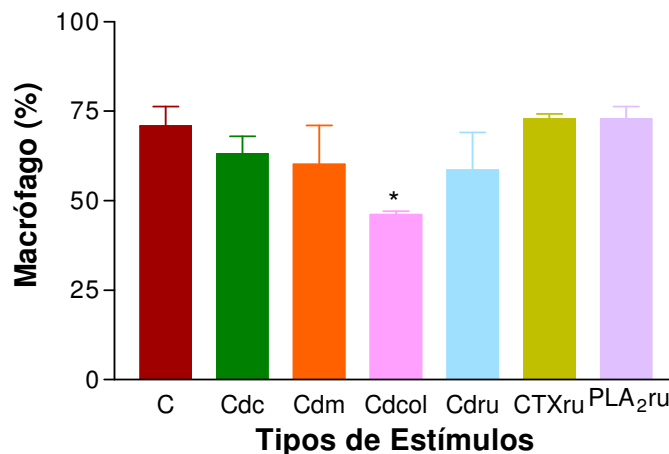
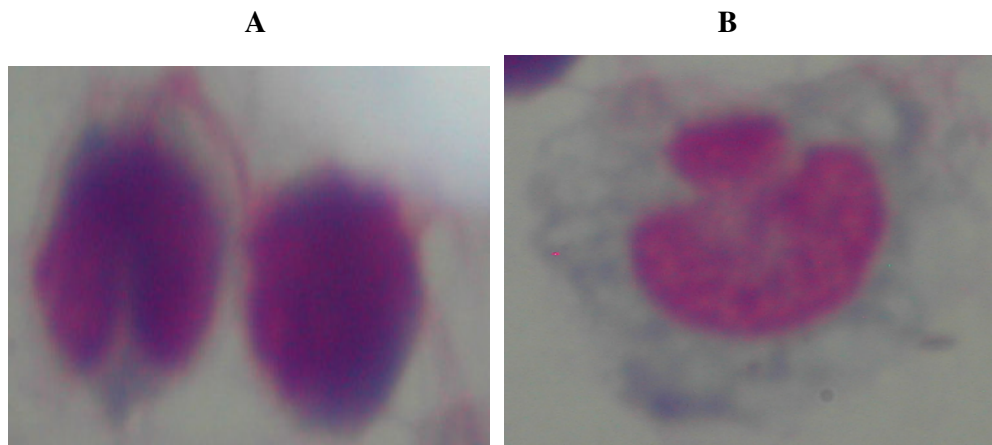


FIGURA 41: Efeito dos diferentes tipos de veneno sobre o número total de macrófagos (valores expressos em percentagem) presentes na cavidade peritoneal. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdcem = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcoll = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdruru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significante em relação ao Controle.



Figuras 42: Fotomicrografia: A - Macrófago Normal e B - Macrófago ativado, coloração de May-Grunwald-Giemsa, aumento de 1000x.

4.3.2 Contagem das Células Presentes na Cavidade Peritonial Expressa em Milímetros Cúbicos

Ao observarmos a **Tabela 16** verificamos que duas horas após a inoculação dos diferentes venenos houve aumento tanto no número de neutrófilos segmentados (**Figuras 43**) quanto no de eosinófilos (**Figuras 44**), entretanto, a diferença foi significativa apenas para a *C.d. collilineatus* e a fração da Crotoxina. Com relação aos linfócitos (**Figuras 45**) apenas o grupo que recebeu o veneno de *Cascavella* do Ceará apresentou diminuição significativo estatisticamente.

Todos os venenos induziram aumento no número de macrófagos peritoniais, no entanto, apenas com a fração de Crotoxina, houve diferença (**Figuras 46**).

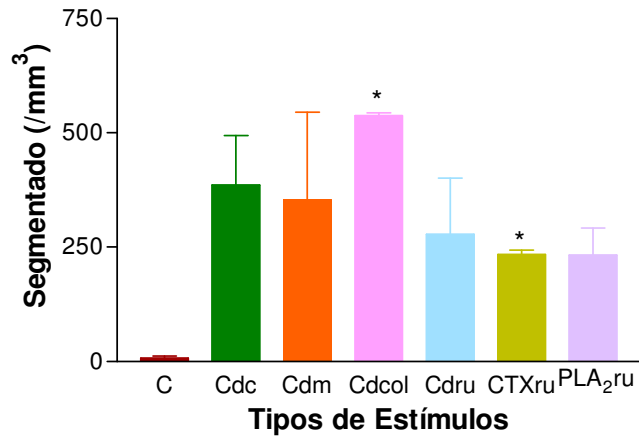


FIGURA 43: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de neutrófilos segmentados presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdcem = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = *Crotoxina* (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

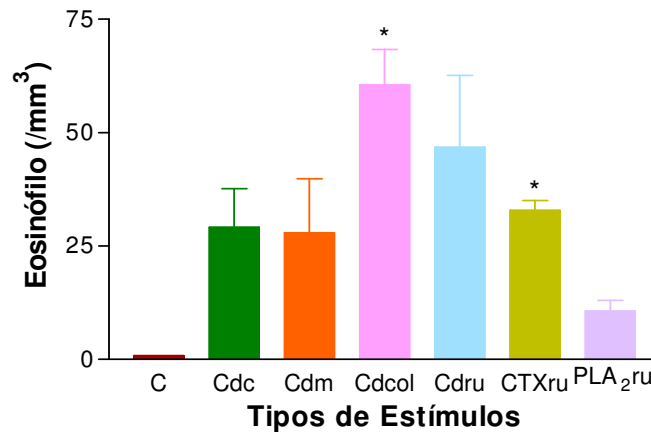


FIGURA 44: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdcem = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = *Crotoxina* (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

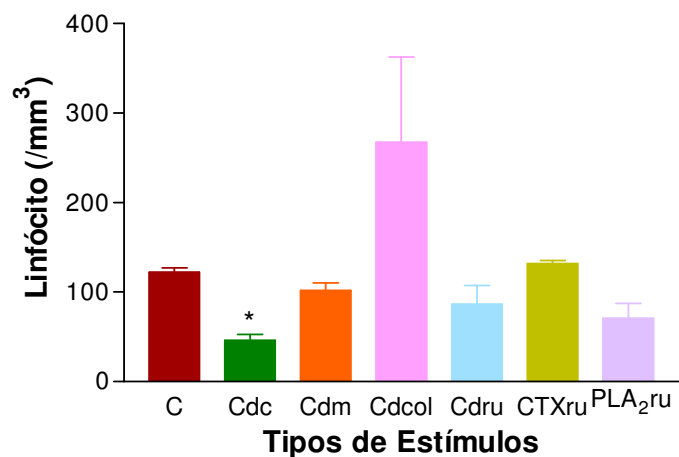


FIGURA 45: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de linfócitos presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdc m = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significante em relação ao Controle.

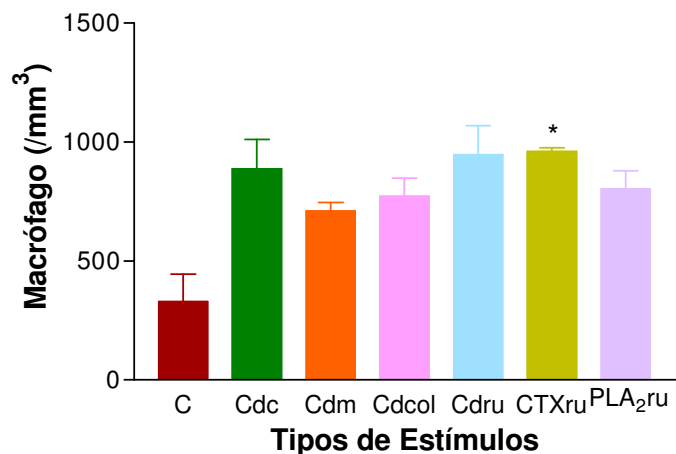


FIGURA 46: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o número total de macrófagos presentes na cavidade peritoneal (valores expressos em milímetros cúbicos). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdc m = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significante em relação ao Controle.

4.4 Teste de Espreadimento

O espreadimento (Tabela 17, Figuras 47) de macrófagos apresentou resultados significativamente menores em relação ao grupo controle em todos os tipos de estímulos estudados, ou seja, *Cascavella* do Ceará e do Maranhão, *C.d.collilineatus*, *Cdruruima* e as frações da Crotoxina e Fosfolipase A₂. Na Figura 48 estão representadas as células espreadas.

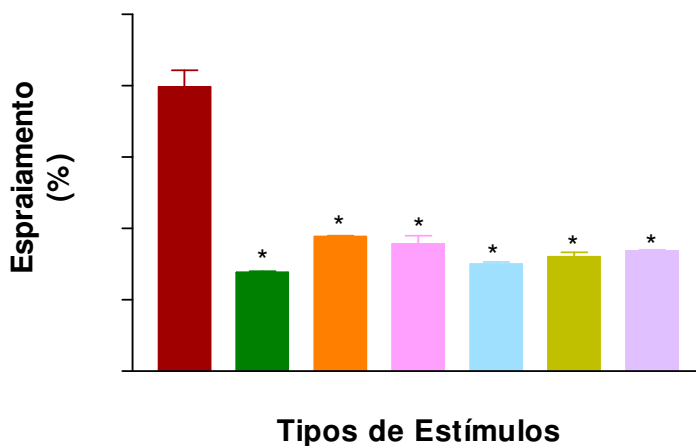


FIGURA 47: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre o Espreadimento e macrófagos peritoneais (valores expressos em porcentagem). Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); CdcM = *Cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. para 6 animais por grupo. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

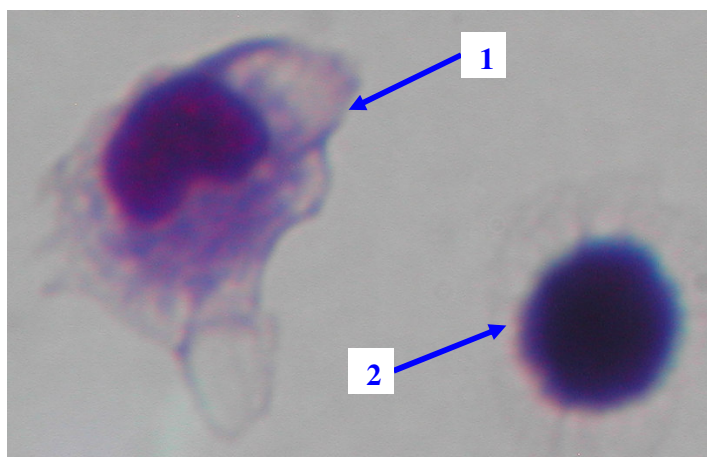


Figura 48: Fotomicrografia evidenciando o Espreadimento: 1- célula espreada; 2- célula não espreada, coloração de May-Grunwald-Giemsa, aumento de 1000x.

4.5 Atividade Fagocítica, “*In Vitro*” de Macrófagos Peritoniais

Analisando-se a **Tabela 18** verificamos redução da atividade fagocítica de macrófagos peritoniais frente a *Candida albicans* com todos os estímulos estudados, sendo que houve significância estatística apenas para os grupos inoculados com a *Cascavella-Ceará*, *Cascavella-Maranhão* e a fração Crotoxina no período de 30 minutos (**Figura 49**), e para os grupos inoculados com a *Cascavella-Ceará*, *C.d.ruruima* e a fração Crotoxina no período de 60 minutos (**Figura 50**), para os grupos inoculados com o veneno de *Cascavella-Ceará*, *Cascavella-Maranhão* e *C.d.ruruima* no período de 90 minutos (**Figura 51**) e para os grupos inoculados com o veneno de *Cascavella-Ceará*, no período de 120 minutos (**Figura 52**). Na **Figura 53** está representada o macrófago fagocitando *C. albicans*.

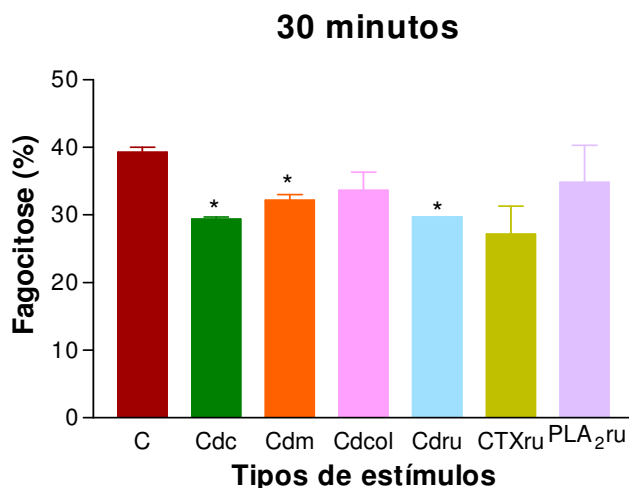


FIGURA 49: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoniais após 30 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella-Ceará* (120µg/Kg); Cdc = *C.d.cascavella-Maranhão* (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *Cdruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

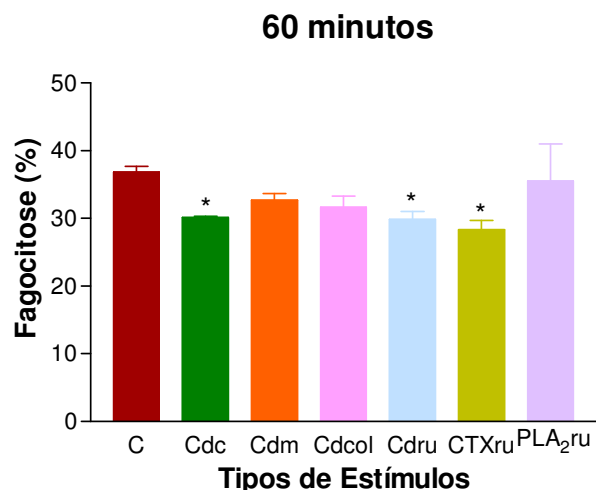


FIGURA 50: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoneiais após 60 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdc = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

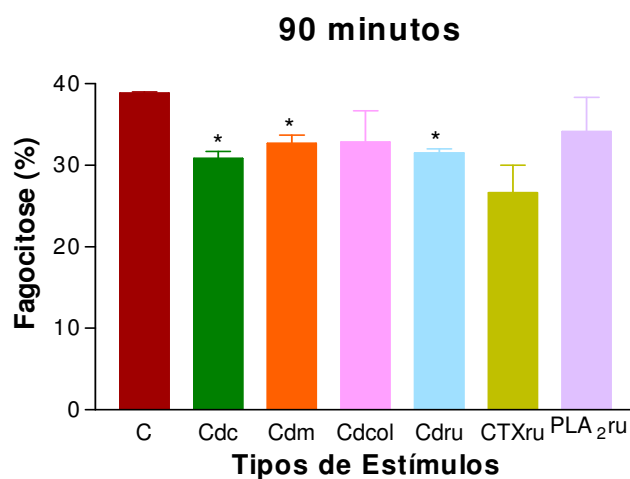


FIGURA 51: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoneiais após 90 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdc = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

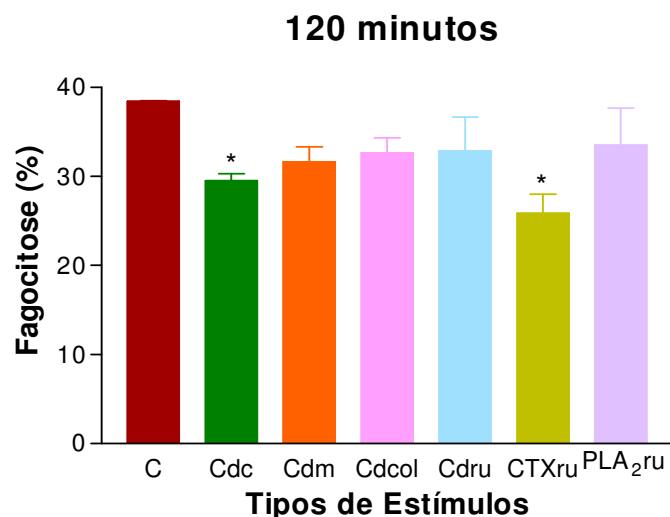


FIGURA 52: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica de macrófagos peritoneais após 120 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120µg/Kg); Cdm = *C.d.cascavella*-Maranhão (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

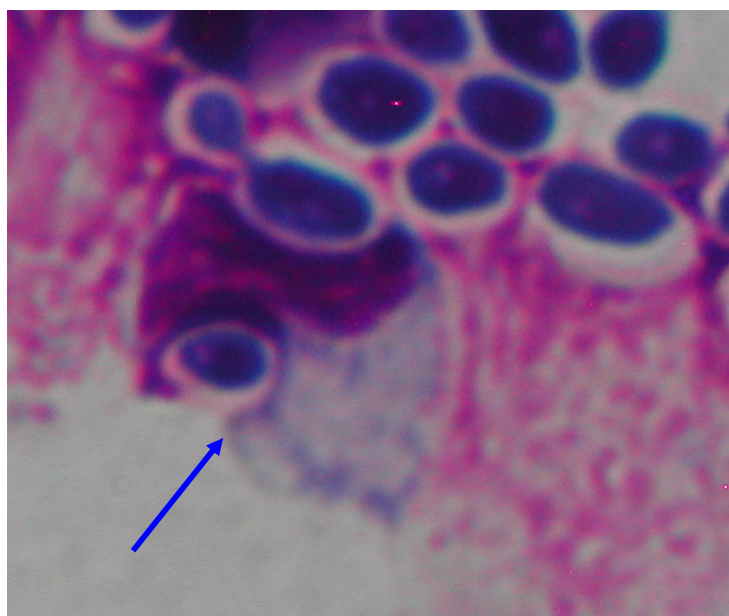


Figura 53: Fotomicrografia evidenciando Macrófago fagocitando *C. albicans*, coloração de May-Grunwald-Giemsa, aumento de 1000x.

4.6 Atividade Fungicida, “In Vitro” de Macrófagos Peritoniais

Analisando-se a **Tabela 19** verificamos redução da atividade fungicida de macrófagos peritoniais frente a *Candida albicans* com os estímulos estudados com, exceto nos animais inoculados com a *C.d.ruruima*, embora tenha havido significância estatística apenas para o veneno de *C.d.collilineatu*, e com a fração Crotoxina no período de 30 minutos (**Figura 54**); no período de 60 minutos houve diferença estatística para os grupos inoculados com *Cascavella-Ceará*, *C.d.collilineatus* e a fração Crotoxina (**Figura 55**). Nos períodos de 90 e 120 minutos os grupos inoculados com o veneno de *Cascavella-Ceará*, *C.d.collilineatus* e com a fração Crotoxina apresentaram redução significativa da atividade fungicida (**Figuras 56 e 57**, respectivamente).

Os resultados em scores então representados nas **Tabela de 20 a 23** em Anexo e na **Figura 58**.

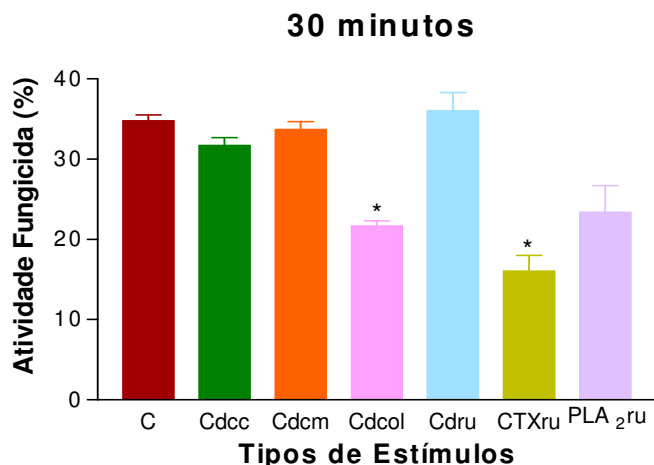


FIGURA 54: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoniais após 30 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella-Ceará* (120µg/Kg); CdcM = *C.d.cascavella-Maranhão* (50µg/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27µg/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20µg/Kg); CTXru = Crotoxina (10µg/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

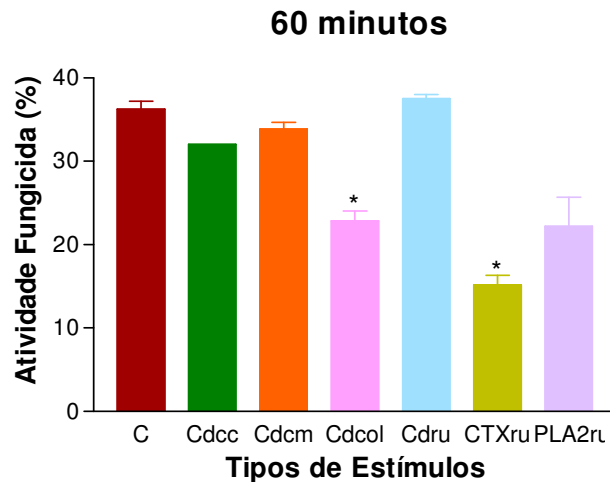


FIGURA 55: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoneais após 60 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120 μ g/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50 μ g/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27 μ g/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20 μ g/Kg); CTXru = Crotoxina (10 μ g/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10 μ g/Kg). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p \leq 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

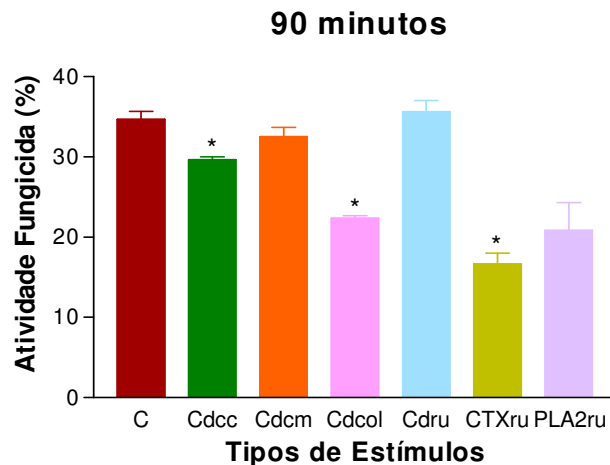


FIGURA 56: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoneais após 90 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120 μ g/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50 μ g/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27 μ g/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20 μ g/Kg); CTXru = Crotoxina (10 μ g/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10 μ g/Kg). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p \leq 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

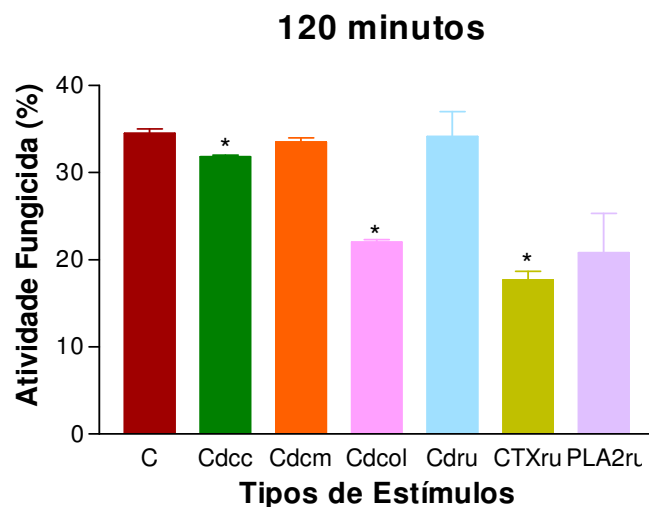


FIGURA 57: Efeito dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida de macrófagos peritoneais após 120 minutos de teste. Legenda: C = Controle; Cdcc = *C.d.cascavella*-Ceará (120 μ g/Kg); CdcM = *C.d.cascavella*-Maranhão (50 μ g/Kg); Cdcol = *C.d.collilineatus* (27 μ g/Kg); Cdru = *C.d.ruruima* (20 μ g/Kg); CTXru = Crotoxina (10 μ g/Kg); PLA₂ru = Fosfolipase A₂ (10 μ g/Kg). Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M., Controle n=12, os demais grupos n=6. *p \leq 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

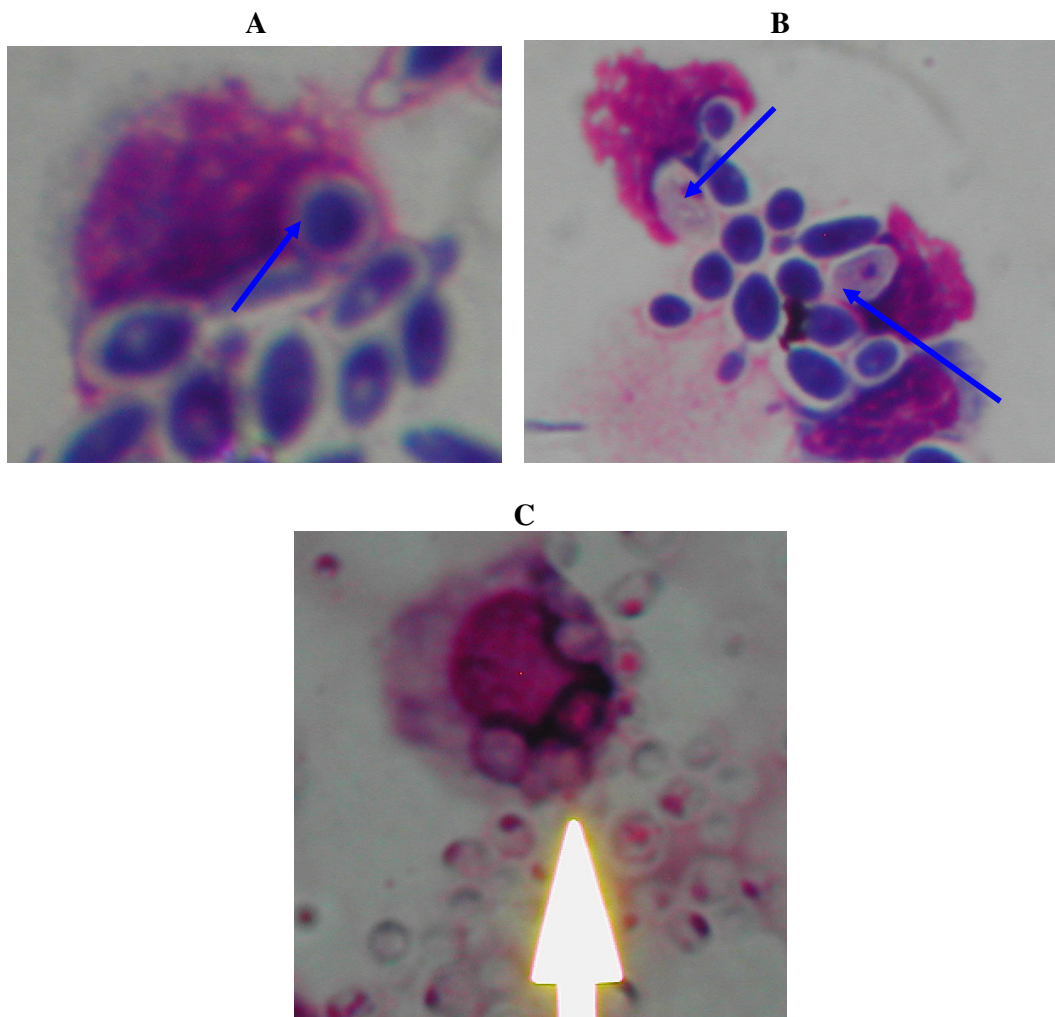


Figura 58: Fotomicrografia das figuras A, B e C evidenciando a Atividade Fungicida em Score (A-score 0; B-score1; C-score 2), coloração de May-Grunwald-Giemsa, aumento de 1000x.

Tabela 04: Resumo do eritrograma no sangue periférico.

Parâmetros Analisados	Cdcc	Cdcm	Cdcol	Cdru	CTXru	PFA ₂ ru
Hemácias	N	N	N	N	N	N
Hemoglobina	N	N	N	↑*	↑*	N
Hematócrito	↑	↑*	↓	↓	↓	↓
VCM	↑*	↑*	↓	↑	↓*	↓*
HCM	↑	↑*	↓	↓	↓	↓
CHCM	↓*	↓*	↑	↑	↑	↑
Policromasia	P	-	P	-	P	P
Howell-Jolly	P	P	P	P	P	P

Legenda: N – normal; P – presente; ↑* - aumentado com significância estatística; ↑ - aumentado sem significância estatística; ↓* - diminuído com significância estatística; ↓ - diminuído sem significância estatística.

Tabela 05: Resumo da contagem total no sangue periférico e sua celularidade em porcentagem.

Leucograma	Cdcc	Cdcm	Cdcol	Cdru	CTXru	PFA ₂ ru
Leucócitos (/mm ³)	↓*	↓*	↑	↓*	↑	↑
Forma em Anel (%)	↓	↑*	↓	↓	↓	↑
Segmentado (%)	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Eosinófilo (%)	↓	↓	↓*	↓	↑	↑
Linfócito (%)	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Monócito (%)	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Legenda: ↑* - aumentado com significância estatística; ↑ - aumentado sem significância estatística; ↓* - diminuído com significância estatística; ↓ - diminuído sem significância estatística.

Tabela 06: Resumo da contagem total no sangue periférico e sua celularidade em milímetros cúbicos.

Leucograma	Cdcc	Cdcem	Cdcol	Cdru	CTXru	PFA ₂ ru
Leucócitos (/mm ³)	↓*	↓*	↑	↓*	↑	↑
Forma em Anel (mm ³)	↓*	↓	↓	↓*	↑*	↑
Segmentado (mm ³)	↓	↓	↑	↓	↑*	↑
Eosinófilo (mm ³)	↓*	↓*	↓	↓*	↑	↑
Linfócito (mm ³)	↓*	↓*	↑	↓*	↑	↓
Monócito (mm ³)	↓*	↓	↑	↓*	↑	↓

Legenda: ↑* - aumentado com significância estatística; ↑ - aumentado sem significância estatística; ↓* - diminuído com significância estatística; ↓ - diminuído sem significância estatística.

Tabela 07: Resumo da contagem total no peritônio e sua celularidade em porcentagem.

Leucograma	Cdcc	Cdcem	Cdcol	Cdru	CTXru	PFA ₂ ru
Leucócitos (/mm ³)	↑*	↑	↑*	↑*	↑*	↑
Segmentado (%)	↑*	↑	↑*	↑	↑*	↑*
Eosinófilo (%)	↑*	↑	↑*	↑	↑*	↑
Linfócito (%)	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Macrófago (%)	↓	↓	↓*	↓	↓	↓

Legenda: ↑* - aumentado com significância estatística; ↑ - aumentado sem significância estatística; ↓* - diminuído com significância estatística; ↓ - diminuído sem significância estatística.

Tabela 08: Resumo da contagem total dos leucócitos no peritônio e sua celularidade em milímetros cúbicos.

Leucograma	Cdcc	Cdcm	Cdcol	Cdru	CTXru	PFA ₂ ru
Leucócitos (/mm ³)	↑*	↑	↑*	↑*	↑*	↑
Segmentado (mm ³)	↑	↑	↑*	↑	↑*	↑
Eosinófilo (mm ³)	↑	↑	↑*	↑	↑*	↑
Linfócito (mm ³)	↓*	↓	↑	↓	↓	↓
Macrófago (mm ³)	↑	↑	↑	↑	↑*	↑

Legenda: ↑* - aumentado com significância estatística; ↑ - aumentado sem significância estatística; ↓* - diminuído com significância estatística; ↓ - diminuído sem significância estatística.

Tabela 09: Resumo da atividade funcional de macrófagos.

	Cdcc	Cdcm	Cdcol	Cdru	CTXru	PFA ₂ ru
Espraiamento	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*	↓*
Fagocitose 30'	↓*	↓*	↓	↓*	↓	↓
Fagocitose 60'	↓*	↓	↓	↓*	↓*	↑
Fagocitose 90'	↓*	↓*	↓	↓*	↓	↓
Fagocitose 120'	↓*	↓	↓	↓	↓*	↓
AF 30'	↓	↓	↓*	↑	↓*	↓
AF 60'	↓	↓	↓*	↑	↓*	↓
AF 90'	↓*	↓	↓*	↑	↓*	↓
AF 120'	↓*	↓	↓*	↑	↓*	↓

Legenda: ↑* - aumentado com significância estatística; ↑ - aumentado sem significância estatística; ↓* - diminuído com significância estatística; ↓ - diminuído sem significância estatística; **AF** - atividade fungicida.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo foi observado presença discreta de anemia, principalmente nos animais que foram inoculados com veneno da *Crotallus durissus ruruima* e sua fração Crotoxina, com presença acentuada de anisocitose. Foi observada também presença de inclusão citoplasmática de hemácia, corpúsculo de Howel Jolly, nos animais inoculados com o veneno da *Crotalus durissus cascavella* - Ceará *Crotalus durissus Collilineatus* e nas frações Crotoxina e Fosfolipase A₂. A policromasia esteve presente em todos os grupos estudados. Vale salientar que 16,6% dos animais apresentaram sinais de hemólise.

As alterações hematológicas encontradas estão relacionadas aos eritrócitos (KELEN et al., 1960/62; ROSENFELD et al., 1960/62), leucócitos (COSTA et al., 1989; WAJCHENBERG et al., 1954/55), plaquetas e fatores de coagulação (JORGE; RIBEIRO, 1988/89; RAW et al., 1986; ROSENFELD et al., 1959). O veneno crotálico, segundo vários autores, causava hemólise *in vitro*, porém este fenômeno não foi observado *in vivo* (BARRAVIERA, 1993; BRASIL, 2001).

Sano-Martins et al. (1999), observaram redução da contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e determinação do hematócrito e que esta redução era tempo dependente. A literatura preconiza uma queda dessas três variáveis geralmente vinte e quatro horas após a inoculação do veneno, devido à perda sanguínea e lesões hemorrágicas observadas geralmente por conta de colheitas sucessivas, sinal de hemorragias no local da colheita de sangue, havendo grande formação de hematomas (SANTOS et al., 2003).

Contudo, Sano-Martins e colaboradores observaram que em algumas amostras de sangue após uma a três horas de coletadas apresentaram hemólise, discreto aumento do VCM e redução do CHCM, sendo encontradas hemácias crenadas no esfregaço (SANO-MARTINS et al., 1995).

Os animais inoculados com os venenos da *Crotalus durissus cascavella* – Ceará e do Maranhão e a *Crotalus durissus ruruima* apresentaram leucopenia

Apenas os animais inoculados com o veneno da *Crotallus durissus cascavella* – Maranhão apresentaram um discreto desvio à esquerda como é preconizado na literatura, embora esse fenômeno ocorra após seis horas de inoculação e em nosso estudo foram duas horas.

Os leucócitos são fatores relevantes na inflamação. Em todos os estágios da reação inflamatória há a progressiva infiltração do tecido perivascular por diferentes tipos de leucócitos. Os granulócitos migram para os tecidos afetados já no estágio precoce da resposta. O recrutamento dos neutrófilos é dependente da geração de fatores quimiotáticos bem como da expressão de moléculas de adesão. No local da injúria, células fagocíticas liberam mediadores pró-inflamatórios e espécies reativas de oxigênio os quais contribuem para a eliminação do agente causador da injúria e para levar a resolução da reação inflamatória (FARSKY et al., 1997; MURRAY; NATHAN, 1999).

A migração de leucócitos no tecido através do sitio da lesão é alcançado pela orientação de locomoção via gradiente de concentração, processo chamado de quimiotaxia. A realização da fagocitose ocorre através da liberação de produtos microbicidas dentro do fagossomo, e a morte e degradação do material ingerido (RABINOVICH; DESTEFANO, 1973). Depois da fagocitose, os neutrófilos sofrem rapidamente morte celular ou apoptose e são ingeridos por macrófagos ou desviados para os órgãos linfáticos (ADEREN; UNDERHILL, 1999).

Santos et al. (2003) estudando o hemograma de cães envenenados com *B. alternatus* demonstraram uma queda significativa ($p < 0,05$) nos valores médios de hemácias, concentração de hemoglobina e na determinação do hematócrito em relação ao controle.

A análise de hemogramas de alguns pacientes picados por venenos de serpentes e tratados com soro anticrotálico revelou leucocitose com desvio à esquerda em presença de eosinófilos em número normal ou diminuído, em uma fase inicial, e intensa eosinofilia nos dias subseqüentes (JORGE; RIBEIRO, 1990).

Tanto os neutrófilos quanto os monócitos tem um papel vital na defesa do hospedeiro. Eles são as primeiras células a alcançar o local da injúria e numericamente são predominantes em lesões recentes. Eles são atraídos por sinais químicos (quimiotaxia) desenvolvendo no local da injúria. O evento inicial nesse processo é sua aderência ao endotélio celular formando uma camada endotelial. No entanto eles migram através das junções interendoteliais e emitem pseudópodes. A interação de substâncias quimiotactantes-receptores faz com que ocorra um alongamento e polarização da célula, ocorrendo à reorganização topográfica das organelas do plasma, controlando as estrutura do citoesqueleto (FARSKY et al., 1997).

Sano-Martins et al. (1995), estudando alterações hematológicas induzidas pelo veneno da *B. jararaca* em cachorros, demonstraram aumento significativo de

leucócitos nos tempos de seis e quarenta e oito horas após inoculação, neutrofilia foi observada nos tempos de seis, quarenta e oito e setenta e duas horas, linfopenia as três e setenta e duas horas, e monocitose em seis e vinte e quatro horas.

A composição do exsudato peritonial varia em função do tempo e do agente estimulatório (DAEMS; KOERTEN, 1978; SOUZA, 1995). As substâncias injetadas intraperitonealmente induzem principalmente, uma resposta do tipo celular, isto é, induzem intensa migração tanto de granulócitos como também de células do sistema mononuclear fagocitário para a cavidade peritonial, induzindo ainda a uma estimulação no metabolismo celular, vários autores revisando a literatura acerca da mobilização celular e de sua importância na resistência do organismo a agentes infecciosos, concluíram que diferenças na mobilização dos diferentes tipos celulares poderia estar relacionadas com a susceptibilidade às infecções (DAEMS; KOERTEN, 1978; GOODMAN, 1964; SOUZA, 1995).

No nosso trabalho a avaliação funcional dos macrófagos foi realizada “in vitro” em células do exsudato peritonial. No exsudato, foi avaliada a contagem global do número de células e a distribuição da celularidade.

A contagem global de células da cavidade peritonial apresentou-se elevada em todos os estímulos estudados. Ao verificar a distribuição da celularidade foi observado que 62,3% das células presentes no exsudato peritonial eram constituídas de macrófagos, com raros segmentados, eosinófilos e linfócitos. Este achado está conforme dados da literatura (DAEMS; KOERTEN, 1978), a composição do exsudato peritonial varia em função da natureza do estímulo usado e do tempo decorrido após estimulação.

Souza (1995) após a inoculação intraperitoneal do caseinato de sódio por cinco dias observou que 96% das células presentes no exsudato peritonial eram constituídos de macrófagos, com raros eosinófilos e mastócitos.

Nossos resultados demonstraram o efeito inibitório dos diferentes estímulos estudados sobre o espraiamento de macrófagos. Essa inibição foi observada em todos os tipos de venenos estudados. Esse efeito não causou dano a integridade da membrana, visto que, a viabilidade do macrófago pelo teste de exclusão do azul de Trypan foi maior do que 95%.

Rabinovitch e Destefano (1973) demonstraram que o espraiamento pode ser induzido pelo tratamento de macrófagos peritoneais de camundongos com enzimas proteolíticas, pela indução por complexo antígeno-anticorpo, sendo dependente de cátions divalentes, especialmente cálcio e magnésio. Contudo, outros cátions têm sido

utilizados experimentalmente, destacando-se o manganês, cobalto, níquel, zinco, cádmio, e ferro, sendo o mais efetivo o manganês, por induzir o espraiamento em pequenas concentrações (1-10 μ M) (BUMOL; DOUGLAS, 1977; DOUGLAS, 1976; RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973).

Os macrófagos exibem diferentes fenótipos os quais estão presentes em sua morfologia, expressas em sua superfície antigênica e função. Essa heterogeneidade fenotípica é consequência de uma série de baixa regulação de certos processos celulares e de baixa regulação (CRUZ et al., 2005).

Partículas internalizadas por macrófagos e outras células fagocíticas resultam em geração de vacúolos fagocíticos. A característica típica desses vacúolos é sua maturação progressiva ao longo do caminho endocítico levando a fusão tardia com endossomo e finalmente ao lisossomo, onde o material ingerido irá sofrer degradação (DESJARDINS et al., 1994; CRUZ et al., 2005). Vários autores têm mostrado o número aumentado de vacúolos, provavelmente causados pela exocitose das proteínas inflamatórias, os quais podem ser detectados no sobrenadante de culturas (CRUZ et al., 2005).

Várias partículas que são ingeridas por células fagocitárias através de mecanismo mediador-receptor, envolvem extensivo rearranjo do citoesqueleto e remodelação da membrana (ADEREM; UNDERHILL, 1999; SAMPAIO et al., 2003; CRUZ et al., 2005).

O espraiamento é um importante mecanismo na interação entre a fagocitose e as partículas a serem englobadas, nenhuma substância com inibição do espraiamento de macrófago, interfere com o processo de fagocitose (CRUZ et al., 2005).

A fagocitose, segundo Robbins (1991) envolve fixação de partículas opsonizadas a receptores Fc e C_{3b} sobre a superfície de leucócitos, ingestão por pseudópodes que circulam a partícula fagocítica, formação do fagossoma e, após fusão de grânulos, do fagolisossoma com posterior degranulação e, ou morte do material englobado. Existem poucos trabalhos em relação à identificação dos componentes de superfície que permanecem associados com a superfície da célula ou são interiorizadas durante o processo de fagocitose. A interação da partícula opsonizada com macrófagos, via receptor Fc, desencadeia diversos processos metabólicos como a ativação da NADPH-oxidase e estimulação do “burst” respiratório, rearranjo do citoesqueleto e liberação de enzimas lisossomais (BUCHI; SOUZA, 1993).

A *Candida albicans* é vista como um fungo oportunista e em decorrência do rompimento do equilíbrio entre a *Candida albicans* e o hospedeiro, pode causar uma variedade de infecções. Os fagócitos são as primeiras células responsáveis pela resistência à infecção por *Candida albicans* em humanos, parecendo que também seja verdade em modelo animal (LEHRER; CLINE, 1969; VAZQUEZ-TORRES et al., 1994; SOUZA, 1995).

A atividade fagocítica e fungicida foi estudada com a *Cândida albicans*, sendo utilizado os testes até 120 minutos, em função da resposta obtida, pois após este tempo foi observado que durante a padronização não havia modificação na intensidade da resposta dos macrófagos, e que em alguns casos, houve até mesmo redução na intensidade da resposta, resultados estes concordantes com os de Cottingham e Mills, 1943; Souza, 1995.

Silva et al. (1996) estudando o efeito do veneno sobre macrófagos peritoniais, de várias espécies da *Crotalus durissus terrificus* em diferentes doses e durante 32 dias observaram, que nas doses de 0,5 ou 1,0µg houve uma redução significativa do espraio e da atividade fagocítica quando comparado ao grupo controle. Esse efeito inibitório não foi observado quando os animais foram inoculados com tioglicolato. As concentrações usadas não induziram alterações na viabilidade celular, o oposto do efeito de alguma citotoxina sobre outras espécies de serpentes, as quais afetam a membrana plasmática podendo causar lise celular. Essas observações sugerem a propriedade de baixa regulação do veneno sobre a função de macrófago.

Sampaio et al. (2001) em seus experimentos encontraram efeito inibitório do espraio e da fagocitose e estimulação da produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, atividade fungicida, metabolismo da glicose e glutamina dessas células. Esse efeito sobre a função dos macrófagos não depende do estado de ativação das células, desde que sejam observados em células residentes e ativados. O efeito inibitório do veneno também ocorre sobre macrófagos aderidos, independente do tipo de receptor envolvido, desde que observado em fagocitose mediada por receptores do tipo Fc, C3b e manose.

Sampaio et al. (2003) observou redução de 53% do espraio e 59% na atividade fagocítica com *C. albicans* em macrófagos peritoniais incubados com veneno da *Crotalus durissus terrificus*.

Em nosso estudo foi observada redução do espraio de 53% na *Crotalus durissus cascavella* – Ceará e até 66% na *Crotalus durissus collilineatus* e na

atividade fagocítica com *C. albicans*. Os animais inoculados com veneno da *Crotalus durissus cascavella* – Ceará e *Crotalus durissus ruruima* foram os que melhor responderam em todos os tempos estudados.

Quanto à redução da atividade fungicida, o veneno que apresentou melhor resultado foi o da *Crotalus durissus collilineatus* e a fração Crotoxina, em todos os tempos estudados.

A neutralização do veneno interfere no efeito inibitório sobre a função de macrófagos, indicando que a presença da toxina no veneno contribui para essa ação inibitória.

Sampaio et al. (2005) estudando a crotapotina observaram que ela não causava modificação no espriamento e na atividade fagocítica, por outro lado, a PLA₂ independente da concentração usada causava significativa redução do espriamento em macrófagos, comparados com o grupo controle e a redução da fagocitose com *C. albicans*. Esses resultados indicam que o efeito inibitório da PLA₂ sobre os macrófagos na atividade fagocítica ocorreu independente do tipo de receptor envolvido C_{3b}, Fc e manose. Esse achado os levou a sugerir que a subunidade da PLA₂ e não a crotapotina, foi o principal fator responsável pelo efeito inibitório da crotoxina sobre a função do macrófago. Por outro lado, evidências indicam que a PLA₂ secretada do veneno da espécie crotálica causam resposta inflamatória, afetando ambos os componentes, vasculares e celulares (TEIXEIRA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006).

Rangel-Santos et al. (2004) analisou várias concentrações das frações de CTX, CB e CA sobre três espécies de serpentes Cdt, Cdcas, Cdccl. A CTX da Cdt apresentou mais alta atividade para PLA₂ que as outras espécies sendo significativa em todas as concentrações. A análise eletroforética da CTX apresentou o pico em 1 hora, desaparecendo após 24 horas.

Rangel-Santos et al. (2004), demonstraram também que o veneno da *C. d. terrificus* bem como a crotoxina tem efeito inibitório sobre a proliferação celular no baço, para tanto a crotoxina tem que está completa para que ocorra este fenômeno, pois já foi demonstrado que a fração básica (CB) quando induzida com a concanavalina A não inibe a proliferação celular.

A administração da crotoxina induziu inibição significativa de 62% no espriamento de macrófagos peritoniais quando comparado ao grupo controle. A toxina também inibiu a fagocitose com *C. albicans* em 53% (RANGEL-SANTOS et al. 2004).

A crotoxina é o principal componente neurotóxico do veneno (VITAL-BRASIL, 1972; CARDOSO; MOTA, 1997), também causa inibição direta na atividade de espriamento e fagocitose, sugerindo que essa toxina interfere no efeito inibitório do veneno bruto sobre a função de macrófagos e pode contribuir para a atividade antiinflamatória do veneno crotálico (SAMPAIO et al., 2003/2005).

O espriamento e a fagocitose de macrófagos são mecanismos que requerem o rearranjo das proteínas do citoesqueleto (RABINOVITCH, 1975; SWANSON; BAER, 1995; SAMPAIO et al., 2003), embora o caminho intracelular durante a fagocitose e o rearranjo do citoesqueleto de proteínas sobre a superfície do fagossomo depende do receptor envolvido durante o mecanismo de ingestão da partícula por IgG- e opsonizada por complemento (SAMPAIO et al., 2003).

O fato do veneno da *Crotalus durissus terrificus* inibir diretamente o espriamento de macrófagos e a atividade fagocítica não é dependente do receptor sugere um mecanismo comum, provavelmente alterando a ativação do citoesqueleto, que pode estar envolvida nesse processo (SAMPAIO et al., 2003).

Tam e Hinsdill (1984) estudando o efeito do tratamento da carragenina sobre macrófagos peritoniais quando inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* observaram a redução da capacidade fagocítica e o aumento do índice da atividade fungicida. Esses efeitos observados foram dose dependente embora sem significância estatística quando comparado com o grupo controle. Quando foi tratado com indometacina houve uma redução da habilidade dos macrófagos peritoniais de ingerir os fungos em concentrações abaixo de 0,3µg/mL. A atividade fungicida foi também reduzida em macrófagos peritoniais tratados com doses de 25 a 50µg/mL, mais em altas doses houve pouca ingestão do fungo. Quando foi utilizado o dextran-sulfato houve uma redução da porcentagem dos macrófagos peritoniais residentes de ingerir *C. albicans* não opsonizadas (GINSBURG et al., 1981).

Souza-e-Silva et al. (1996) demonstraram o efeito inibitório do espriamento e da atividade fagocítica causado pelo veneno da *Crotalus durissus terrificus* sobre macrófagos ativados com crotoxina. Essas observações sugeriram que o veneno da Cdt tem um efeito supressor sobre a resposta imune humoral. Nesse trabalho foi demonstrado que tanto o veneno da Cdt como o principal componente tóxico, a crotoxina, tem efeito inibitório sobre a resposta imune humoral mais não sobre a resposta imune celular.

Bishayi (2000) estudando a fagocitose em macrófagos peritoniais de camundongos com *S. aureus* e tratados com arsênico encontrou significativa redução ao compará-lo com o grupo controle, houve também redução com relação à atividade bactericida, a porcentagem de bactérias viáveis aos 10 minutos foi menor em células tratadas com arsênico.

Rementería et al. (1995), estudando a atividade fagocítica utilizando a *C. albicans* no período de tempo de 20 dias, observaram a redução no primeiro dia de infestação, ocorrendo aumento partir do segundo dia e permanecendo até o oitavo dia, com relação à atividade fungicida houve aumento significativo entre os dias quatro e dez, tendo registrado o maior aumento aos dez dias. A infecção por *C. albicans* induziu aumento na atividade de macrófagos peritoniais, foi revelado pela atividade fagocítica, atividade fungicida, e a síntese de óxido nítrico pelas células. O período de aumento não foi exatamente para todos os parâmetros, mais todos coincidiram entre os dias quatro e seis de infecção.

Cruz et al. (2005), estudando as propriedades funcionais de macrófagos expostos por 24 horas ao veneno da *Crotalus durissus terrificus* nas dosagens de 2-20µg/mL, observaram inibição significativa da fagocitose e espriamento (44%) quando comparados com o grupo controle em todas as dosagens estudadas.

Este trabalho foi pioneiro e abre uma nova linha de pesquisa para o nosso grupo, estudando os efeitos hematológicos e funcionais causados pelos venenos das serpentes do gênero *Crotalus*. Muitos questionamentos ainda necessitam investigações científicas, destacando o “burst” oxidativo (peróxido de hidrogênio e óxido nítrico), bem como a ação de citocinas que interferem diretamente na produção de células na medula óssea.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em decorrência dos dados obtidos concluímos que:

- Foi encontrada uma discreta anemia do tipo microcítica e hipocrômica, nos animais inoculados com os venenos da *Crotalus durissus ruruima* e suas frações Crotoxina e Fosfolipase A₂.
- Os tipos de células predominantes no sangue periférico foram os linfócitos em todos os grupos estudados, contribuindo para a atividade imunológica.
- A contagem global de células no peritônio apresentou aumento para os venenos da *Crotalus durissus cascavella* – Ceará, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus ruruima* e a fração da Crotoxina.
- O tipo de célula predominante no peritônio foi o macrófago, embora apenas o veneno da *Crotalus durissus collilineatus* apresentou significância estatística.
- Após a inoculação com os venenos das diferentes subespécies crotálicas, houve redução significativa do espraçamento frente à *C. albicans*.
- A atividade fagocítica apresentou significância estatística para os venenos da *Crotalus durissus cascavella* - Ceará, *Crotalus durissus cascavella* - Maranhão, *Crotalus durissus ruruima* e a fração Crotoxina em todos os tempos estudados.
- A Atividade Fungicida de macrófagos frente a *C. albicans* apresentou-se reduzida nos venenos da *Crotalus durissus cascavella* - Ceará, *Crotalus durissus collilineatus*, e a fração Crotoxina em todos os tempos estudados.
- O veneno de serpentes do gênero *Crotalus* interfere na intensidade e no tipo de resposta funcional de macrófagos. Entretanto não se pode ainda afirmar que esta resposta seja uniforme e extensiva a todas as funções dos macrófagos.

- Conclui-se que o veneno interfere diferentemente na resposta hematológica e funcional. Em adição pode-se postular que os macrófagos foram responsáveis por estas alterações. Estudos futuros deverão ser realizados na perspectiva da identificação de provável ação fungicida de venenos ofídicos e suas frações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A.R.; UZCATEGUI, W.; AZUAJE, R.; AGUILAR, I.; GIRÓN, M.E. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. **Rev. Cubana Med. Trop.**, v.52, n.2, p.90-94, 2000.

ADEREN, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v.17, p.593-623, 1999.

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, n.6, p.877-885, 1985.

AMARAL, C.F.S.; SILVA, O.A. Afibrinogenemia following snake bite (*Crotalus durissus terrificus*). **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v.29, p.877-885, 1980.

AMARAL, C.F.S.; RESENDE, N.A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.28, n.4, p.220-227, 1986.

AMORA, D.N.; SOUSA, T.M.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.F.; MAGALHÃES, M.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MENEZES, D.B.; MONTEIRO, H.S.A. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v.47, p.260-264, 2006.

AMORA, D.N. **Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Crotalus durissus collilineatus***. 2005. 100 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem. J.**, v.212, p.835-842, 1983.

ARRUDA, M.S.P.; RICHINI, V.B.; OLIVEIRA, S.M.A.; VILANI-MORENO, F.R. Experimental murine mycobacteriosis: evaluation of the functional activity of alveolar macrophages in thalidomide-treated mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.485-492, 2004.

AUGER, M.J.; ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: Lewis, C.E. & McGee, J.O'D. **The macrophage**. Oxford: Oxford University Press, 1992. cap.1, p.1-74.

AZEVEDO MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v.23, n. 4, p.631-636, 1985.

AZEVEDO MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n.11, p.1163-1168, 1987.

AZEVEDO MARQUES, M.M.; CUPO, P. Rattlesnake bites. Clinical features and complementary tests. **Mem. Inst. Butantan**, v.52 (Supl.), p.27-30, 1990

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

BARRAVIERA, B.; BONJORNO JR., J.C.; ARAKARI, D.; DOMINGUES, M.A.; PEREIRA, P.C.; MENDES, R.P.; MACHADO, J.M.; MEIRA, D.A. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus senak* bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v.22, p.5-12, 1989.

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

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. **Arq. Brás. Méd.**, v.65, n.4, p.345-355, 1991.

BERCHOVICI, D. APUD RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E.C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D.F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v.43, n.7, p.801-810, 2004.

BERCOVICI, D.; CHUDZINSKI, A.M.; DIAS, W.O.; ESTEVES, M.I.; HIRAICHI, E.; OISHI, N.Y.; PICARELLI, Z.P.; ROCHA, M.C.; UEDA, C.M.P.M.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v.49, n.3, p.69-78, 1987.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Therap.**, v.62, n.3, p.325-372, 1994.

BISHAYI, B. Sodium arsenite induced alteration in functional activity of murine peritoneal macrophages. **Indian J. Pharmacol.**, v.32, p.192-197, 2000.

BOKOCH, G.M. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. **Trends Cell Biol.**, v.5, p.109-113, 1995.

BON, C. Snake venom and pharmacopoeia. *In*: Bauchot, R. (Ed.) **Snakes a natural history**. New York: Sterling Publishing, 1997. p.194-209.

BORELLI, P.; KANG, H.C.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z. Protein proteic malnutrition: some aspects of in vitro adhesion of mouse peritoneal macrophage. **Ann. Nutr. Metabol.**, v.42, p.367-373, 1998.

BOT, F.J.; VAN, EIJK, L.; SCHIPPER, P.; LÖWENBER, B. Human granulocyte-macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF) stimulates immature marrow precursors but no CFU-GM, CFU-G or CFU-M. **Exp. Hematol.**, v.17, p.292-295, 1989.

BOWTON, D.L.; SEEDS, M.C.; FASANO, M.B.; GOLDSMITH, B.; BASS, D.A. Phospholipase A₂ and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. **Am. J. Resp. Care Med.**, v.155, p.421-425, 1997.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 1998.

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

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and the crotoxin complex. **Toxicon**, v.14, n.3, p.221-233, 1976.

BUCHI, D.F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Struct. Funct.**, v.18, p.399-407, 1993.

BUMOL, T.F.; DOUGLAS, S.D. Human monocyte cytoplasmic spreading in vitro: Early kinetics and scanning electron microscopy. **Cell. Immunol.**, v.34, p.70-78, 1977.

CALDER, P.C. Fuel utilization by cells of the immune system. **Proc. Nutrition Soc.**, v.34, p.65-82, 1995.

CARDOSO, D.F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v.35, n.4, p.607-612, 1997.

CARVALHO, H.F.; BUZATO, C.B.C. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005. cap.29, p.372-381.

CEARÁ. Secretária de Saúde do Estado do Ceará. Comissão Estadual de Controle de Zoonoses. **Zoonoses no Ceará um Desafio a Vencer**. Fortaleza, 2003.

CENCI, E.; ROMANI, L.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; SCHIAFFELLA, E.; PUCCETTI, P.; BISTONI, F. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. **Eur. J. Immunol.**, v.23, p.1034-1038, 1993.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J.L.; 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.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.T.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.99, p.13926-13931, 2002.

CHANG, C.C.; TSENG, K.H. Effector crotonamine a toxin of South American rattlesnake venom on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v.63, p.551-559, 1978.

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v.30, n.9, p.1099-1109, 1992.

CHEN, R.H.; CHEN, Y.C. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon acutus* (five pace snake) and its effect on platelet aggregation. **Toxicon**, v.27, n.6, p.675-682, 1989.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v.29, n.11, p.1279-1303, 1991.

CORAZZINI, R. **Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos ao choque térmico.** 1993. 156 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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

CRUZ, A.H.; MENDONÇA, R.Z.; PETRICEVICH, V.L. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. **Med. Inflam.**, v.6, p.349-359, 2005.

CUMMINGS, B.S.; MCHOWAT, J.; SCHNELLMANN, R.G. Phospholipase A₂ in cell injury and death. **JPET**, v.294, p.793-799, 2000.

CUPO, P; AZEVEDO MARQUES, M.M. & HERING, S.E. Clinical and laboratory features of south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.82, p.924-949, 1988.

CUPO, P; AZEVEDO MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Acute myocardial infarction like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.84, p.447-51, 1990.

CZARNETZKY, B.M.; COWAN, D.H.; BELCHER, R.W. The effects of polyanions on NBT reduction hexose monophosphate shunt activity, and ultrastructure of polymorphonuclear leukocytes. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.64, p.34-40, 1975.

DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v.379, p.537-540, 1996.

DEMPSTER, D.W.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; HOWGOOD, R.J. Intramitochondrial calcium deposits associated with muscle necrosis induced by crotoxin. **J. Physiol.**, v.300, p.21, 1980.

DESJARDINS, M.; CELIS, J.E.; VON MEER, G.; DIEPLINGER, H.; JAHRAUST, A.; GRIFFITHS, G.; HUBER, L.A. Molecular characterization of phagosomes. **J. Biol. Chem.**, v.269, n.51, p.32194-32200, 1994.

DINARELLO, C.A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.216, p.133-165, 1996.

DOLEY, R.; KING, G.F.; MUKHERJEE, A.K. Differential hydrolysis of erythrocyte and mitochondrial membrane phospholipids by two phospholipase A₂ isoenzymes (NK-PLA₂-I and NK-PLA₂-II) from the venom of the Indian monocled cobra *Naja kaouthia*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.425, p.1-13, 2004.

DOUGLAS, S.D. Human monocyte spreading in vitro – inducers and effects on Fc and C3 receptors. **Cell. Immunol.**, v.21, p.344-349, 1976.

DZIERZAK, E.; MEDVINSKY, A.; BRUIJN, M. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. **Immunol. Today**, v.19, n.5, p.228-236, 1998.

DU, X.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v.40, p.659-665, 2002.

DU, X.; SIM, D.S.; LEE, W.; ZHANG, Y. Blood cell as targets of snake toxins. **Blood Cell, Mol. Dis.**, v.36, p.414-421, 2006.

EPSTEIN, D.; WYSOCKI, M.; BIDDLE, W.; STRECK, R.J.; ROLF, M.M.; PAULY, J.L. A serum-free culture medium for monocyte/macrophage studies. **Focus**, v.13, n.4, p.120-124, 1991.

FALLON, H.J.; FRIE, E.; DAVIDSON, J.D.; TRIER, J.S.; BURK, D. Leukocyte preparations from human blood: evaluation of their morphologic and metabolic state. **J. Lab. Clin. Med.**, v.59, n.5, p.779-791, 1962.

FARSKY, S.H.P.; COSTA-CRUZ, J.W.M.; CURRY, Y.; TEIXEIRA, C.F.P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: invivo and in vitro studies. **Toxicon**, v.35, n.2, p.185-193, 1997.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, v.223, p.161-164, 1994.

FEITOSA, R.F.G.; MELO, I.M.L.A.; MONTEIRO, H.S.A. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no estado do Ceará – Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, n.4, p.295-301, 1997.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; GOMBAROVITS, M.E.C.; VALENZUELA, J.G.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comp. Biochem. Physiol., Part C.** v.127, p.23-36, 2000.

FRANSON, R.; PATRIARCA, P.; ELSBACH, P. Phospholipid metabolism by phagocytic cells. Phospholipases A₂ associated with rabbit polymorphonuclear leukocyte granules. **J. Lipid Res.**, v.15, p.380-388, 1974.

FRIEDERICH, C.; TU, A.T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmacol.**, v.20, n.7, p.1549-1554, 1971

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunol.**, v.149, p.685-688, 1998.

GIL-LAMAIGNERE, C.; ROILIDES, E.; LYMAN, C.A.; SIMITSOPOULOU, M.; STERGIPOULOU, T.; MALOUKOU, A.; WALSH, T.J. Human phagocytic cell responses to *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*): variable susceptibility to oxidative injury. **Infect. Immunity.**, v.71, n.11, p.6472-6478, 2003.

GINSBURG, I; SELA, M.M.; MORAG, A.; RAVID, A.; DUCHAN, Z.; FERNE, M.; RABINOWITZ-BERGNER, S.; THOMAS, P.P.; DAVIES, P.; NICCOLS, P.; HUMES, J.; BONNEY, R. Role of leukocyte factors and cationic polyelectrolytes in phagocytosis of group a streptococci and *Candida Albicans* by neutrophils, macrophages, fibroblasts, and epithelial cells: modulation by anionic polyelectrolytes in relation to pathogenesis of chronic inflammation. **Inflammation**, v.5, p.289-312, 1981.

GOPALAKRISHNAKORE, P.; DEMPSTER, W.D.; HAWGOOD, B.J.; ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, v.22, n.1, p.85-98, 1984.

GREGORY-DWYER, V.M.; EGEN, N.B.; BOSISIO, A.B.; RIGHETTI, P.G.; RUSSELL, F.E. An isoelectric focusing study of seasonal variation in rattlesnake venom proteins. **Toxicon**, v.24, n.10, p.995-1000, 1986.

GROSS, R.L.; NEWBERNE, P.M. Role of nutrition in immunologic function. **Physiol. Ver.**, v.60, n.1, p.188-302, 1980.

GUIMARÃES, J.A.; FONSECA NETO, M.D.; ROUQUAYROL, M.Z. LIMA VERDE, J.S. Acidentes ofídicos: Identifique-trate. Centro de Atendimento Toxicológico, Fortaleza, 1989.

HARDING, C.V. Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules. **Trends Cell Biol.**, v.5, p.105-109, 1995.

HAVT, A.; NOBRE, A.C.L.; MONTEIRO, J.S.A.; SOUZA, I.P.; MENEZES, D.B.; MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.C. Acute toxicity and hematological alterations caused by *Bothrops jararacussu* in wister rats. **Ciência e Tecnologia**, v.1, n.2, p.53-61, 1999.

HAVT, A.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon**, v.39, p.1841-1846. 2001.

HERSCOWITZ, H.B.; HOLDEN, H.T.; BELLANTI, J.A.; GHAFFAR, A. **Manual of macrophage methodology**. New York: Marcel Dekker, 1981, cap.8, p.272-275.

JAMES, M.J.; PENGLIS, P.S.; CAUGHEY, G.E.; DEMASI, M.; CLELAND, L.G. Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-lomoting inflammatory response? **Inflamm. Res.**, v.50, p.249-253, 2001.

JAYANTHI, G.P.; GOWDA, T.V. Geographical variation in Índia in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Viper russelli*) venom. **Toxicon**, v.26, n.3, p.257-264, 1988.

JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper *Bothrops nummifera*. **Toxicon**, v.2, n.3, p.187-190, 1964.

JOHNSTON Jr. R.B. Monocytes and macrophages. **N. Engl. J. Med.**, v.318, n.12, p.747-752, 1988.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Incoagulabilidade sangüínea no acidente crotálico. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v.21 (Supl.), p.121, 1988.

_____. Acidentes por animais peçonhentos. In: Amato neto, V. & Baldy, J. L. S. **Doenças Trasmisíveis**. São Paulo: Sarvier, 1989, p.133-41.

_____. Acidentes por serpentes peçonhentos do Brasil. **Rev. Assoc. Med. Brasil**, v.36, n.2, p.66-77, 1990.

KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C. Haemostatic changes caused by venoms of South American Snakes. **Toxicon**, v.27, n.9, p.955-963, 1989.

KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C.; THEAJSTON, R.D.G.; SANO-MARTINS, I.S.; HUTTON, R.A.; RUGMAN, F.P.; WARRELL, D.A.; HAY, C.R.M. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. **Toxicon**, v.29, n.8, p.961-972, 1991.

KARNOVSKY, M.L.; LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. **J. Immunol.**, v.121, n.3, p.809-813, 1978.

KELEN, E.M.A.; ROSENFELD, G.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venom. II. Variation in relation to erythrocyte species. **Mem. Inst. Butantan**, v.30, p.133-142, 1960/62.

KELLY, C.J.; GALLAGHER, H.; WOLF, B.A.; DALY, J.M. Alterations in macrophage signal transduction pathways mediate post-traumatic changes in macrophage function. **J. Surg. Res.**, v.57, p.221-226, 1994.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v.27, n.6, p.613-635, 1989.

KING, W.; PAULSON, S.R.; PUCKETT, N.L.; KREBS, A.T. Cell death. IV. The effect of injury on the entrance of vital dye in Ehrlich tumor cells. **Am. J. Pathol.**, v.35, p.1067-1075, 1959.

KOOGUCH, K.; HASHIMOTO, S.; KOBAYASHY, A.; KITAMURA, Y.; KUDOH, I.; WIENER-KRONISH, SAWA, T. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infect. Immun.**, v.66, p.3164-3169, 1998.

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **Br. J. Pharmacol.**, v.114, p.578-583, 1995.

LEHRER, R.I.; CLINE, M.J. Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. **J. Bacteriol.**, v.98, p.996-1004, 1969.

LEVITZ, S.M. Overview of host defenses in fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, v.14, p.S37-42, 1992.

LEWIS, G.P. **Mediadores of inflammation**. Bristol: Ed. Wright, 1986. c.11, p.123-135.

LEWIS, C.E.; MCGEE, J.O'D. **The Macrophage**. New York: Oxford University Press, p.3-73, 1992.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine - 49 phospholipase A₂ myotoxicity from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, p.885-901, 2003.

MACKANESS, G.B. Cellular resistance to infection. **J. Exp. Med.**, v.116, p.381-406, 1962.

_____. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. **J. Exp. Med.**, v.129, p.973-992, 1968.

MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F. Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.28, p.228-233, 1986.

MAKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, n.12, p.1749-1800, 1998.

MARSH, N.; GLATSTON, A. Some observations on the venom of the rhinoceros horned viper, *Bitis nasicornis* Shaw. **Toxicon**, v.12, n.6, p.621-628, 1974.

MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A.; GUEDES Jr, E.O.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v.36, n.10, p.1441-1450, 1998.

MARTINS, A.M.C.; TOYAMA, M.H.; HAVT, A.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* Venom Components that Induce Renal Toxicity in Isolated Rat Kidneys. **Toxicon**, v.40, p.1165-1171, 2002.

MARTINS, A.M.C.; LIMA, A.A.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A₂ and ciclooxigenase. **Pharmacol. Toxicon**, v.92, p.14-20, 2003.

MCCLURE, B.; STOMSKI, F.; LOPEZ, A.; WOODCOCK, J. Perverted responses of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor in mouse cell lines due to cross-species β -subunit association. **Blood**, v.98, n.10, p.3165-3168, 2001.

METCALF, D. **Clonal culture of hemopoietic cell: techniques and applications**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 1984.

_____. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, v.67, n.2, p.257-267, 1986.

MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacol Toxicol.**, v.85, p.198-200, 1999.

MONTEIRO, H.S.A.; DA SILVA, I.M.S.C.; MARTINS, A.M.C.; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.34, p.1347-1352, 2001.

MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of T_H1 and T_H2 responses. **Immunol. Today**, v.12, n.3, p.A49-A53, 1991.

MURRAY, H.W.; NATHAN, C.F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **J. Exp. Med.**, v.189, n.4, p.741-746, 1999.

NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.319-326, 1987.

NILSSON, S.K.; DOONER, M.S.; QUESENBERRY, P.J. Synchronized cell-cycle induction of engrafting long-term repopulating stem cells. **Blood**, v.90, n.11, p.4646-4650, 1997.

NOBRE, A.C.L.; JORGE, M.C.M.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v.32, p.985-988, 1999.

NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M. Acidentes crotálicos em animais domésticos. **Rev. Cons. Fed. Méd. Vet.**, v.31, p.47-56, 2004.

NOGUEIRA, T.C.A.; FERREIRA, F.; TOYAMA, M.H.; STOPPIGLIA, L.F.; MARANGONI, S.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M. Characterization of the insulinotropic action of a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus collilineatus* rattlesnake venom on rat pancreatic islets. **Toxicon**, v.45, p.243-248, 2005.

NORTH, R.J. The concept of the activated macrophage. **J. Immunol.** v.121, n.3, p.806-808, 1978.

OGURA, M.; KITAMURA, M. Oxidant stress incites spreading of macrophages via extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. **Am. Assoc. Immunol.**, v.161, p.3569-3574, 1998.

OLIVEIRA, D.G.; TOYAMA, M.H.; MARTINS, A.M.C.; HAVT, A.; NOBRE, A.C.L.; MARANGONI, S.; CÂMARA, P.R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; BELIAM, L.O.S.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Structural and biological characterization of a crotoptin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v.42, p.53-62, 2003.

OOSTENDORP, R.A.J.; HARVEY, K.N.; KUSADASI, N.; BRUIJN, M.F.T.R.; SARIS, C.; PLOEMACHER, R.E.; MEDVINSKY, A.L.; DZIERZAK, E.A. Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. **Blood**, v.99, n.4, p.1183-1189, 2002.

PAPADIMITRIOU, J.M.; ASHMAN, R.B. Macrophages: Current views on their differentiation structure and function. **Ultrastruc. Pathol.**, v.13, p. 343-372, 1989.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1999. c.4, p.32-49, 327p.

PETRICEVICH, V.L. Cytocine and nitric oxide production following severe envenomation. **Curr Drug Target Inflamm & Allergy**, v.3, p.325-332, 2004.

PINHO, F.M.O.; VIDAL, E.C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crocálico. **J. Bras. Nefrol.**, v.22, n.3, p.162-168, 2000.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Ass. Méd. Brás.**, v.47, n.1, p.24-29, 2001.

PLATT, N.; SILVA, R.P.; GORDON, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. **Trends Cell. Biol.**, v.8, p.365-372, 1998.

PONCE-SOTO, L.A.; TOYAMA M.H.; HYSLOP, J.C.; MARANGONI, S. Isolation and Preliminary Enzymatic Characterization of a Novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* Venom. **J. Prot. Chem.**, v.21, n.3, p.131-136, 2002.

RABINOVITCH, M.; DESTEFANO, M.J. Macrophage spreading in vitro. I. Induced of spreading. **Exp. Cell. Res.**, v.77, Issue 1-2, p.323-334, 1973.

_____. Macrophage spreading in vitro. II. Manganese and other metals as inducers or as co-factors for induced spreading. **Exp. Cell. Res.**, v.79, p.423-430, 1973.

RABINOVITCH, M. Professional and non- professional phagocytes: an introduction. **Trends Cell Biol.**, v.5, p.85-87, 1995.

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E.C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D.F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v.43, n.7, p.801-810, 2004.

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D.F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v.44, p.609-616, 2004.

RAPAPORT, S.I. **Hematologia Introdução**. 2^a ed., São Paulo: Roca, 1990. cap.14, p.157-174.

RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v.19, p.333-338, 1986.

REID, H.A.; THEAKSTON, R.D.G. The management of snake bite. **Bull W.H.O.**, v.61, n.6, p.885-895, 1983.

REMENTERÍA, A.; GARCÍA-TOBALINA, R.; SEVILLA, M.J. Nitric oxide-dependent killing of *Candida albicans* by murine peritoneal cells during an experimental infection. **FEM Immunol. Méd. Microb.**, v.11, p.157-162, 1995.

RESPOSTA imunológica mediada por célula. Disponível em: <http://www.ioh.medstudents.com.br/ric2.htm>. Acesso em: 27 abr. 2006.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, cap.2, p.33-72.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v.20, p.315-328, 1947.

ROSENFELD, G.; HAMPER, G.; KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Mem. Inst. Butantan**, v.29, p.143, 1959.

ROSENFELD, G.; KELEN, E.M.A.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. I. Classification in different types and activities. **Mem. Inst. Butantan**, v.30, p.103-116, 1960/62.

RUSSEL, F.E. **Snake Venom Poisoning**. New York: Scholium International Grat Neck, 1983.

_____. **Toxic effects of animal toxins**. In: Klaassen, C.D. (Ed). Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poison. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.801-839.

SALIBA, A.M.; BELLUOMINI, H.E.; LEINZ, F.F. Experimentelle Crotalus vergiftung bei reidern anatomisch pathologische studie. **Dtsch Tierarzte Wschr**, v.90, p.503-546,1983.

SAMPAIO, S.C.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leukoc. Biol.**, v.70. p.551-558, 2001.

SAMPAIO, S.C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, E.C.; DOS-SANTOS, A.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v.41, n.7, p.899-907, 2003.

SAMPAIO, S.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURI, R. & CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v.45, n.7, p.671-676, 2005.

SAMPAIO, S.C.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R.G.; SANTOS, E.C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v.47, p.313-321, 2006.

SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L.; MORENA, P.; SOUSA-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.; KAMIGUTI, A.S. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dog. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v.28, p. 303-312, 1995.

SANO-MARTINS, L.S.; TOMY, S.C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B.; CASTRO, S.C.B.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; KAMIGUTI, A.S.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D.G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **J. Q. Méd.**, v.94, p. 551-559, 2001.

SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venom from

three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp. Biochem. Physiol**, Part C. v.122, p.61-73, 1999.

SANTOS, B.F.; SERRANO, S.M.T.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS Letters**, v.477, p. 199-202, 2000.

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

SASADA, M.; JOHNSTON Jr, R.B. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophages. **J. Exp. Méd.**, v.152, p. 85-98, 1980.

SCOTT, K.F.; BRYANT, K.J.; BIDGOOD, M.J. Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A₂-cyclooxygenase pathways in inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v.66, p.535-541, 1999.

SILVA, O.A.; LOPES, M.; GODOY, P. Intensive care unit treatment of acute renal failure following snake bite. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.28, n.2, p.401-407, 1979.

SILVA, M.C.C.S.; GONÇALVES, L.R.C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Med. Inflammat.**, v.5, n. p.18-23, 1996.

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

SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. **Mechanisms of disease.**, 2.ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1990, Cap.4, p.167-301.

SMITH, W.L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **Am. J. Physiol.**, v.263, p.181-191, 1992.

SOUZA, I.P. **Desnutrição protéica:** efeito sobre a ativação, espraiamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais de camundongos. 1995. 86p. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Med. Inflamm.**, v.5, p. 18-23, 1996.

SUHR, S.; KIM, D. Identification of the venom substance that induced apoptosis. **Bioch. Biophys. Res. Commun.** v.224, p.134-139, 1996.

SUNDELL, I.B.; AZIZ, K.A.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, D.G. The role of phospholipases A₂ in the stimulation of neutrophil motility by cobra venoms. **Toxicol**, v.41, p.459-468, 2003

SWANSON, J.A.; BAER, S.C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends Cell Biol.**, v.5, p.89-93, 1995.

SZILVASSY, S.J.; BASS, M.J.; VAN ZANT, G.; GRIMES, B. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by ex vivo expansion. **Blood**, v.93, n.5, p.1557-1566, 1999.

TAM, P.E.; HINS DILL, R.D. Evaluation of immunomodulatory chemicals: alteration of macrophage function in vitro. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, v.76, p.183-194, 1984.

TEIXEIRA, E.H.; HAVT, A.; BARBOSA, P.S.F.; MENESES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Prot. Pept. Letters**, v.8, p.477-484, 2001.

TEIXEIRA, C.P.F.; LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A₂. **Toxicon**, v.42, p.947-962, 2003.

THOMAZINI, I.A.; JUAN, F.C.; CARVALHO, I.; HERNANDES, D.H.; AMARAL, I.F.; PEREIRA, P.C.M.; BARRAVIERA, B. Evaluation of platelet function and of serum fibrinogen levels in patients bitten by snakes of the genus *Crotalus*. Preliminary report. **Rev. Inst. Méd. Trop. S. Paulo**, v.33, p.219-220, 1991.

THOMAS, R.G.; POUGH, F.H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, v.17, n.3, p.221-228, 1979.

TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; BARBOSA, R.L.; CORSO, G.; BOSCHERO, A.C. Biochemical characterization of two isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1474, p.56-60, 2000.

TOYAMA, M.H.; OLIVEIRA, D.G.; BERIAN, L.O.S.; NOVELLO, J.C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA₂ isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v.41, p.1033-1038, 2003.

VADAS, P. Elevated plasma phospholipase A₂ levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. **J. Lab. Clin. Méd.**, v.104, n.6, p.873-881, 1984.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. **Lab. Invest.**, v.55, p.391-404, 1986.

VARANDA, E.A.; GIANNINI, M.J.S. **Bioquímica** de venenos de serpentes. *In*: Barraviera, B. (Coord.). Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. v.14, p.205.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, p.59-70, 2000.

VAN DISSEL, J.T.; VAN LANGEVELDE, P.; WESTERDORP, R.G.; KWAPPENBERG, K.; FROLICH, M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. **Lancet**, v.351, n.9107, p. 950-953, 1998.

VAN FURTH, R.; COHN, Z.A.; HIRSCH, J.G.; HUMPHREY, J.H.; SPECTOR, W.G.; LANGEVOORT, H.L. **The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells**. Paris: Bull, 1969. p.845-852.

VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; BALISH, E. Candidacidal activity of macrophage from immunocompetent and congenitally immunodeficient mice. **J. Infect. Dis.**, v.170, p.180-188, 1994.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. **J. Formosan Méd. Assoc.**, v.71, p.394-968, 1972.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D. Toxins as tools in the study of sodium channel distribution in the muscle fibre membrane. **Toxicon**, v.31, n.9, p.1085-1098, 1993.

WAJCHENBERG, B.L.; SESSO, J.; INAGUE, T. Feições clínico-laboratoriais do envenenamento crotálico humano. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.1, p.179-193, 1954/55.

WANG, Q.Q.; CHEN, J.S.; LIANG, X.X.; QIU, P.X.; WANG, Y.W.; YAN, G.M. Hemorrhagic activity and mechanism of FII_a, a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.25, n.4, p.514-521, 2004

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, v.355, p.646-648, 2000.

WORLD Health Organization. **Progress in the characterization of venom and standardization of antivenoms**. Geneva, 1981.WHO Publication, n°.58.

WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.; LICHTMAN, M.A. **Hematology**. 4. ed., New York: McGraw - Hill, 1991.

YASSAD, A.; LAVOINNE, A.; BION, A.; DAVEAU, M.; HUSSON, A. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophage in culture. **FEBS Lett.**, v.413, p.81-84, 1997.

ZHAO-YAN, L.; TIE-FU, Y.; ERIC, C.; LIAN, Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v.32, n.11, p.1349-1358, 1994

Anexo 01 - TABELA 10: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre o Eritrograma (Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito e os Índices Hematimétricos).

ERITROGRAMA

PARÂMETROS ANALISADOS	C (salina)	Cdcc (120µg/Kg)	Cdcm (50µg/Kg)	Cdcol (27µg/Kg)	Cdru (20µg/Kg)	CTXru (10µg/Kg)	PLA ₂ ru (10µg/Kg)
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	7,38 ± 0,16	7,12 ± 0,92	7,73 ± 0,36	7,55 ± 0,26	6,90 ± 0,10	7,62 ± 0,36	7,73 ± 0,37
Hemoglobina (g/dL)	12,79 ± 0,32	11,95 ± 0,89	12,85 ± 0,55	11,87 ± 0,33	13,17 ± 0,11*	12,34 ± 0,36*	12,10 ± 0,57
Hematócrito (%)	47,22 ± 3,75	69,64 ± 0,88	71,72 ± 4,10*	42,42 ± 2,74	46,47 ± 1,03	41,63 ± 2,53	42,47 ± 2,31
VCM (fL)	63,30 ± 1,03	98,05 ± 1,01*	94,45 ± 2,07*	56,34 ± 3,08	68,09 ± 1,17	53,50 ± 6,30*	55,84 ± 1,22*
HCM (pg)	47,22 ± 1,53	69,80 ± 0,88	71,70 ± 3,94 *	42,43 ± 2,75	46,47 ± 1,04	41,63 ± 2,53	42,30 ± 2,31
CHCM (%)	27,26 ± 0,37	17,19 ± 1,03*	17,99 ± 0,38*	27,70 ± 0,32	28,62 ± 0,44	29,74 ± 1,18	28,571 ± 0,33

Legenda: C=Controle; Cdcc=cascavella-Ceará(120µg/Kg); Cdcm-cascavella-Maranhão(50µg/Kg); Cdcol=collilineatus(27µg/Kg); Cdru=ruruima(20µg/Kg); CTXru=Crotoxina(10µg/Kg); PLA₂ru =Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 02 - TABELA 11: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Global de Células no Sangue.

TIPOS DE ESTÍMULOS	CONTAGEM GLOBAL DE CÉLULAS DO SANGUE (x10 ³ /mm ³)
C (salina)	2,64 ± 0,13
Cdcc (120µg/Kg)	0,45 ± 0,90*
Cdcm (50µg/Kg)	0,79 ± 0,11*
Cdcol (27µg/Kg)	4,59 ± 0,43
Cdru (20µg/Kg)	0,17 ± 1,15*
CTXru (10µg/Kg)	4,47 ± 0,03
PLA₂ru (10µg/Kg)	3,00 ± 0,60

Legenda: C=Controle; Cdcc=*cascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdcm=*cascavella-Maranhão*(50µg/Kg); Cdcol=*collilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*ruruima*(20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina*(10µg/Kg); PLA₂ru =*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 03 - TABELA 12: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Sangue em porcentagem.

CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS DO SANGUE (%)							
PARÂMETROS ANALISADOS	C (salina)	Cdcc (120µg/Kg)	Cdcm (50µg/Kg)	Cdcol (27µg/Kg)	Cdru (20µg/Kg)	CTXru (10µg/Kg)	PLA ₂ ru (10µg/Kg)
Forma em Anel	1,91 ± 0,42	1,33 ± 1,50	3,00 ± 0,62*	0,83 ± 0,58	1,50 ± 0,33	1,67 ± 0,76	2,16 ± 0,60
Segmentados	16,50 ± 2,73	32,00 ± 2,22	17,00 ± 7,70	26,66 ± 6,61	35,50 ± 9,91	28,50 ± 11,39	37,00 ± 6,43
Eosinófilos	1,83 ± 0,57	1,66 ± 0,66	1,50 ± 0,66	0,67 ± 0,33*	1,16 ± 0,33	2,33 ± 0,44	2,00 ± 0,33
Linfócitos	77,16 ± 3,33	34,16 ± 0,80	77,16 ± 8,53	69,83 ± 7,39	60,50 ± 10,29	65,50 ± 12,10	58,00 ± 5,91
Monócitos	2,58 ± 0,58	1,66 ± 3,00	1,33 ± 0,45	2,00 ± 0,73	1,00 ± 0,58	1,83 ± 0,60	2,00 ± 0,33

Legenda. C=Controle; Cdcc=cascavella-Ceará(120µg/Kg); Cdcm=cascavella-Maranhão(50µg/Kg); Cdcol=collilineatus(27µg/Kg); Cdru=ruruima(20µg/Kg); CTXru=Crotoxina(10µg/Kg); PLA₂ru =Fosfolipase A₂ (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M., C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 04 - TABELA 13: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Sangue em milímetros cúbicos.

CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS DO SANGUE (/mm ³)							
PARÂMETROS ANALISADOS	C (salina)	Cdcc (120µg/Kg)	CdcM (50µg/Kg)	Cdcol (27µg/Kg)	Cdru (20µg/Kg)	CTXru (10µg/Kg)	PLA2ru (10µg/Kg)
Forma em Anel	49,58 ± 11,12	6,13 ± 1,31*	27,35 ± 3,33	45,00 ± 18,75	3,65 ± 20,73*	79,50 ± 1,84*	66,16 ± 27,34
Segmentados	438,83 ± 94,16	150,31 ± 1,95	183,86 ± 61,53	1443,50±159,82	49,55 ± 920,44	1234,50±17,86*	1078,50±268,71
Eosinófilos	49,17 ± 16,97	6,40 ± 2,14 *	12,67 ± 1,95*	30,33 ± 8,10	1,67 ± 17,74*	103,50 ± 0,48	63,66 ± 14,73
Linfócitos	2038,33±151,66	269,75± 0,72*	547,22± 51,38*	2967,67±253,36	112,46±788,20*	2971,16 ± 31,14	1727,66±558,93
Monócitos	65,75 ± 13,90	7,56 ± 2,75*	16,90 ± 2,47	96,83 ± 12,65	1,22 ± 36,02*	78,00 ± 0,58	64,00 ± 20,01

Legenda: C=Controle; Cdcc=*cascavella-Ceará*(120µg/Kg); CdcM=*cascavella-Maranhão*(50µg/Kg); Cdcol=*collilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*ruruima*(20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina*(10µg/Kg); PLA₂ru=*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 05 - TABELA 14: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Global de Células do Peritônio.

TIPOS DE ESTÍMULOS	CONTAGEM GLOBAL DE CÉLULAS DO PERITÔNIO (x10 ³ /mm ³)
C	0,46 ± 0,06
Cdcc (120µg/Kg)	1,40 ± 0,40*
CdcM (50µg/Kg)	1,19 ± 0,23
Cdcol (27µg/Kg)	1,67 ± 0,13*
Cdru (20µg/Kg)	1,65 ± 0,14*
CTXru (10µg/Kg)	1,37 ± 0,17 *
PLA ₂ ru (10µg/Kg)	1,12 ± 0,37

Legenda: C=Controle; Cdcc=cascavella-Ceará(120µg/Kg); CdcM-cascavella-Maranhão(50µg/Kg); Cdcol=collilineatus(27µg/Kg); Cdru=ruruima(20µg/Kg); CTXru=Crotoxina(10µg/Kg); PLA₂ru=Fosfolipase A₂(10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 06 - TABELA 15: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Peritônio em porcentagem.

CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS DO PERITÔNIO							
(%)							
PARÂMETROS ANALISADOS	C	Cdcc (120µg/Kg)	Cdcm (50µg/Kg)	Cdcol (27µg/Kg)	Cdru (20µg/Kg)	CTXru (10µg/Kg)	PLA₂ru (10µg/Kg)
Segmentados	1,33 ± 0,90	28,00 ± 3,62*	28,50 ± 3,62	33,50 ± 3,33 *	33,66 ± 3,12	15,83 ± 3,55*	20,00 ± 3,62*
Eosinófilos	0,08 ± 0,08	2,16 ± 0,62*	2,33 ± 0,62	3,50 ± 0,62*	2,83 ± 0,45	2,50 ± 0,33*	1,00 ± 0,33
Linfócitos	27,66 ± 4,11	6,67 ± 1,53	8,50 ± 5,69	15,16 ± 3,45	5,00 ± 3,45	8,33 ± 3,19	6,16 ± 1,10
Macrófagos	70,91 ± 4,22	63,16 ± 4,92	60,16 ± 5,77	46,16 ± 1,60*	58,50 ± 3,23	72,83 ± 8,07	72,83 ± 3,35

Legenda: C=Controle; Cdcc=*cascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdcm=*cascavella-Maranhão*(50µg/Kg); Cdcol=*collilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*ruruima*(20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina*(10µg/Kg); PLA₂ru=*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 07 - TABELA 16: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Contagem Diferencial de Células do Peritônio em milímetros cúbicos.

CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS DO PERITÔNIO (/mm ³)							
PARÂMETROS ANALISADOS	C	Cdcc (120µg/Kg)	Cdcm (50µg/Kg)	Cdcol (27µg/Kg)	Cdru (20µg/Kg)	CTXru (10µg/Kg)	PLA ₂ ru (10µg/Kg)
Segmentados	7,08 ± 4,45	385,58 ± 54,28	353,16 ± 19,44	537,33 ± 42,83*	570,66 ± 97,07	233,50±119,27*	232,00 ± 54,34
Eosinófilos	0,41 ± 0,41	29,17 ± 8,35	27,91 ± 5,73	60,50 ± 28,31 *	46,75 ± 4,96	32,83 ± 6,51*	10,66 ± 4,02
Linfócitos	122,04 ± 28,55	45,85 ± 23,02*	101,66 ± 97,73	267,17 ± 71,98	106,41 ± 53,97	130,33 ± 68,17	70,66 ± 11,46
Macrófagos	328,79 ± 45,34	887,50 ± 195,82	708,91 ± 135,16	772,33 ± 86,43	946,25 ± 50,45	960,83±230,21*	803,33 ± 78,35

Legenda: C=Controle; Cdcc=*cascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdcm=*cascavella-Maranhão*(50µg/Kg); Cdcol=*collilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*ruruima*(20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina*(10µg/Kg); PLA₂ru=*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 08 - TABELA 17: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre o Espreadimento em porcentagem.

TIPOS DE ESTÍMULOS	ESPRAIAMENTO (%)
C	39,83 ± 1,89
Cdcc (120µg/Kg)	13,67 ± 0,94*
CdcM (50µg/Kg)	18,83 ± 1,32*
Cdcol (27µg/Kg)	17,83 ± 0,62*
Cdru (20µg/Kg)	15,00 ± 0,62*
CTXru (10µg/Kg)	16,00 ± 1,04*
PLA ₂ ru (10µg/Kg)	16,67 ± 0,93*

Legenda: C=Controle; Cdcc=cascavella-Ceará(120µg/Kg); CdcM-cascavella-Maranhão(50µg/Kg); Cdcol=collilineatus(27µg/Kg); Cdru=ruruima(20µg/Kg); CTXru=Crotoxina(10µg/Kg); PLA₂ru=Fosfolipase A₂(10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 09 - TABELA 18: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fagocítica em porcentagem. significante em relação ao Controle.

ATIVIDADE FAGOCÍTICA (%)							
TEMPO (min.)	C	Cdcc (120µg/Kg)	Cdcm (50µg/Kg)	Cdcol (27µg/Kg)	Cdru (20µg/Kg)	CTXru (10µg/Kg)	PLA ₂ ru (10µg/Kg)
30	39,25 ± 1,30	58,67 ± 1,01*	32,16 ± 1,22*	33,66 ± 1,46	29,67 ± 1,48*	27,16 ± 3,72	23,22 ± 1,43
60	36,83 ± 7,67	30,16 ± 0,98*	32,67 ± 1,88	31,67 ± 0,88	29,84 ± 1,41*	28134 ± 2,17*	35,50 ± 1,87
90	38,84 ± 1,76	30,84 ± 0,44*	32,67 ± 1,60*	32,84 ± 1,50	31,50 ± 1,97*	26,67 ± 1,26	34,17 ± 2,28
120	38,42 ± 1,04	2950 ± 0,9*9	31,67 ± 1,11	32,67 ± 1,41	32,84 ± 2,21	25,84 ± 0,73*	33,50 ± 2,43

Legenda: C C=Controle; Cdcc=*cascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdcm=*cascavella-Maranhão*(50µg/Kg); Cdcol=*collilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*ruruima*(20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina*(10µg/Kg); PLA₂ru =*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença

Anexo 10 - TABELA 19: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em porcentagem.

ATIVIDADE FUNGICIDA (%)							
TEMPO (min.)	C	Cdcc (120µg/Kg)	Cdcm (50µg/Kg)	Cdcol (27µg/Kg)	Cdru (20µg/Kg)	CTXru (10µg/Kg)	PLA₂ru (10µg/Kg)
30	34,75 ± 1,58	31,67 ± 0,84	33,67 ± 1,55	21,67 ± 2,00*	36,00 ± 2,96	16,00 ± 2,13*	23,34 ± 1,83
60	35,25 ± 1,99	32,00 ± 0,93*	33,84 ± 1,58	21,67 ± 0,84*	37,50 ± 1,93*	15,17 ± 1,80*	22,17 ± 1,24
90	34,67 ± 2,01	29,67 ± 0,93*	32,50 ± 1,34	22,34 ± 1,32*	35,67 ± 2,60	16,67 ± 1,93*	20,83 ± 1,70
120	34,50 ± 2,00	31,50 ± 0,79*	33,17 ± 1,50	22,00 ± 1,10*	34,17 ± 2,00	17,34 ± 1,49*	20,83 ± 1,38

Legenda: C=Controle; Cdcc=*cascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdcm=*cascavella-Maranhão*(50µg/Kg); Cdcol=*collilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*ruruima*(20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina*(10µg/Kg); PLA₂ru =*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 11 - TABELA 20: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 30 minutos.

ATIVIDADE FUNGICIDA (30MIN)							
SCORE	C	Cdc	Cdm	Cdcol	Cdru	CTXru	PLA ₂ ru
00	66,50 ± 1,43	69,67 ± 1,17	66,67 ± 1,33	78,83 ± 2,07	64,00 ± 1,88	84,00 ± 1,55	77,17 ± 2,26
01	29,42 ± 2,22	29,00 ± 1,34	32,83 ± 1,42	20,67 ± 2,22	36,00 ± 1,88	16,00 ± 1,55	17,00 ± 2,02
02	2,33 ± 0,67	1,33 ± 0,33	0,50 ± 0,34	0,50 ± 0,34	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,17	1,67 ± 1,12
03	0,17 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	6,00 ± 3,50

Legenda: C=Controle; Cdc=*Cdcascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdm=*Cdcascavella-Maranhão* (50µg/Kg); Cdcol=*Cdcolilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*Cdruruima* (20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina* (10µg/Kg); PLA₂ru=*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Score: 0= *C. albicans* vivas; 1=1 a 2 *C. albicans* mortas; 2=3 a 4 *C. albicans* mortas; 3=+4 *C. albicans* mortas. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significante em relação ao Controle.

Anexo 12 - TABELA 21: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 60 minutos

ATIVIDADE FUNGICIDA (60MIN)							
SCORE	C	Cdc	Cdm	Cdcol	Cdru	CTXru	PLA ₂ ru
00	64,17 ± 1,34	69,33 ± 1,12	67,00 ± 0,84	79,17 ± 0,94	65,00 ± 1,62	84,83 ± 1,75	79,83 ± 0,95
01	31,42 ± 1,64	29,33 ± 2,74	32,17 ± 1,33	20,50 ± 1,73	34,67 ± 2,06	15,17 ± 0,95	20,00 ± 2,71
02	2,25 ± 0,68	1,33 ± 0,42	0,83 ± 0,40	8,67 ± 3,60	0,33 ± 0,33	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,34
03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,0

. Legenda: C=Controle; Cdcc=*Cdcascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdcm=*Cdcascavella-Maranhão* (50µg/Kg); Cdcol=*Cdcolilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*Cdruruima* (20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina* (10µg/Kg); PLA₂ru =*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Score: 0= *C. albicans* vivas; 1=1 a 2 *C. albicans* mortas; 2=3 a 4 *C. albicans* mortas; 3=+4 *C. albicans* mortas. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 13 - TABELA 22: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 90 minutos.

ATIVIDADE FUNGICIDA (90min)							
SCORE	C	Cdc	Cdm	Cdcol	Cdru	CTXru	PLA ₂ ru
00	67,08 ± 1,56	71,33 ± 0,88	68,17 ± 0,91	78,67 ± 1,38	64,00 ± 1,61	85,00 ± 2,34	79,67 ± 2,01
01	31,17 ± 1,15	27,67 ± 0,95	31,17 ± 0,98	20,33 ± 1,09	36,00 ± 1,69	16,67 ± 1,50	19,83 ± 2,14
02	1,75 ± 0,48	1,00 ± 0,37	0,67 ± 0,42	1,00 ± 0,52	0,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,50 ± 2,45
03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Legenda: C=Controle; Cdc=*Cdcascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdm=*Cdcascavella-Maranhão* (50µg/Kg); Cdcol=*Cdcolilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*Cdruruima* (20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina* (10µg/Kg); PLA₂ru=*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Score: 0= *C. albicans* vivas; 1=1 a 2 *C. albicans* mortas; 2=3 a 4 *C. albicans* mortas; 3=+4 *C. albicans* mortas. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle.

Anexo 14 - TABELA 23: Efeitos dos diferentes tipos de venenos sobre a Atividade Fungicida em Score no tempo de 120 minutos..

ATIVIDADE FUNGICIDA (120min)							
SCORE	C	Cdc	Cdm	Cdcol	Cdru	CTXru	PLA ₂ ru
00	65,50 ± 1,47	70,50 ± 0,72	67,33 ± 0,67	78,33 ± 1,43	65,83 ± 1,68	82,67 ± 1,15	78,33 ± 1,98
01	32,00 ± 2,79	27,50 ± 0,81	32,17 ± 0,75	21,00 ± 1,41	34,17 ± 1,68	17,33 ± 1,15	19,50 ± 2,45
02	1,00 ± 0,39	2,00 ± 2,00	0,17 ± 0,52	0,67 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,55 ± 0,22
03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,0

Legenda: C=Controle; Cdc=*Cdcascavella-Ceará*(120µg/Kg); Cdm=*Cdcascavella-Maranhão* (50µg/Kg); Cdcol=*Cdcolilineatus*(27µg/Kg); Cdru=*Cdruruima* (20µg/Kg); CTXru=*Crotoxina* (10µg/Kg); PLA₂ru=*Fosfolipase A₂* (10µg/Kg). Score: 0= *C. albicans* vivas; 1=1 a 2 *C. albicans* mortas; 2=3 a 4 *C. albicans* mortas; 3=+4 *C. albicans* mortas. Os resultados foram expressos em média ± E.P.M, C=12, os demais grupos n=6. *p ≤ 0,05, diferença significativa em relação ao Controle

Anexo 15:



NOTIFICAÇÃO DE ACEITE DE RESUMO

A Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia comunica a IÊDA PEREIRA DE SOUZA que o Resumo enviado, intitulado: “FUNCTIONAL ALTERATIONS CAUSED BY THE OF C.d.cascavella VENOMS OF CEARÁ AND MARANHÃO” (SOUZA, I.P.; BARROS, A.E.C.; SANTOS, F.M.; MENEZES, E.A.; SOUSA, D.F.; COSTA E SILVA, I.M.S.; MARTINS, R.D.; STUDART NETO, A.; PESSOA, C.Ó.; AMORA, D.N.; NOJOSA, D.V.; MARTINS, A.M.C.; BORELLI, P.; MONTEIRO, H.S.A.) foi aprovado, e será apresentado neste evento no período de 28 de novembro a 02 de dezembro do corrente ano.

Nos casos de tema livre, esta notificação deverá ser apresentada ao Coordenador da Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia ou ao seu substituto, na área de tema-livre, no dia e hora que serão disponibilizados em breve.

Fortaleza, 02 de outubro de 2006

Prof. Dr. Bruno Andrade Card
Secretário SBTx

P/ Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Presidente da SBTx

SBTx

Sociedade Brasileira de Toxinologia



Anexo 16:



NOTIFICAÇÃO DE ACEITE DE RESUMO

A Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia comunica a IÊDA PEREIRA DE SOUZA que o Resumo enviado, intitulado: “FUNCTIONAL ALTERATIONS CAUSED BY THE VENOM OF *Crotallus durissus ruruima* AND ITS FRACTION, CROTOXIN AND PHOSPHOLIPASE A2” (SOUZA, I.P.; BARROS, A.E.C.; SANTOS, F.M.; MENEZES, E.A.; SOUSA, D.F.; COSTA E SILVA, I.M.S.; MARTINS, R.D.; SANTOS, J.V.A.; PESSOA, C.Ó.; AMORA, D.N.; MARTINS, A.M.C.; BORELLI, P.; MONTEIRO, H.S.A.) foi aprovado, e será apresentado neste evento no período de 28 de novembro a 02 de dezembro do corrente ano.

Nos casos de tema livre, esta notificação deverá ser apresentada ao Coordenador da Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia ou ao seu substituto, na área de tema-livre, no dia e hora que serão disponibilizados em breve.

Fortaleza, 02 de outubro de 2006



Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi
Secretário SBTx

P/ Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Presidente da SBTx

SBTx

Sociedade Brasileira de Toxinologia



Anexo 17:



NOTIFICAÇÃO DE ACEITE DE RESUMO

A Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia comunica a RENE DUARTE MARTINS que o Resumo enviado, intitulado: "INDOMETACIN BLOCKAGE THE Bunodosoma caissarum VENOM EFFECTS ON KIDNEY RENAL PERFUSION" (MARTINS, R. D; ALVES, R. S; SILVA NETO, A.G.; DOMINGUES, I.A.; SOUSA, I.P.; TOYAMA, M. H.; MARTINS, A M.C.; BARBOSA, P.S.F.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H.S.A.) foi aprovado, e será apresentado neste evento no período de 28 de novembro a 02 de dezembro do corrente ano.

Nos casos de tema livre, esta notificação deverá ser apresentada ao Coordenador da Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia ou ao seu substituto, na área de tema-livre, no dia e hora que serão disponibilizados em breve.

Fortaleza, 28 de setembro de 2006



Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi
Secretário SBTx

P/ Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Presidente da SBTx

SBTx

Sociedade Brasileira de Toxinologia



Anexo 18:



NOTIFICAÇÃO DE ACEITE DE RESUMO

A Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia comunica a RENE DUARTE MARTINS que o Resumo enviado, intitulado: “DOSE-RESPONSE CURVE OF THE SEA ANEMONE *Bunodosoma caissarum* VENOM ON KIDNEY RENAL PERFUSION” (MARTINS, R. D; ALVES, R. S; SILVA NETO, A.G.; LOPEZ, D.C.S.; MENEZES, D.B.; SOUSA, I. P.; TOYAMA, M. H.; MARTINS, A M.C.; BARBOSA, P.S.F.1; FONTELES, M. C3.; MONTEIRO, H.S.A.) foi aprovado, e será apresentado neste evento no período de 28 de novembro a 02 de dezembro do corrente ano.

Nos casos de tema livre, esta notificação deverá ser apresentada ao Coordenador da Comissão de Tema-Livre do IX Congresso Brasileiro de Toxinologia ou ao seu substituto, na área de tema-livre, no dia e hora que serão disponibilizados em breve.

Fortaleza, 28 de setembro de 2006



Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi
Secretário SBTx

P/ Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Presidente da SBTx

SBTx

Sociedade Brasileira de Toxinologia



Anexo 19: ALVES, R.S.; COSTA E SILVA, I.M.S.; MARTINS, R.D.; BARROS, A.E.C.; SANTOS, F.M.; MENEZES, E.A.; SOUZA, D.F.; CAPELO, P.A.O.; MOURA FILHO, F.J.; MARTINS, A.M.C.; BORELLI, P.; MONTEIRO, H.S.A.; **SOUZA, I.P.** Alterações hematológicas causadas por diferentes tipos de serpentes do genero *Crotalus*. In: Federação de Sociedades de Biologia experimental no período de 23 a 26 de agosto de 2006 em Águas de Lindóia – SP.

FeSBE 2006 > Toxicologia > 43.016

ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS CAUSADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE SERPENTES DO GÊNERO CROTALUS. ¹Alves, R. S. ^{**}; ²Costa e Silva, I. M. S. ^{**}; ³Martins, R. D. ^{**}; ⁴Barros, A E C ; ⁵Santos, F M ; ⁶Menezes, E A ; ⁷Sousa, D F ^{*}; ⁸Capelo, P A O ^{*}; ⁹Moura Filho, F J ^{*}; ¹⁰Martins, A. M. C. ; ¹¹Borelli, Primavera; ¹²Monteiro, HSA ; ¹³Souza, I. P. ; ^{1, 2, 7, 8, 9, 12} Fisiologia e Farmacologia, UFC; ³Fisiologia e Farmacologia - DFF, UFC; ^{4, 5, 6, 13}Análises Clínicas e Toxicológicas, UFC; ¹⁰Análises Clínicas e Toxicológicas e Farmácia, UFC; ¹¹Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF - USP;

Objetivo:

Os acidentes ofídicos ocasionam envenenamento sistêmico, podendo causar alterações graves no organismo colocando em risco a estabilidade dos sistemas fisiológicos. Nosso trabalho teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas causadas pelo veneno de diferentes espécies de serpentes do gênero *Crotalus*.

Métodos e Resultados:

Foram analisados 30 camundongos Wistar, machos, pesando de 26 a 30 gramas provenientes do Biotério do Depto. de Fisiologia da UFC. Os animais foram inoculados com veneno pela via intra peritoneal: *Crotalus durissus cascavella* – Ceará (Cdc-Ce) - 120mg/Kg; *Crotalus durissus cascavella* – Maranhão (Cdc-Ma) - 50mg/Kg; *Crotalus durissus ruruima* (Cdr) - 20mg/Kg, após uma hora foi realizada a coleta de sangue. Os animais foram anestesiados com éter etílico e as amostras sanguíneas coletadas através de punção do plexo orbital em tubos contendo heparina na concentração de 50UI/mL e confeccionadas lâminas coradas posteriormente pelo May-Grunwald Giemsa. Os resultados foram avaliados pelo teste Wilcoxon com *p £ 0,05. Foram observados os seguintes resultados: Hemácias: Controle C: 7,5 x 10⁶ /mm³, Cdc-Ce: 7,12 x 10⁶ /mm³, Cdc-Ma: 7,73 x 10⁶ /mm³ e Cdr: 6,9 x 10⁶ /mm³, Hemoglobina: C: 12,8g/dL, Cdc-Ce: 11,9g/dL, Cdc-Ma: 12,8g/dL e Cdr: 13,17g/dL, Hematócrito: C: 47,2%, Cdc-Ce: 69,8%*, Cdc-Ma: 71,7%*, Cdr - 46,47%.

Conclusões:

O estudo do eritrograma apresentou elevação na determinação do hematócrito com os tratados com o veneno da *Crotalus durissus cascavella* do Ceará e do Maranhão quando comparados ao grupo Controle enquanto que o veneno da c.d. ruruima não apresentou alteração nos parâmetros estudados.

Apoio Financeiro: CNPq, FUNCAP

Anexo 20: MARTINS, R.D.; ALVES, R.S.; BARBOSA, P.S.F.; AMORA, D.N.; SOUZA, I.P.; SOUSA, D.F.; MOURA, M.V.C.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Alterações renais induzidas pelo veneno da serpente *Crotalus durissus ruruima*. In: Federação de Sociedades de Biologia experimental no período de 23 a 26 de agosto de 2006 em Águas de Lindóia – SP.

FeSBE 2006 > Toxicologia > 43.019

ALTERAÇÕES RENAIS INDUZIDAS PELO VENENO DA SERPENTE CROTALUS DURISSUS RURUIMA. ¹Martins, R. D. **, ²Alves, R. S. **, ³Barbosa, PSF ; ⁴Amora, D. N. **, ⁵Souza, I. P. ; ⁶Sousa, D F *; ⁷Moura, MVC *; ⁸Toyama, M.H. ; ⁹Fontelles, MC ; ¹⁰Martins, A. M. C. ; ¹¹Monteiro, HSA ; ¹ Fisiologia e Farmacologia - DFF, UFC; ^{2, 3, 4, 6, 7, 9, 11}Fisiologia e Farmacologia, UFC; ⁵Análises Clínicas e Toxicológicas, UFC; ⁸Biologia, UNESP - Campus Litoral Paulista - São Vicente; ¹⁰Análises Clínicas e Toxicológicas e Farmácia, UFC;

Objetivo:

Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus* representam uma importante causa de morbimortalidade em países tropicais como o Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos renais causados pelo veneno da *Crotalus durissus ruruima* (Cdr) em rim isolado de rato.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos wistar pesando entre 250-300g (n=6) e a perfusão de rim isolado de rato seguiu técnica descrita por Fonteles, M.C. et al, (Am. J. Physiol., 244, p.235, 1983). Os resultados do grupo controle (C), onde os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Hanseleit modificada com 6g% de albumina, foram comparados ao grupo tratado com Cdr (10µg/mL) adicionada 30 min após o início do experimento com duração de 120 min. Os resultados foram analisados por teste t de Student com *p<0,05. O grupo em que os rins foram tratados com o veneno de Cdr apresentou uma diminuição do ritmo de filtração glomerular em 120min (C120=0,5837±0,08; Cdr120=0,307±0,063 mL.g-1.min-1*); diminuição dos transportes total (C120=80,69±1,5; Cdr120=68,25±3,76*) e proximal (C120=76,51±1,47; Cdr120=6,32±3,68 *) de sódio e diminuição dos transportes total (C120=77,42±1,71; Cdr120=66,17±2,6*) e proximal (C120=73,23±1,72; Cdr120=64,24±2,6 *) de cloreto aos 120 min.

Conclusões:

O veneno total da serpente *Crotalus durissus ruruima* apresentou alterações discretas na hemodinâmica renal, caracterizadas por diminuição do ritmo de filtração glomerular e diminuição dos transportes de sódio e cloreto.

Apoio Financeiro: CNPq,CAPES

Anexo 21: FERREIRA, D.P.P. (IC-CNPq); CAPELO, P.A.O. (PIBIC-CNPq); MONTEIRO, H.S.A.; SOUZA, I.P. (Co-orientadora). Estudo das alterações hematológicas causadas pelos venenos da *Bothrops insularis* e *Crotalus durissus cascavella*. In: XXIV Encontro Universitário de Iniciação Científica à Pesquisa, 2005, Fortaleza - Ce.

XXIV ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA

FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE RESUMOS

RESUMO

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS CAUSADAS PELOS VENENOS DA *BOTHROPS INSULARIS* E *CROTALUS DURISSUS CASCAVELLA*

Daniel de Paula Pessoa Ferreira (IC-CNPq, Medicina-UFC); Pedro Augusto O. Capela (PIBIC-CNPq, Medicina-UFC) (coautor); Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora) Departamento de Fisiologia e Farmacologia UFC; Profa. Iechi P. Souza, Departamento Análises Clínicas – UFC e Profa. Alice Maria C. Martins, Departamento de Farmácia – UFC (Coorientadoras).
Palavras-Chave: *Bothrops*, *Crotalus*, hematologia.

Objetivo: Os acidentes ofídicos representam um sério problema de Saúde Pública nos países tropicais, tanto pela frequência com que ocorrem como pela morbimortalidade que ocasionam. Nosso Trabalho teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas causados pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* (Cdc) e *Bothrops insularis* (Bi). **Métodos e Resultados:** Foram analisados 37 camundongos Wistar, machos, pesando 25 a 32 gramas provenientes do Biotério do Depto de Fisiologia da UFC. Os animais foram anestesiados com éter etílico e as amostras sanguíneas coletadas através de punção do lago axilar em tubos de ensaio contendo heparina na concentração de 50 UI/mL e confeccionadas lâminas coradas posteriormente pelo May-Grünwald Giemsa. Após a coleta foi acrescentado 30µg de veneno sendo os exames realizados após 1 hora. Os resultados foram avaliados pelo teste Wilcoxon com *p ≤ 0,05. Foram observados os seguintes resultados: **Hemácias:** Controle(C): $7,5 \times 10^6/\text{mm}^3$, Cdc: $4,6 \times 10^6/\text{mm}^3$ * e Bi: $4,9 \times 10^6/\text{mm}^3$ *; **Hemoglobina:** C: 12,8g/dL, Cdc: 8,6g/dL* e Bi: 8,8 g/dL*; **Hematócrito:** C: 47,2, Cdc: 33,3%* e Bi: 37,8%*. **Conclusões:** Os venenos da Cdc e da Bi, apesar de pertencerem a gêneros diferentes, ocasionaram alteração significativa no eritograma, quando comparados ao grupo controle, com acentuada anemia e hemácias apresentando um grau elevado de policromasia. Alterações estas que provavelmente foram causadas por hemólise induzida pelo veneno.

Apoio Financeiro: CNPq e FUNCAP

Anexo 22: ARAGÃO, F.O.F. (UFC); MARTINS, A.R.; SOUZA, I.P. (Co-orientadora); MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Estudo das alterações funcionais causadas pelos venenos da *Crotalus durissus cascavella* e *Bothrops insularis*. In: XXIV Encontro Universitário de Iniciação Científica à Pesquisa, 2005, Fortaleza - Ce.

XXIV ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA
FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE RESUMOS

RESUMO

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS CAUSADAS PELOS VENENOS DA *CROTALUS DURISSUS CASCABELLA* E *BOTHRUPS INSULARIS*.

Palavras-chave: *Periplaneta americana* (Medicina - UFC), Juliana Roque Martins, Prof. Ieda Patrícia de Souza, (Co-Orientadora), Departamento de Análises Clínicas - UFC, Prof. Alice Maria Costa Martins (Co-orientadora), Departamento de Farmácia - UFC, Prof. Helena Sara Azul Monteiro (Orientadora), Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC, Palavras-chaves: *Bothrops*, *Crotalus*, veneno.

Agradecemos ao apoio financeiro do CNPq e da FUNCAP.

Este trabalho teve como objetivo fazer um estudo funcional, ou seja, espalhamento (Esp), fagocitose (Fag) e atividade fungicida (AF), com *C. albicans*, causados pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* (Cdc) e *Bothrops insularis* (Bi). Foram analisados 37 camundongos Wistar, machos, pesando 25-32g, e provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia - UFC. Os macrófagos foram obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal com 3mL de solução salina, e, após a coleta, foram acrescentados 30µg de veneno, sendo realizado, após 1 hora, o exame de suspensão de macrófagos ajustada para 4×10^5 cel./mL com solução tampão PBS Dubelcco. Os resultados foram avaliados pelo teste Wilcoxon com $p \leq 0,05$. Não houve alteração do número de células mononucleares ao compararmos ao grupo controle (C) tratado com solução salina: (C = $0,46 \times 10^5$ cel./mL; Cdc = $0,47 \times 10^5$ cel./mL; Bi = $0,63 \times 10^5$ cel./mL). Foram observados os seguintes resultados: Esp: (C=39,5%; Cdc=32,9%* e Bi=34,9%); Fag: (30': C=39,2%; Cdc=39,6%; Bi=39,2%); (60': C=39,1%; Cdc=38,4%; Bi=39,0%); (90': C=30,2%; Cdc=39,2%; Bi=30,2%); (120': C=30,3%; Cdc=39,2%; Bi=30,5%); AF: (30': C=34,7%; Cdc=36,6%; Bi=39,2%*); (60': C=35,2%; Cdc=36,0%; Bi=37,8%); (90': C=34,7%; Cdc=36,9%; Bi=37,9%); (120': C=4,5%; Cdc=35,5%; Bi=38,9%). Conclui-se que, comparando o grupo controle e os tratados, houve inibição do espalhamento apenas em relação ao Cdc (17,4%). Na atividade fungicida, houve alteração apenas no tempo de 30 minutos no grupo que recebeu veneno *in vitro* da Bi. Quanto à atividade fagocítica com *C. albicans*, não houve alteração nos diferentes grupos.

Anexo 23: ALVES, R.S.; MARTINS, R.D.; BARBOSA, P.S.F.; SOUSA, D.F.; FERREIRA, J.M.; SOUZA, I.P.; QUEIROZ, M.G.R.; BASTOS, L.Z.C.; AMORA, D.N.; TOYAMA, M.H.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Estudo in vivo das alterações renais e hepáticas induzidas pelo veneno de *Titus Serrulatus*. In: Federação de Sociedades de Biologia experimental no período de 24 a 27 de agosto de 2005 em Águas de Lindóia – SP.

ESTUDO IN VIVO DAS ALTERAÇÕES RENAIIS E HEPÁTICAS INDUZIDAS PELO VENENO DE *TITYUS SERRULATUS* ¹Alves, RS ¹; ¹Martins, RD ; ¹Barbosa, P. S. F. ²; ²Souza, D.F. ²; ²Ferreira, J.M. ; ²Souza, IP ²; ²Queiroz, M. G. R.; ²Bastos, LZC ; ¹Amora, D. N. ; ³Toyama, M. H. ; ²Martins, A. M. C. ; ¹Monteiro, H. S. A. ; ¹Fisiologia e Farmacologia, UFC; ²Análises Clínicas e Toxicológicas, UFC; ³Bioquímica e Farmacologia, UNICAMP

Objetivo: Os escorpiões de importância médica no Brasil pertencem ao gênero *Tityus*, destacando-se o *Tityus serrulatus*, conhecido como escorpião amarelo. Avaliar as alterações séricas de parâmetros funcionais renais e hepáticos em camundongos induzidas pelo veneno de *Tityus serrulatus*.

Métodos e Resultados: Camundongos swiss, pesando entre 35-45g foram injetados com 1mg/kg do veneno de *Tityus serrulatus*, via intraperitoneal (i.p.) - Grupo *Tityus* (n=10) ou Grupo Controle (salina, n=10). Foram realizadas três coletas para avaliação dos parâmetros de função renal (uréia - UR, creatinina -CR), hepática (albumina -Alb e as transaminases, ALT e AST) e eletrólitos (potássio - K⁺, sódio - Na⁺), sendo uma coleta antes da administração do veneno e duas coletas em 24h e 96h após a injeção i.p. de veneno ou salina. A análise estatística ocorreu através dos testes ANOVA, t de Student e Kruskal-Wallis, com os resultados expressos em média ± erro padrão. Os resultados não revelaram alterações nos parâmetros de função renal, sódio e albumina em 24h e 96h quando comparados com o controle (p>0,05), ocorrendo hipocalemia em 24h

(controle K⁺_{24h}=3,73±0,06mEq/L vs. *Tityus* K⁺_{24h}= 2,93±0,13mEq/L⁺; *p<0,05). Alterações da função hepática foram observadas no tempo de 24 horas, com elevação de AST (0hAST= 134,3,±6,31U/L vs. 24hAST= 171,2±7,24U/L* vs. 96hAST= 128±12,57U/L*; p*<0,05) e ALT (0hALT= 74,74±5,32U/L vs. 24hALT= 153,1±15,17U/L* vs. 96h ALT= 82,51± 8,94 U/L⁺; p*<0,05).

Conclusões: O modelo estudado permitiu observar o impacto da dose de 1mg/Kg do veneno de *Tityus serrulatus* na elevação das aminotransferases AST e ALT e redução dos níveis séricos de potássio.

Anexo 24: SOUZA, I.P.; BARROS, A.E.C.; SANTOS, F.M.; MENEZES, E.A.; MARTINS, R.D.; COSTA E SILVA, I.M.S.; PESSOA, C.ºO; BORELLI, P.; MONTEIRO, H.S.A. Estudo das alterações hematológicas causadas pelos venenos da *Crotalus durissus cascavella* e *Bothrops insularis*. In: Federação de Sociedades de Biologia experimental no período de 24 a 27 de agosto de 2005 em Águas de Lindóia – SP.

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS CAUSADAS PELOS VENENOS DA *CROTALUS DURISSUS CASCABELLA* E *BOTHROPS INSULARES* ¹ Souza, IP ; ² Barros, A.E.C.B. ; ² Santos, F.M. ; ² Menezes, E.A. ; ¹ Martins, RD ; ¹ Costa e Silva, I.M.S. ; ¹ Pessoa, C.º. ; ² Martins, A. M. C. ; ³ Borelli, P. ; ¹ Monteiro, H. S. A. ; ¹ Fisiologia e Farmacologia, UFC; ² Análises Clínicas e Toxicológicas, UFC; ³ Análises Clínicas e Toxicológicas, USP

Objetivo:

Os acidentes ofídicos ocasionam envenenamento sistêmico, podendo causar alterações graves no organismo colocando em risco a estabilidade dos sistemas fisiológicos. Nosso Trabalho teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas causados pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* (Cdc) e *Bothrops insularis* (Bi).

Métodos e Resultados:

Foram analisados 37 camundongos Wistar, machos, pesando 25 a 32 gramas provenientes do Biotério do Depto de Fisiologia da UFC. Os animais foram anestesiados com éter etílico e as amostras sanguíneas coletadas através de punção do lago axilar em tubos de ensaio contendo heparina na concentração de 50 UI/mL e confeccionadas lâminas coradas posteriormente pelo May-Grunwald Giemsa. Após a coleta foi acrescentado 30µg de veneno sendo os exames realizados após 1 hora. Os resultados foram avaliados pelo teste Wilcoxon com *p ≤ 0,05. Foram observados os seguintes resultados: **Hemácias:** Controle(C): 7,5x10⁶/mm³, Cdc: 4,6x10⁶/mm³* e Bi: 4,9x10⁶/mm³*; **Hemoglobina:** C: 12,8g/dL, Cdc: 8,6g/dL* e Bi: 8,8 g/dL*; **Hematócrito:** C: 47,2, Cdc: 33,3%* e Bi: 37,8%*.

Conclusões:

Os venenos da Cdc e da Bi apesar de pertencerem a gêneros diferentes, apresentaram alteração significativa no eritrograma, quando comparados ao grupo controle, com presença acentuada de anemia com hemácias apresentando um grau elevado de policromasia. Estas alterações provavelmente foram causadas por hemólise induzida pelo veneno.

Anexo 25: SOUZA, I.P.; BARROS, A.E.C.; SANTOS, F.M.; MARTINS, R.D.; MENEZES, E.A.; COSTA E SILVA, I.M.S.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; MARTINS, A.M.C.; BORELLI, P.; MONTEIRO, H.S.A. Estudo das alterações funcionais causadas pelos venenos da *Crotalus durissus cascavella* e *Bothrops insularis*. In: Federação de Sociedades de Biologia experimental no período de 24 a 27 de agosto de 2005 em Águas de Lindóia – SP.

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS CAUSADAS PELOS VENENOS DA *CROTALUS DURISSUS CASCAVELLA* E *BOTHROPS INSULARES* ¹ Souza, IP ; ² Barros, A.E.C.B. ; ² Santos, F.M. ; ¹ Martins, RD ; ² Menezes, E.A. ; ¹ Costa e Silva, I.M.S. ; ³ Evangelista, J. S. A. M. ; ² Martins, A. M. C. ; ⁴ Borelli, P. ; ¹ Monteiro, H. S. A. ; ¹ Fisiologia e Farmacologia, UFC; ² Análises Clínicas e Toxicológicas, UFC; ³ Veterinária, UEC; ⁴ Análises Clínicas e Toxicológicas, USP

Objetivo:

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de Saúde Pública nos países tropicais, tanto pela frequência com que ocorrem como pela morbi-mortalidade que ocasionam. Nosso trabalho teve como objetivo fazer um estudo funcional, ou seja, o espreiamento (Esp), fagocitose (Fag) e a atividade fungicida (AF) com *C. albicans*, causados pelo veneno da *Crotalus durissus cascavella* (Cdc) e *Bothrops insularis* (Bi).

Métodos e Resultados: Foram analisados 37 camundongos Wistar, machos, pesando de 25 a 32g provenientes do Biotério do Depto Fisiologia da UFC. Os macrófagos foram obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal com 3mL de solução salina, após a coleta foi acrescentado 30µg de veneno sendo os exames realizados após 1 hora, a suspensão de macrófagos ajustada para 4X10³cel./mL com solução tampão PBS Dubelcco. Os resultados foram avaliados pelo teste Wilcoxon com p ≤ 0,05*. Observamos que não houve alteração do número de células mononucleares ao compararmos ao grupo controle (C) tratado com salina: (C=0,46X10³cel./mL; Cdc=0,47X10³ cel./mL e Bi=0,63X10³cel./mL). Foram observados os seguintes resultados: Esp: (C=39,8%; Cdc=32,9%* e Bi=38,9%); Fag: (30': C=39,2%; Cdc=39,6%; Bi=39,2%); (60': C=39,0%; Cdc=38,4%; Bi=39,0%); (90': C=30,2%; Cdc=39,2%; Bi=30,2%); (120': C=30,5%; Cdc=39,2%; Bi=30,5%) e AF: (30': C=34,7%; Cdc=36,8%; Bi=39,2%*); (60': C=35,2%; Cdc=36,0%; Bi=37,0%); (90': C=34,7%; Cdc=36,9%; Bi=37,9%); 120': C=4,5%; Cdc=35,5%; Bi=38,9%.

Conclusões:

Ao compararmos o grupo controle e os tratados houve inibição do espreiamento apenas com relação ao Cdc (17,4%). Na atividade fungicida houve alteração apenas no tempo de 30 minutos no grupo que recebeu veneno *in vitro* da Bi. Quanto à atividade fagocítica com *C. albicans*, não houve alteração nos diferentes grupos.

Anexo 26: MARTINS, R.D.; ALVES, R.S.; FERREIRA, J.M.; QUEIROZ, M.G.R.; SOUZA, I.P.; EVANGELISTA, J.S.M.; CALOU, I.B.F.; BASTOS, L.Z.C.; TOYAMA, M.H.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A. Hematological alterations induced experimentally in rats by the venom *Crotalus durissus ruruima*. In: VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia / VIII Symposium of the Pan American Section of the International Society on Toxinology. Rio de Janeiro. No periodo de 19 a 23 de setembro de 2004 em Angra dos reis – Rio de Janeiro.

Hematological Alterations Induced Experimentally in Rats by the Venom of *Crotalus durissus ruruima*.

Martins, R.D.¹; Alves, R.S.¹; Ferreira, J.M.²; Queiroz, M.G.R.²; Sousa, I. P.²; Evangelista, J.S.M.¹; Calou, I.B.F.²; Bastos, L.Z.C.²; Toyama, M.H.³; Martins, A.M.C.²; Monteiro, H.S.A.¹.

1. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 2. Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 3. Laboratório de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP-SP

The aim of this work was to characterize in rats the hematologic responses induced by the administration (i.p.) of *Crotalus durissus ruruima* venom. Male wistar rats, weighting between 250-300g, were injected with an i.p. single dose of 0,05mg/Kg of *C.d.ruruima* venom (n=7) or saline 0,9% (control group, n=7) and after 2, 48, 96h they were lightly anaesthetized with diethyl ether and the blood was collected by orbital puncture. Hematological analyses were done by CC-550 equipment. The results were analyzed by Student t Test, ANOVA and Kruskal-Wallis. Hematocrit results were compared with control group at 2h (control Hto = 53,06±0,9%; *C.d. ruruima* Hto = 51,07±0,79%), 48h (control Hto = 39,63±0,89%*; *C.d. ruruima* Hto = 46,07±1,94%, with *p<0,05) and 96h (control Hto = 45,39±1,18%; *C.d. ruruima* Hto = 39,79±1,59%*, with *p<0,05), occurring significant decrease at 48h in the control group and 96h in the group of the *c.d. ruruima* venom. Erythrocytes count and hemoglobin levels weren't significantly different (p≥0,05) between the groups. These results suggest that *C.d.ruruima* venom induce only a discreet change in the hematological profile, like a late decrease of the hematocrit.

Support: CNPq