



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

INEZ LIBERATO EVANGELISTA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES CARDIORENAL E
NEURAL DE *Bothrops marajoensis* E SUAS FRAÇÕES**

Fortaleza

2009

INEZ LIBERATO EVANGELISTA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES CARDIORENAL E
NEURAL DE *Bothrops marajoensis* E SUAS FRAÇÕES**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Fortaleza

2009

INEZ LIBERATO EVANGELISTA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES CARDIORENAL E
NEURAL DE *Bothrops marajoensis* E SUAS FRAÇÕES**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 17 de Abril de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará -UECE

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

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Profa. Dra. Maria Alice Costa Martins

Ao MATEUS, meu anjinho enviado de Deus.

Tudo que tenho de bom recebi de Deus.

Coríntios 1:4

Ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por mais uma vitória concedida.

À **Profa. Dra. Helena Serra Azul**, pelo exemplo de orientação tranqüila, sempre segura e prudente.

Ao colega Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento, pela paciência, pelo convívio, e imenso enriquecimento com seus ensinamentos.

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre por ter aceitado prontamente o convite para participação da banca.

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão por mais uma vez contribuir com enriquecimento do trabalho desenvolvido.

Prof. Dra. Maria Alice Costa Martins pela atenção, paciência e exemplo profissional.

A prima **Janaina** Serra Azul Evangelista por sua alegria e espontaneidade contagiante. Por todas as ajudas e convivência durante este doutorado.

Profa. Dra. **Claudia** Santos pela tranqüilidade e ajuda desenvolvida nos experimentos realizados na Universidade Estadual do Ceará.

Ao Prof. **Dr. Marcus Hikari Toyama**, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho ((UNESP) por gentilmente ter cedido o veneno e suas frações para realização deste trabalho.

Aos **bolsistas e alunos** de iniciação científica da Universidade estadual do Ceará e Universidade Federal do Ceará.

A todos **meus familiares e amigos** que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μM	Micromolar
μL	Microlitro
Ach	Acetilcolina
Atrop	Atropina
ATP	Adenosina Trifosfato
Bmj	<i>Bothrops marajoensis</i>
bpm	Batimentos por minuto
Cch	Carbacol
C90	Controle aos 90 min
C30	Controle aos 30 min
e.v	Endovenosa
G	Gramas
i.p	Intraperitoneal
e.v	Endovenosa
ECG	Eletrocardiograma
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mmHg	Milímetros de mercúrio
mM	Milimolar
MS	Milisegundos
N	Normal
nM	Nanomolar
°C	Graus Celsius
PAF	Fator de agregação plaquetária
PLA₂	Fosfolipase A₂
PP	Pressão de perfusão
RPM	Revoluções por minuto
S.c	Subcutâneo
TXA₂	Tromboxano A₂
UI	Unidade internacional

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

- Figura 1:** Diferenças entre as caudas dos animais da família *Viperidae* 24
- Figura 2:** Evolução do aparelho venenoso em serpentes. 25
- Figura 3:** Imagem da espécie *Bothrops marajoensis* em seu habitat natural. 31
- Figura 4:** Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente envolvida. Ceará, Brasil, 2001 a 2007. 32
- Figura 5:** Figura esquemática sistema perfusão cardíaca em ratos. 50
- Figura 6:** Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico. 52
- Figura 7:** Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado com recirculação. 54
- Figura 8:** Pressão arterial média em ratos com veneno bruto de *Bothrops marajoensis* 60
- Figura 9:** Frequência cardíaca em ratos com veneno de *B. marajoensis*. 60
- Figura 10:** Avaliação da frequência respiratória em ratos com veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. 61
- Figura 11:** Variação da pressão arterial média em ratos atropinizados, 1µg/kg de atropina após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (BMJ) utilizado na dose 100µ g/mL 61
- Figura 12:** Avaliação da frequência cardíaca em ratos atropinizados, 1µg/kg de atropina após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* utilizado na dose 100µ g/mL. 62

Figura 13: Avaliação da frequência respiratória em ratos atropinizados, 1µg/kg de atropina após administração do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> utilizado na dose 100µ g/mL.	62
Figura 14: Avaliação da pressão arterial média em ratos após administração da fosfolipase tipo1 do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	63
Figura 15: Avaliação da frequência cardíaca em ratos após administração da fosfolipase tipo1 do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	63
Figura 16: Avaliação frequência respiratória em ratos após administração da fosfolipase tipo1 do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	64
Figura 17: Avaliação pressão arterial média em ratos após administração da fosfolipase tipo2 do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	64
Figura 18: Avaliação frequência cardíaca em ratos após administração da fosfolipase tipo2 do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	65
Figura 19: Avaliação frequência respiratória em ratos após administração da fosfolipase tipo2 do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	65
Figura 20: Avaliação da pressão arterial média em ratos após administração da lectina do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	66
Figura 21: Avaliação da frequência cardíaca em ratos após administração da lectina do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	66
Figura 22: Avaliação da frequência respiratória em ratos após administração da lectina extraída do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	67
Figura 23: Força de contração miocárdio, após administração do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> Bmj, na perfusão de coração isolado de ratos	68

Figura 24: Pressão de perfusão após administração do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> , na perfusão de coração isolado de ratos	68
Figura 25: Fluxo de perfusão coronariano após administração do veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> na perfusão de coração isolado de ratos	69
Figura 26: Amplitude contração. Registro perfusão átrio isolado, antes (controle) e depois da administração de Bmj.	69
Figura 27: Figura 27 a: Registro do eletrocardiograma em ratos antes da administração das drogas. (controle).	70
Figura 27b: Registro do eletrocardiograma em ratos após a administração Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> dose 100µg/kg.	71
Figura 28: Efeito do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> em leito vascular mesentérico pré- contraído com fenilefrina-	72
Figura 29: Efeito do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> dose 300µg/mL em leito vascular mesentérico pré –contraído com fenilefrina.	73
Figura 30: Pressão de perfusão em rim isolado de ratos. Efeito do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	74
Figura 31: Resistência vascular renal em rim isolado de ratos. Efeito do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	75
Figura 32: Fluxo urinário em rim isolado de ratos. Efeito do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> .	75
Figura 33: Ritmo de filtração glomerular. Efeito do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> nas doses 100µg/kg	76
Figura 34: Decréscimo percentual transporte total de sódio em rim isolado de ratos	76
Figura 35: Decréscimo percentual transporte total de cloreto.	77
Figura 36: Percentual transporte total de potássio em rim isolado de ratos.	77

Figura 37: Efeito da fosfolipase tipo 1 do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> canal deferente.	78
Figura 38: Efeito da fosfolipase tipo 1 do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> no canal deferente	78
Figura 39: Efeito da fosfolipase tipo 1 do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> no canal deferente	79
Figura 40: Transporte de sódio. Efeito da fosfolipase tipo 1 do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> na perfusão renal de ratos	79
Figura 41: Transporte de cloretos. Efeito da fosfolipase tipo 1 do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> na perfusão renal de ratos.	80
Figura 42: Transporte de potássio. Efeito da fosfolipase tipo 1 do Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> na perfusão renal de ratos	80
Figura 43: Força de contração. Efeito do veneno bruto de Bmj doses em nervo frênico de rato estimulado por campo elétrico.	81
Figura 44: Força de contração. Efeito do veneno bruto de Bmj doses crescente em canal Deferente de camundongos estimulado por campo	82
Figura 45: Força de contração com ioimbina. Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> (Bmj)	83
Figura 46: Efeito naloxone Veneno bruto de <i>Bothrops marajoensis</i> nas doses 100µg/kg em leito vascular mesentérico de camundongos	83
Figura 47: Inibição da contração neurogênica estimulada por campo elétrico (ECE) pelo BMJ comparado com nenhuma queda significativa pela contração com NA, ATP ou Cch (em Krebs normal ou enriquecido com guanetidina, fentolamina).	84
Figura 48: Efeito da fosfolipase tipo 1 do veneno bruto de BMJ doses crescente em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico	85

Figura 49: Efeito da fosfolipase tipo 2 do veneno bruto de BMJ em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico.	85
Figura 50: Efeito PLA ₂ tipo 1 e tipo 2 do veneno bruto de BMJ em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico.	86
Figura 51: Efeito da lectina do veneno BMJ em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico.	86

TABELAS

Tabela 1: Classificação das serpentes viventes (adaptado de MCDOWELL, 1987). **22**

Tabela 2: Dados brutos das ondas, complexos, intervalos de segmentos do eletrocardiograma após a injeção endovenosa com o veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 100 μ /kg. **69**

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES CARDIORENAL E NEURAL DE *Bothrops marajoensis* E SUAS FRAÇÕES

Avaliou-se a atividade de *Bothrops marajoensis* (Bmj) e suas frações no sistema cardiorrenal. A resposta pressora do veneno bruto demonstrou uma diminuição da pressão arterial média e da frequência cardíaca, sem alterações significativas na frequência respiratória. Em ratos atropinizados demonstrou a permanência dos efeitos. Na perfusão de coração isolado de ratos observou-se uma diminuição na força de contração miocárdica acompanhada de um aumento da pressão de perfusão, sem alterações no fluxo coronariano. A análise eletrocardiográfica em ratos após injeção de Bmj provocou um bloqueio átrio ventricular gradual até um bloqueio completo indicando arritmia e dificuldade de condução atrial. Em leito vascular mesentérico pré-contraído com fenilefrina não houve alterações significativas. No sistema de perfusão renal em ratos apresentou decréscimo significativo na pressão de perfusão, resistência vascular, fluxo urinário, ritmo de filtração e transportes de sódio e de cloreto. Fosfolipase miotóxica (tipo 1) demonstrou alterações somente no transporte de íons. A atividade de Bmj em doses crescentes em nervo Frênico Diafragma de rato mostrou um bloqueio na força de contração dose dependente, com efeito significante nas maiores doses. Em canal deferente de camundongos induziu a uma inibição dose dependente da contração estimulada por campo elétrico. Este feito não foi revertido pela Ioimbina nem por naloxone. Em outro estudo a adição do veneno bruto de Bmj inibiu a contração neurogênica, quando comparado com nenhuma queda significante pela contração com Cch, NA ou ATP (em Krebs normal ou enriquecido com guanetidina e fentolamina. A ausência de efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* sobre a contração induzida pelos principais agonistas purinérgicos demonstra provável atividade a nível pré-sináptico. Frações de fosfolipases miotóxicas (tipo 1 e tipo 2) demonstraram uma inibição da contração dose dependente.

Palavras Chave: *Bothrops marajoensis*, sistema cardiorrenal, sistema de perfusão renal, nervo Frênico Diafragma, canal deferente.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF TOTAL VENOM AND ITS FRACTION FROM THE *Bothrops marajoensis* IN CARDIORENAL AND NEURAL ACTIVITIES

In this article we evaluated the activity of *Bothrops marajoensis* (Bmj) and its fractions in the cardio-renal system. The results of the total venom in blood pressure experiments showed a decrease in the mean arterial pressure and heart rate without significant changes in respiratory rate. The same experiments performed in rats atropinized showed the permanence of falling blood pressure and heart rate. After administration of Bmj used in infusion of isolated rats heart of there was a decrease in myocardial force of contraction accompanied by an increase in perfusion pressure, without changes in coronary flow. The electrocardiographic analysis after injection of Bmj in rats causes a progressive atrioventricular block until a complete blockage and difficulty in atrial conduction. The assessment in the mesenteric vascular bed Bmj did not produce significant changes. The system renal perfusion in rats caused significant decrease in perfusion pressure, renal vascular resistance, urinary flow, filtration rate, transport of sodium and chloride. The phospholipase (PLA2) type 1 showed only an alteration in the transport of electrolytes. The Bmj fractions neurotoxicity in rat phrenic nerve diaphragm increasing showed a blockage dose-dependent in the strength of contraction. In mice vas deferens we observed an induced of a dose-dependent inhibition of contraction stimulated by electric field. This fact was not reversed by yohimbine or by naloxone. In another study the addition of the total venom of Bmj inhibited the neurogenic contraction, compared with no significant decrease in contraction by Cch, NA or ATP (in normal Krebs solution or with enriched with guanethidine and phentolamine). The fractions, PLA2 (type 1 and type 2) showed a dose-dependent inhibition of contraction.

Key Words: *Bothrops marajoensis*, cardio-renal system, phrenic nerve diaphragm, renal perfusion, vas deferens.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E /OU SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Origem e diversidade das serpentes	21
1.2 O veneno das serpentes	24
1.3 <i>Bothrops marajoensis</i>	27
1.4 Características gerais e epidemiológicas dos acidentes Botrópicos	28
1.5 Componentes do veneno do gênero <i>Bothrops</i>	31
1.5.1 As fosfolipases A₂ dos venenos de <i>Bothrops</i>	32
1.5.2 As lectinas dos venenos de <i>Bothrops</i>	34
1.7 O veneno do gênero <i>Bothrops</i> e suas atividades nos sistemas fisiológicos	35
1.7.3 Toxicidade cardiovascular associada ao veneno de <i>Bothrops</i>	35
1.7.4 Nefrotoxicidade associada ao veneno de <i>Bothrops</i>	37
1.7.5 Neurotoxicidade associada ao veneno de <i>Bothrops</i>	38
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivos gerais	44
3.2 Objetivos específicos	44

4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Animais experimentais	46
4.2 Procedimentos com veneno de <i>Bothrops marajoensis</i>	46
4.3 Avaliação da toxicidade cardiovascular	46
4.3.1 Pressão arterial	46
4.3.2 Coração isolado de ratos	47
4.3.3 Átrio isolado	58
4.3.4 Avaliação eletrocardiográfica	59
4.3.5 Perfusão em leito vascular mesentérico	59
4.4 Nefrotoxicidade	50
4.4.1 Perfusão renal	50
4.4.1.1 Avaliação bioquímica dos perfusatos e urinas	52
4.4.1.2 cálculo dos parâmetros funcionais	52
4.5 Avaliação da neurotoxicidade	53
4.5.1 Nervo frênico de diafragma de ratos	53
4.5.2 Canal deferente de camundongos	54
4.6 análises estatísticas	54
4.7 Aspectos éticos	55
5. RESULTADOS	56
5.1 Avaliação da toxicidade cardiovascular	57
5.1.1 Pressão arterial de ratos	57
5.1.2 Coração isolado de ratos	65
5.1.3 Átrio isolado	67

5.1.4 Avaliação eletrocardiografia	68
5.1.5 Perfusão em leito vascular mesentérico	70
5.2 Nefrotoxicidade	71
5.2.1 Perfusão renal	71
5.3 Avaliação da neurotoxicidade	79
5.3.1 Nervo frênico diafragma de ratos	79
5.3.2 Canal deferente de camundongos	79
6. DISCUSSÃO	86
6.1 Avaliação da toxicidade cardiovascular	87
6.2 Avaliação da nefrotoxicidade	90
6.3 Avaliação da neurotoxicidade	92
6.3.1 Frênico de diafragma de ratos	92
6.3.2 Canal Deferente de camundongos	94
7. CONCLUSÃO	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Origem e diversidade das serpentes

As serpentes, ou ofídios, compõem a subordem *Serpentes*, que, atualmente com cerca de 3.000 espécies formam a ordem *Squamata*, o mais numeroso grupo dos répteis vivos. Estão incluídos na classe *Reptilia*, subclasse *Lepdosauria*, com cerca de 410 espécies venenosas. Devido a estudos revisivos, descrições de novas espécies e invalidação de outras, os números apresentam uma variação constante, reflexo da complexidade de formas e ausência de conhecimento profundo das relações filogenéticas nestes animais (BARRAVIERA, 1993; MELGAREJO, 2003).

Apesar da escassez de registros fósseis, a origem desse grupo provavelmente remonta ao período Cretáceo (há cerca de 135 milhões de anos). Um poucas vértebras danificadas são, possivelmente, o fóssil de serpente mais antigo, datado de cerca de 100 milhões de anos. Considerando-se que os primeiros répteis surgiram há 315 milhões de anos, a origem das serpentes é então relativamente recente (RAGE, 1987; RAGE; WERNER, 1999).

Bastante consensual é o fato de que as serpentes surgiram de algum grupo de lagartos de vida subterrânea que, por adaptação, tiveram corpo extremamente alongado, redução das patas e olhos semi-atrofiados (MELGAREJO, 2003).

As serpentes são encontradas em quase todo mundo, mas habitam principalmente as regiões temperadas e tropicais, em especial pela sua dependência do calor externo para efetuar sua termorregulação por mecanismos comportamentais. Apesar de sofrerem interferências morfológicas adaptativas, conservaram um padrão bastante homogêneo. O corpo extremamente alongado, sem apêndices locomotores e cintura escapular; perda da sínfise mandibular (perda da sutura óssea das hemimandíbula, substituída por um ligamento constituído por tecido rico em elastina) e perda de pálpebras móveis. Os órgãos internos são como dos demais vertebrados, porém com formato alongado e ausência de bexiga. Alimentam-se de presas inteiras, que caçam usando estruturas quimiossensíveis. São exclusivamente carnívoras caçando tanto vertebrados como invertebrados (FERRAREZZI 1994; WONG *et al.*, 2009).

Sempre houve controvérsias para se estabelecer uma classificação apropriada para serpentes. Nas últimas décadas surgiram várias propostas (ASSAKURA *et al.*, 1992; DUARTE *et al.*, 2000). Conforme McDowell, 1987 podemos citar as serpentes viventes em 2 infraordens, 6 superfamílias e 19 famílias (quadro 1). A infraordem Scolecophidia inclui as cobras cegas e Alethinophidia as demais serpentes. (RAGE; WERNER, 1999; MELGAREJO, 2003).

Quadro 1 - Classificação das serpentes Viventes

Infraordem	Superfamília	Familia
<i>Scolecophidia</i>	<i>Typhlopoide</i>	<i>Anomalepididae</i> (*)
		<i>Typhlopidae</i> (*)
		<i>Leptotyphlopidae</i> (*)
<i>Alethinophidia</i>	<i>Acrochordoidea</i>	<i>Nigeropheidae</i>
		<i>Palaeopheidae</i>
		<i>Anomalopheidae</i>
		<i>Acrochordidae</i>
		<i>Loxocemidae</i>
	<i>Anilioidea</i>	<i>Xenopeltidae</i>
		<i>Aniliidae</i> (*)
		<i>Uropeltidae</i>
	<i>Tropidopheoidea</i>	<i>Tropidopheidae</i> (*)
	<i>Bolyerioidea</i>	<i>Bolyeriidae</i>
	<i>Booidea</i>	<i>Pythonidae</i>
		<i>Boidae</i> (*)
		<i>Atractaspididae</i>
		<i>Elapidae</i> (*)
	<i>Colubroidea</i>	<i>Colubridae</i> (*)
<i>Viperidae</i> (*)		

(*) Famílias representadas no Brasil

Fonte: adaptado de McDowell (1987) e Cardoso *et al.*. (2003)

A maioria das formas viventes pertence à superfamília *Colubroidea* que compreende as serpentes mais modernas e evoluídas. As famílias *Elapidae* e *Viperidae* são as que apresentam glândulas venenosas, produtoras de toxinas, com aparelhos apropriados para

inoculá-las, ocasionando intoxicações sérias no homem e animais domésticos. (BRASIL, 2001; MELGAREJO, 2003).

A família *Elapidae* encontra-se amplamente distribuída pelo mundo, com cerca de 250 espécies. Muito bem conhecidas da Ásia, África e em particular na Austrália, onde todas as serpentes peçonhentas são dessa família. Possuem espécies famosas como as Najas asiáticas e as temidas Mambas do continente Africano. Nas Américas, a família é representada pelas chamadas popularmente “Cobras corais”. Na fauna brasileira são reconhecidas cerca de 20 espécies, a maioria ao gênero *Micrurus* (CAMPBELL; LAMAR, 1989; ROZE, 1996; JORGE DA SILVA, 1997).

A família *Viperidae* com mais de 200 espécies representa o mais importante grupo de serpentes para saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados não só no Brasil, mas em outros países americanos. Esta família possui 34 gêneros assim representados: *Crotalus*, *Lachesis*, *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*. Apenas os três primeiros adquirem importância epidemiológica. Em nosso país existem 5 gêneros que somam aproximadamente 30 espécies, no qual 20 espécies pertencem ao gênero *Bothrops* 19 ao gênero *Micrurus*, uma ao gênero *Crotalus* e uma ao gênero *Lachesis*. Os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias* são classificados como uma revisão do gênero *Bothrops* encontrando-se em áreas restritas da América do Sul e Bacia Amazônica, com um número limitado de espécies, sem registros de acidentes por estas serpentes. (CAMPBELL; LAMAR, 1989; FEITOSA; MONTEIRO, 1997; BRASIL, 2001).

1.2 O veneno das serpentes

A peçonha consiste em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas. Diferenças intra-específicas na composição do veneno são decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas e sazonais (BRASIL, 2001; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1990 a, 1990b; FURTADO *et al.*, 1991a, 1991b; CHIPPAUX *et al.*, 1991; ABREU, 2004).

Polipeptídeos e proteínas estão presentes em maiores proporções, chegando a compor de 90-95% do seu peso seco. A ação da peçonha pode desencadear severas distúrbios metabólicos. Dentre estes efeitos, podemos destacar neurotoxicidade cardiotoxicidade,

miotoxicidade, ações coagulantes, hemostáticas, hemorrágicas, nefrotóxicas e hepatóxicas (BON, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2008).

Os componentes não protéicos dos venenos podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os constituintes inorgânicos conhecidos são cálcio, cobre ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobalto e zinco (PONCE-SOTO *et al.*, 2006). Porém, nem todos são encontrados em todos os venenos e a quantidade também varia para cada espécie. O papel biológico de cada um desses constituintes inorgânicos não está claro. Alguns estudos sugerem que o cálcio, magnésio e manganês são importantes para a estabilização de certas proteínas, enquanto que outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos como metaloproteases (BJARNASON; FOX, 1994; AIRD, 2002).

Entre os componentes orgânicos não protéicos encontramos aminoácidos livres e pequenos peptídeos, carboidratos, lipídios, principalmente fosfolipídios e aminas biogênicas (VARANDA; GIANNINI, 1994; QUEIROZ *et al.*, 2008).

Algumas enzimas são encontradas em todas as espécies, como a fosfolipase A₂ (BON, 2000). A atividade fosfolipásica é amplamente encontrada nos venenos botrópicos. As serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops atrox* apresentam alta atividade fosfolipásica (VIDAL; STOPPANI, 1971; VIDAL *et al.*, 1972; MURAKAMI, 2008). Além da ação hemolítica, enzimas com atividade de fosfolipase A₂ apresentam ações neurotóxicas pré-sinápticas e miotóxicas. (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 2004; DURIGON *et al.*, 2005).

A atividade proteolítica tem sido relacionada a enzimas identificadas como serinas ou metaloproteases. Elas são responsáveis por intensas reações locais, como edema hemorrágico e necrose, ação hemorrágica, promovida pelas hemorraginas ou fatores hemorrágicos, ação coagulante e formação de bradicinina (JURGILAS, 2000).

As enzimas *trombina-símile* ou tipo trombina estão presentes em um número variado de espécies das subfamílias *Crotalinae* e *Viperinae*. Apresentam ação coagulativa 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; FONSECA, 2006).

Neurotoxinas são as toxinas mais amplamente estudadas sendo os constituintes mais tóxicos dos venenos ofídicos. São divididas, de acordo com o sítio de atuação, em pós-sinápticas e pré-sinápticas. As neurotoxinas pós-sinápticas mimetizam a ação do curare. Elas se ligam aos receptores colinérgicos sem provocar despolarização, inibindo a transmissão neuromuscular. Ocorrem nas serpentes da família Elapidae e Viperidae (VITAL BRAZIL, 1980; ZAMUNÉR *et al.*, 2004). As toxinas pré-sinápticas agem possivelmente inibindo o influxo de cálcio, evitando assim a liberação de acetilcolina. Têm letalidade maior que as toxinas pós-sinápticas são estruturalmente relacionadas à fosfolipase A₂ e podem agir como toxinas mionecróticas. Foram encontradas também em serpentes da família *Crotalidae* como, por exemplo, a crotoxina, isolada da serpente Sul Americana *Crotalus durissus terrificus* (HAWGOOD; SANTANA DE SÁ, 1979; BEGHINI *et al.*, 2008). Em estudos comparativos entre as espécies de *Bothrops*, *B. insularis* e *B. neuwiedi* e a espécie *Crotalus durissus cascavella* demonstraram uma ação pré-sináptica dos venenos botrópicos com graus variados de bloqueio neuromuscular (DA CRUZ-HÖFLING, 2004).

As cardiotoxinas, assim como o fator lítico direto e as cobraminas são todas denominações usadas para toxinas de membrana que causam a despolarização persistente das membranas celulares, excitáveis ou não, acarretando distúrbios celulares como hemólise e citotoxicidade. Foram isoladas de venenos elapídicos, e são responsabilizadas, em associação com fosfolipases, pelas lesões locais como edema e necrose, nos acidentes com “Najas” (REID, 1964; VITAL BRASIL, 1982).

Apesar da complexa mistura de peptídeos ativos e proteínas presentes nos venenos ofídicos Kini e Evans (1992), destacaram a importância de três grupos de proteínas: as proteases, as desintegrinas e as proteínas relacionadas com as lectinas tipo C (CLPs).

As proteases formam um grupo heterólogo com massas moleculares variando de 15 a 380 kDa. São importantes na digestão das presas, provocando vários efeitos farmacológicos como os hemorrágicos, anticoagulantes e ativação ou inibição da agregação plaquetária (JIA; PEREZ, 2009).

As desintegrinas possuem massa molecular variada e são proteínas enzimáticas que inibem a interação entre o fibrinogênio e o complexo glicoprotéico IIb-IIIa da coagulação sanguínea. Apresenta uma seqüência de aminoácidos R-G-D característica, a qual é responsável por sua atividade (MUSIAL *et al.*, 1990).

As proteínas relacionadas com as lectinas tipo C constituem um grupo de proteínas estruturalmente homólogas, mas com funções diversas. Algumas delas exibem atividades lectínicas, outras induzem efeitos anticoagulantes ou efeitos na aglutinação e agregação plaquetária (KINI, 1996).

Estudo dos venenos de serpentes tem propiciado a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos, destacando-se a neurotransmissão na junção neuromuscular (BORJA *et al.*, 2002; ZAMUNER *et al.*, 2000), a estrutura e a função dos receptores nicotínicos, (ARAÚJO, 2005) a casacata da coagulação (PINHO, 2001); alterações no sistema cardiorenal (FERREIRA, 1965; FONTELES *et al.*, 1983; MONTEIRO *et al.*; 2007).

1.4 *Bothrops marajoensis*

Bothrops marajoensis, como o nome indica, foi encontrada primeiro na ilha de Marajó, no Pará, e posteriormente em alguns locais litorâneos isolados do Maranhão. Considerada uma espécie do grupo *atrox*, sua classificação precisa ser revista para uma nova avaliação de seu *status*. (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Estudo com a finalidade de definir variações de parentescos entre espécies do gênero, revelou que a espécie *Bothrops atrox* possui variações fenotípicas entre as diversas serpentes do grupo, cuja principal causa está na necessidade de adaptação a ambientes diferentes, refletindo na filogenia das serpentes. Porém, para as populações das serpentes atualmente classificadas como *Bothrops marajoensis* existe pouca distinção entre esta espécie e *Bothrops atrox*. (WOLFGANG *et al.*, 1996).

Apesar de compor um dos gêneros mais importantes e bastante estudados na família dos viperídeos, a espécie é ainda pouco conhecida, talvez pela própria indefinição de sua classificação. (figura 3)



Figura 3 - Imagem da espécie *Bothrops marajoensis* (seta) em seu habitat natural
Fonte: Wolfgang Wuster (2005). Local: Salvaterra, Pará, Ilha de Marajó.

1.5 Características gerais e epidemiológicas dos acidentes Botrópicos

Os acidentes por serpentes peçonhentas representam sérios problemas para a saúde pública, principalmente nos países tropicais, onde a frequência com que ocorrem é particularmente alta, assim como a mortalidade por eles causada (PINHO; PEREIRA, 2001).

A mortalidade dos acidentados varia nas diferentes regiões do mundo. Na Ásia, principalmente na Índia, Paquistão e Birmânia, ocorre em torno de 25.000 a 35.000 óbitos por ano, sendo uma das serpentes mais importantes a *Vipera russelli*. Na África ocorrem de 400 a 1.000 mortes por ano e as serpentes que causam maior número de acidentes são espécies do gênero cobra (WOLFGANG *et al.*, 1996).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorrem, por ano, entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos com um índice de mortalidade de 0,45%. A maioria destes acidentes deve-se a serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (BRASIL, 2001).

No Ceará existem poucos trabalhos sobre ofidismo. Recente pesquisa realizada sobre os acidentes ofídicos em nosso Estado mostrou que o maior número de casos em humanos era devido às serpentes do gênero *Bothrops* (ROCHA, 2008) (figura 4).

No período de 2001 a 2007 foram notificados no Ceará, 3877 casos de acidentes por serpentes peçonhentas. Foram mais acometidas as pessoas do sexo masculino (74.2%) e com faixa etária de 21 a 50 anos confirmando a consideração de que este tipo de acidente esta relacionado à atividade agrícola (ROCHA, 2008).

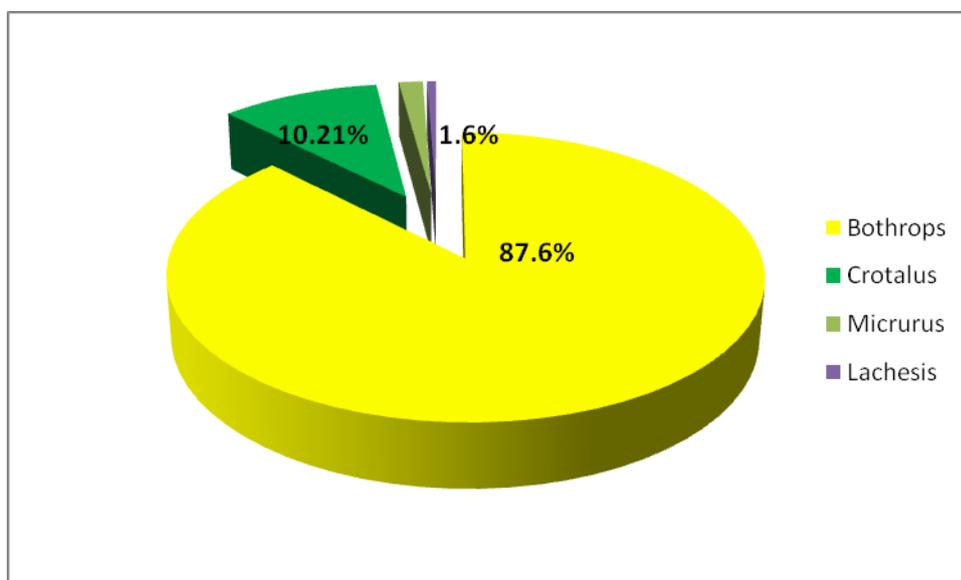


Figura 4 - Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente envolvida. Ceará, Brasil, 2001 a 2007
Fonte: Rocha (2008)

As alterações clínicas decorrentes dos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* ocorrem tanto no local da picada como sistêmica. A picada constitui-se em uma inoculação subcutânea ou intramuscular. A distância interposta aos sinais da picada nem sempre se correlaciona com as dimensões da serpente e com a quantidade de veneno inoculada (BRASIL, 2001; FRANÇA, 2003).

As principais complicações locais descritas por acidentes botrópico incluem a formação de abscesso, necrose e síndrome compartimental (De ANDRADE *et al.*, 1989; JORGE *et al.*, 1994; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Abscesso, celulite e erisipela podem ser observadas na região da picada e resultam em condições propícias ao crescimento de microrganismos, provocados em função da ação inflamatória aguda local somada a contaminação por bactérias da flora bucal das serpentes. Bacilos gram-negativos, agentes anaeróbios (*Clostridium sp*) e cocos gram-positivos, encontrados na boca das serpentes, têm sido descritos como agentes causadores de infecção (JORGE *et al.*, 1994).

A necrose geralmente se limita ao tecido subcutâneo, mas pode comprometer estruturas mais profundas como tendões, músculos e ossos. O período de instalação é variável, na maioria dos casos, a partir do segundo dia após o acidente. A intensidade e a extensão da necrose estão fortemente relacionadas ao uso de torniquetes e outras intervenções bastante difundidas, porém extremamente prejudicial. A demora entre o acidente e o tratamento soroterápico também podem agravar o caso (FERREIRA *et al.*, 1992; MORENO *et al.*, 2005).

A síndrome compartimental é uma complicação rara, porém quando ocorre necessita de intervenção rápida. É definida como aumento da pressão dentro de um compartimento fechado, por onde transcorrem músculos, nervos e vasos, comprometendo a circulação sanguínea regional, resultando em anormalidades da função neuromuscular. Os venenos botrópicos propiciam o desenvolvimento da síndrome compartimental por provável processo inflamatório e hemorrágico na região da picada. Localiza-se mais freqüente nos dedos, lateral da perna e regiões dorsal e ventral do antebraço (FRANÇA *et al.*, 2003).

O envenenamento sistêmico humano por serpentes do gênero *Bothrops*, freqüentemente resulta em incoagulabilidade sanguínea (SANO-MARTINS *et al.*, 1994). Este efeito deve-se, entre outros fatores, à ação de serinoproteases que clivam os fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio promovendo uma depleção dos níveis de fibrinogênio sanguíneo, e não ativa o fator XIII da cascata de coagulação, responsável por promover ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. (MARKLAND, 1998).

A insuficiência renal aguda. Possui patogênese multifatorial (REZENDE *et al.*, 1989; BOER-LIMA *et al.*, 1999).

Diversas alterações renais já foram descritas como decorrência do envenenamento ofídico. Entre elas podemos citar glomerulonefrite glomerulite e nefrite intersticial (SANT; PUNDARE, 1972), arterite e necrose tubular (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979), necrose cortical e insuficiência renal (RAAB; KAISER, 1966; HAVT *et al.*, 2005). Entre os demais o mais relatado tem sido a insuficiência renal (BARBOSA, 2006) Ainda foram descritas a ocorrência de hematúria, mioglobínúria, hemoglobínúria e proteinúria (SITPRIJA; BOONPUCKNAVIG, 1979).

Amaral *et al.* (1985) estudando as alterações renais provocadas em acidentes humanos com as serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu* descreveram a ocorrência de necrose cortical sem, contudo, desvendar sua patogênese. Os autores sugeriram então, que a necrose cortical deveria ser causada por coagulação intravascular, ação direta de enzimas proteolíticas no endotélio vascular ou por espasmos nos vasos provocados por substâncias vasoativas.

Sintomatologia neurológica raramente é atribuída aos acidentes causados por serpentes do gênero bothrópico. São poucos os casos clínicos no qual é diagnosticada a presença de alterações nervosas (BOCHENER; STRUCHINER, 2003; MISE, 2007).

1.6 Componentes do veneno do gênero *Bothrops*

As peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* podem ser caracterizadas por três atividades fisiopatológicas complexas: Ação proteolítica, mais bem definida como inflamatória aguda, ação coagulante e ação hemorrágica. Diferentes toxinas podem atuar sinergicamente para induzir um efeito, da mesma forma um único tipo de toxina pode ter várias atividades (ROSENFELD, 1971; FRANÇA *et al.*, 2003)

A atividade inflamatória aguda é causada por um conjunto de frações bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas, responsáveis pelos fenômenos locais do veneno bothrópicos. As frações do veneno, em geral, possuem atividade indireta, induzindo ou liberando autacóides, como a bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, atuando de maneira complexa interligada. Uma única fração do veneno pode liberar várias substâncias com atividade inflamatória (BEGHINI *et al.*, 2008).

A capacidade de ativar fatores de coagulação sangüínea está relacionada a substâncias capazes de ativar fibrinogênio, protombina e fator X ocasionando o consumo de fibrinogênio e a formação de fibrina, induzindo a incoagulabilidade sangüínea. A trombocitopenia pode ocorrer nas primeiras horas e eventualmente persistir por dias. Existe uma variação na intensidade da atividade coagulante em diferentes espécies e subespécies deste gênero (NAHAS *et al.*, 1979; Da ROCHA; FURTADO, 2005).

A atividade hemorrágica pode ser atribuída as hemorraginas, metaloproteínas que contém zinco. Estão presentes na família *Viperidae* por provável gene ancestral comum. As hemorraginas possuem capacidade de romper a integridade do endotélio vascular. Degradam vários componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo 4, fibronectina e laminina. São potentes inibidoras da agregação plaquetária. Seu possível mecanismo de ação está relacionado à degradação da lâmina basal do endotélio, na microvasculatura, com ruptura completa das células. São descritos fatores hemorrágicos no veneno de *Bothrops jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*. (ASSAKURA *et al.*, 1986; LOMONTE *et al.*, 1994; KAMIGUTI *et al.*, 1994).

São encontradas também nas peçonhas botrópicas, metaloproteases com função fibrinogenolítica, que geram incoagulabilidade sanguínea assim como as serinoproteases anteriormente citadas. Estas clivam preferencialmente a cadeia A-a do fibrinogênio, seguida da clivagem da cadeia B-b e raramente a cadeia g é hidrolisada (MARKLAND, 1998).

1.6.1 As fosfolipases A₂ dos venenos de *Bothrops*

As fosfolipases A₂ constituem uma superfamília de enzimas definidas por catalisar a hidrólise do éster ligado à posição central (Sn-2) de glicerofosfolípídeo de membranas celulares liberando precursores de mediadores químicos relacionados ao processo inflamatório. (BONFIN *et al.*, 2008).

A forma extracelular é constituída de 10 isoenzimas de baixo peso molecular, dependentes de cálcio para atuação e envolvidas em processos como produção de eicosanóides e a inflamação (LOMONTE, 2009). No processo fisiopatológico natural, as fosfolipases estão relacionadas à liberação do ácido aracdônico e em conseqüência os

eicosanóides (prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos e lipoxinas) como também da lisogliceril-fosforilcolina, precursor do fator de agregação plaquetária (BONFIN *et al.*, 2008).

Nas peçonhas de serpentes as fosfolipases exercem atividades como: miotoxicidade, indução da agregação plaquetária, efeitos hemolíticos indiretos, edematogenicidade e efeitos anticoagulantes (KINI; EVANS, 1992).

No veneno botrópico podem ser encontrados diversos tipos de fosfolipases com atividades variadas: neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, proinflamatória, coagulante e agregante de plaqueta. Muitas são dependentes de cálcio para atuar. Na classificação geral das enzimas fosfolipases das serpentes as miotoxinas foram as primeiras a serem identificadas (SAI-NGAM, 2008).

As miotoxinas fosfolipasicas foram classificadas quanto à presença ou ausência de atividade neurotóxica. Há uma homologia estrutural constante em cada grupo. As que não apresentam atividade neurotóxica possuem uma clara distinção das que contém o ácido aspártico na posição 49 “Asp49” e as com resíduo de lisina na mesma posição “Lys49”. As “Asp 49” são as clássicas fosfolipases que catalisam a hidrólise do éster ligado a posição *Sn2* do glicerosfosfolípido. A Lys49 é dita como uma variante, também denominada PLA2 (PLA2 *símile*), por serem estruturalmente semelhantes, mas destituída de atividade enzimática, contendo lisina na posição do ácido aspártico. Uma variante serina ocupando a posição 49 Ser49 também é destituída de atividade enzimática (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003). As características destas duas formas, inativas, impedem a liberação do ácido graxo produzido após a liberação do fosfolípido, interrompendo o ciclo catalítico. Contudo, o efeito mionecrótico ocorre por uma via catalítica independente de atividade enzimática. *In vivo* esta ação é acompanhada por edema, hiperalgesia, liberação de citocinas proinflamatórias como a interleucina 6, além de atividade letal quando injetada por via endovenosa ou intraperitoneal em camundongos (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERÓN, 2003).

As miotoxinas fosfolipasicas A2 sem atividade neurotóxica são comuns em venenos crotálicos e botrópicos, onde além de serem mais abundantes agem em doses maiores (alta DL50) (SOARES *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2001). Seu potencial mionecrótico é menor em comparação com as fosfolipases com ação neurotóxica, embora por sua quantidade na

composição do veneno seja maior, tendo uma participação central na produção da lesão e destruição tissular causando a mionecrose (MOURA - DA-SILVA *et al.*, 1991; LOMONTE; ÂNGULO; CALDERON, 2003; TRENTO, 2001).

As fosfolipases com ação neurotóxica estão presentes na família dos elapídeos, responsável pelo efeito letal destas serpentes, agindo na junção neuromuscular, em doses muito baixas, com atividade pré-sináptica, podendo gerar lesões na musculatura esquelética em doses também inferiores (1 a 2 µg) No veneno crotálico a crotóxina, principal componente tóxico do veneno, também é classificada como uma fosfolipase neurotóxica (PAHARI *et al.*, 2007).

Nos venenos de algumas serpentes do gênero botrópico têm sido isoladas e caracterizadas as ações neurotóxicas de fosfolipases: *Bothrops neuwiedi*, (ZAMUNER, 1996) *Bothrops insulares* (GOGO, 1998).

1.6.2 As lectinas dos venenos de *Bothrops*

As lectinas são definidas como proteínas com afinidade específica para moléculas de carboidratos, reconhecidas pela sua capacidade de aglutinar células (ÂNGULO; LOMONTE, 2008).

As lectinas de origem animal foram classificadas, inicialmente, quanto a necessidade de cálcio para atuar (lectinas cálcio dependente). Atualmente são reconhecidas as dependentes do radical sulfidril (lectinas tipo S) sendo a maioria específica para radical β-galactosídeos (DRICKAMER, 1993). Lectinas tipo C, que perderam a capacidade de se ligar a carboidratos são encontradas somente nos venenos das serpentes. São denominadas proteínas similares e são metaloproteases com sua cadeia leve homóloga às lectinas específicas para galactose. Possuem ação contra fatores da coagulação, inibição da agregação plaquetária, e da trombina (JEBALI *et al.*, 2009).

No gênero *bothrops* foram isoladas lectinas de varias espécies: *B. jararaca* (FUJIMURA *et al.*, 1995); *B. godmani* (LOMONTE *et al.*, 1990); *B asper* (RUCAVADO *et*

al., 2005); *B. jararacussu* (KASSAB *et al.*, 2004). *B. insulares* (GUIMARÃES *et al.*, 2004), *B. pirajai* (HAVT *et al.*, 2005).

1.7 O veneno do gênero *Bothrops* e suas atividades nos sistemas fisiológicos

1.7.1 Toxicidade cardiovascular associada ao veneno Botrópico

As alterações cardiovasculares são descritas no veneno de diversas espécies do gênero botrópico. O veneno dos viperídeos, principalmente do gênero *Bothrops*, apresentam em sua composição toxinas que deprimem a atividade cardíaca (RICARDO, 2008; SIFUENTES *et al.*, 2008).

A bradicinina foi detectada no plasma de animais após a adição de veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Esta descoberta fez parte de um estudo continuado, iniciado por Rocha e Silva, em 1939, sobre choque circulatório, enzimas proteolíticas e sua relação com a toxinologia das picadas por serpentes peçonhentas. A descoberta da bradicinina possibilitou que, Sérgio Henrique Ferreira, um dos colaboradores de Rocha e Silva na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, descobrisse um "fator potencializador da bradicinina" no veneno botrópico, que aumentava intensamente a duração e a potência de seus efeitos vasodilatadores, com conseqüente redução da pressão arterial (ROCHA e SILVA *et al.*, 1949; FERREIRA, 1965; FERREIRA, 1992).

Diversos estudos descrevem as ações pressóricas do veneno do gênero *Bothrops* (FERREIRA, 1965; BRAGA, 2006; SILVA, 2008). As frações obtidas do veneno bruto das serpentes do gênero também demonstram ação no sistema cardiovascular.

Comparando-se a atividade funcional entre fosfolipases A2 isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu* observou-se que somente um tipo apresentava atividade hipotensora (MARCUSI *et al.*, 2003).

Estudos analisando a atividade biológica de lectina extraída do veneno de *Bothrops jararacussu*, avaliado na pressão arterial *in vivo* de ratos anestesiados demonstrou a presença

de atividade hipotensora (PANUNTO *et al.*, 2006). Da mesma forma o veneno bruto de *Bothrops insularis* no mesmo tipo de preparação mostrou uma redução da pressão arterial sistêmica sem alterações significantes na frequência cardíaca e respiratória (BRAGA *et al.*, 2006).

A avaliação das alterações eletrocardiográficas em ofidismo é pouco explorada. Múltiplos fatores influentes podem estar estabelecidos no paciente antes do acidente com a peçonha (cardiopatia prévia, distúrbios hidroeletrólíticos, drogas, entre outras), interferindo nas análises eletrocardiográficas. Uma análise do comprometimento cardíaco em acidentes botrópicos humano mostrou alterações eletrocardiográficas sugestivas de comprometimento miocárdico. As principais descritas foram: alteração difusa da repolarização ventricular, isquemia subepicárdica e bloqueio de condução (HERDOÍZA, *et al.*, 1983).

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (2.5-10.0µg / ml) na perfusão contínua em coração isolado de rato induziu à diminuição na amplitude de contração cardíaca dose dependente. A análise da solução do perfusato cardíaco mostrou um aumento na taxa de creatinina induzida pelo veneno (SIFUENTES, 2008).

1.6.4 Nefrotoxicidade associada ao veneno Botrópico

A insuficiência renal aguda tem sido relatada como a causa mais freqüente de mortes causadas por serpentes do gênero *Bothrops*. Diversas pesquisas descrevem a ação nefrotóxica induzida pelo veneno das serpentes do gênero. Estes efeitos renais podem estar associados a ações de miotoxinas, lectinas e fosfolipases, dentre outros constituintes do veneno bruto das espécies (BARBOSA *et al.*, 2006; HAVT *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2006).

Estudos isolados sobre os venenos de *Bothrops jararacuçu* e *Bothrops moojeni* ambas nas doses de (3, 10 e 30 µg / mL) usando a preparação de perfusão em rim isolado de ratos, mostraram alterações semelhantes: uma diminuição na pressão de perfusão e na resistência vascular renal com aumento na taxa de filtração de glomerular e o fluxo urinário. O transporte tubular (sódio e potássio) também foi diminuído (HAVT, 2001; BARBOSA, 2002).

A análise de dois tipos de miotoxinas de *Bothrops moojeni* (Miotoxina I -Bmtx-I e Miotoxina II-BmtxII) demonstrou que a primeira possuía ação semelhante ao veneno bruto no sistema de perfusão renal, porém Miotoxina II não apresentava nenhum efeito fisiológico renal, com exceção de uma diminuição no transporte de potássio. Esta inabilidade aparente de Bmtx-II em induzir o efeito renal poderia ser explicada pela ausência da lisina C-terminal. Avaliando o efeito da Bmtx-I em vasos da microcirculação através da perfusão em leito vascular mesentérico, não demonstrou efeitos significativos, sugerindo que as alterações de pressão de perfusão e resistência renal não aconteciam por efeitos diretos na vasculatura renal (BARBOSA, 2006).

Alterações renais induzidas pelo veneno bruto de *Bothrops pirajai* e uma lectina (lectina tipo-C) no ensaio de perfusão renal em ratos mostrou que ambos geravam reduções na pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, taxa de filtração de glomerular e transporte de sódio, potássio, observando que os principais efeitos renais eram devidos a ação da lectina (HAVT *et al.*, 2005).

Boer *et al.* (2002) verificaram a presença de uma atividade proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni* no glomérulo renal, responsável pela instalação da falência renal aguda presente nas manifestações clínicas após acidentes com serpentes do gênero.

1.7.2 Neurotoxicidade associada ao veneno Botrópico

As serpentes do gênero *Bothrops* apresentam toxicidade menor se comparada a outros gêneros peçonhentos, como o crotálico, porém seu veneno é capaz de deixar seqüelas locais visíveis, geralmente não neutralizadas de modo eficiente pelos antivenenos, ainda que seja administrado logo após o acidente (BEGHINI *et al.*, 2005).

A ação neurotóxica pré-sináptica é bem estabelecida para os gêneros de serpentes *Crotalus* e *Micrurus* (BUSH; SIEDENBURG, 1999). Historicamente considerou-se que venenos botrópicos só possuíam ação pós-sináptica e efeitos miotóxicos. Porém, alguns estudos também sugerem uma ação pré-sináptica para estes venenos. *Bothrops neuwiedi* está relacionada entre as espécies do gênero com atividade neurotóxica mais bem relatada. (ZAMUNER *et al.*, 1996; BORJA *et al.*, 2002; RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 2004).

Atividades neurotóxica e miotóxica de venenos de *Bothrops neuwiedi*, provenientes de regiões diferentes do Brasil mostraram um bloqueio neuromuscular irreversível; 15 dos 16 lotes de veneno estudado não aboliram respostas a acetilcolina (110 μ M) a baixas concentrações (10-20 μ g / ml.), mas bloquearam respostas a KCl (13.4mM). Nas concentrações de 5-20 μ g / ml, o veneno mais ativo bloqueou a contração sem respostas significantes para acetilcolina e KCl, sugerindo uma ação pré-sináptica. Porém nem todas as subespécies de *B. Bothrops neuwiedi* apresentaram atividade neurotóxica significativa em preparações de músculo isolado (BORJA *et al.*, 2002).

Um estudo comparativo dos efeitos do veneno bruto de três subespécies de *Bothrops neuwiedi*: *B.n.goyazensis*, *B.n.paranaensis* e *B.n.diporus* sobre a junção neuromuscular de ave (músculo biventer cervicis) e de mamífero (nervo frênico-diafragma de camundongo), demonstrou atividade maior em preparações de mamífero. Na concentração de 50 μ g a 37°C, na preparação de ave, o veneno de *B.n.goyazensis* exibiu maior atividade. No entanto, a 22°C, o veneno de *B.n.diporus* exibiu maior atividade, demonstrando que esses venenos atuam de maneira diferenciada sobre a junção neuromuscular. (ABREU, 2004)

Os efeitos neuromusculares do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram estudados através de preparações biventer cervicis de aves e nervo frênico-diafragma de camundongo observando uma a ação neurotóxica, preferencialmente em sítios pré-sinápticos com atividade farmacológica relacionada a sua atividade enzimática. Neste trabalho observou-

se que o efeito neurotóxico induzido pelo veneno de *B. n. pauloensis* está relacionado à presença de PLA2s miotóxicas. (RODRIGUES-SIMIONI *et al.*, 2004; DURIGON *et al.*, 2005).

Rodrigues-Simioni *et al.* (2004), avaliando as ações pré-sinápticas de venenos de *Bothrops* (*B. insularis* e *B. neuwiedi*) demonstraram que venenos botrópicos podem conter componentes que agem presinápticamente, com semelhanças com o complexo crotoxina,

Ação do veneno de *Bothrops lanceolatus* (espécie encontrada na Ilha da Martinica, América Central) foi avaliada na junção neuromuscular e no músculo esquelético de camundongos, a uma dose pré-estabelecida de 20 µg/ml na qual induziu aumento inicial das contrações musculares e o aparecimento de contrações espontâneas (efeitos pré-sinápticos) seguido por bloqueio neuromuscular de 70 % em $182,6 \pm 15,7$ min. A Neostigmina e a 4-aminopiridina antagonizaram o bloqueio produzido pelo veneno, nessa preparação, sendo que com a Neostigmina o antagonismo foi parcial ($64,4\% \pm 9,2$). Utilizando-se a estimulação elétrica direta, o veneno na dose estudada não alterou a amplitude da resposta contrátil, confirmando que sua ação provavelmente se dá na junção neuromuscular e não nas fibras musculares da preparação. Nas preparações de diafragma cronicamente desnervado de camundongos, a contratatura induzida pela adição de acetilcolina foi inibida pelo veneno, sugerindo uma ação nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos. Embora esse veneno tenha apresentado tanto efeitos pré como pós-sinápticos, nos experimentos "in vitro", com a dose estudada, os efeitos pós-sinápticos são mais evidentes (ARAÚJO, 2008).

O peptídeo potencializador de bradicinina BPPs isolado do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* possui atividade em receptores nicotínicos, possivelmente envolvido em seu efeito anti hipertensivo (NERY , 2008). Extraído da mesma espécie de serpente o Bothropstoxin-I é uma fosfolipase com atividades miotóxica e neurotóxica. Em estudos realizados com esta fosfolipase em preparações de nervo frênicos diafragma adicionadas com manganês observou-se a presença de atividade pré-sináptica, antes referida somente para serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Crotalus* (RODRIGUES-SIMIONI, 2004)

A determinação do mapeamento das características estruturais de fosfolipases com ação neurotóxica de serpentes mostra que partes diferentes da molécula de toxina são envolvidas em passos distintos desta ação (PRIJATELJ, 2008).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O veneno extraído das glândulas das serpentes tem propiciado a descoberta de diversos mecanismos farmacológicos, além de apresentar uma diversidade de substâncias com potenciais a serem desvendados. Devido à alta especialização e características peculiares de cada grupo, têm sido alvo para descoberta de substância ativas para medicina,

O gênero *Bothrops* possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista médico, tanto pela porcentagem predominante dos acidentes ofídicos registrados quanto pelo seu potencial farmacológico.

Apesar de compor um dos gêneros mais importantes e bastante estudados na família dos viperídeos, *Bothrops marajoensis* é uma espécie ainda pouco conhecida. São escassos os estudos com relação a sua biologia e a toxilogia do seu veneno e frações. (WOLFGANG *et al.*, 1996).

Santos *et al.* (2004), demonstraram atividade nucleotídica do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* sobre DNA de esperma de salmão. Recentemente, TORRES, *et al.*, 2008 descreveram sua capacidade em inibir o crescimento de bactérias, especialmente da bactéria gram-positiva *S. aureus*, mas não apresentou qualquer inibição sobre as cepas de *E. coli*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Galbiatti (2006) isolou deste veneno uma fosfolipase A₂ com atividades miotóxica e neurotóxica, porém não quantificaram essa ação.

O estudo avaliando a atividade do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* e suas frações no sistema cardiorrenal e neuromuscular representa um trabalho inédito, contribuindo para descoberta de novas perspectivas para uso na medicina.

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do nosso trabalho foi avaliar a toxicidade cardio-renal e neural, do veneno da serpente *Bothrops marajoensis* e de suas frações.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a toxicidade cardiovascular induzida pelo veneno de *Bothrops marajoensis* através de alterações eletrocardiográficas e na pressão arterial de ratos, submetidos à administração do veneno e suas frações.

Analisar o efeito do veneno no sistema de perfusão de coração isolado e de átrio isolado.

Avaliar a ação do veneno em vasos de resistência através da perfusão em leito vascular mesentérico.

Avaliar a nefrotoxicidade induzida pelo veneno bruto de *Bothrops marajoensis* e suas frações (PLA₂ e lectina) no sistema de perfusão renal de rato.

Avaliar a neurotoxicidade induzida pelo veneno bruto de *Bothrops marajoensis* e suas frações na junção neuromuscular esquelética através de preparação do nervo frênico-diafragma de camundongo.

Analisar os efeitos na neurotransmissão autonômica in vitro das alterações induzidas pelo veneno e suas frações (PLA₂ e lectina)

Diferenciar ações pós-sinápticas das alterações pré-sinápticas na neurotransmissão autonômica.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g ou camundongos 30 a 35 g oriundos do biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antes do experimento com água “*ad libitum*”. Foram seguidos todos os protocolos éticos de pesquisa com animais.

4.2 Procedimentos com o veneno de *Bothrops marajoensis*

O veneno de *Bothrops marajoensis* e suas frações foram gentilmente cedidos pelo professor Marcus Hikari Toyama, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Campus do Litoral Paulista, São Vicente) (UNESP), para realização dos ensaios biológicos.

Inicialmente o veneno foi liofilizado. As purificações das frações do veneno de foram realizadas utilizando uma combinação de filtração em gel Shephadex e cromatografia de fase reversa (HPLC) com reagentes da Sigma Aldrich Chemical, Waters, Applied Biosystem, Pierce and Bio Rad, conforme descrito por Toyama *et al.* (1995).

4.3 Avaliação da toxicidade Cardiovascular

4.3.1 Pressão Arterial

Ratos Wistar, machos, pesando de 250-300 g foram submetidos a jejum de 24 horas sendo depois anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e submetidos à cirurgia. Secionou-se a linha mediana da região cervical, com isolamento das glândulas parótidas direita e esquerda, aprofundando a incisão até a traquéia. Após divulsão marginal deste órgão, foi identificado o feixe vaso nervoso de onde foi isolada a artéria carótida esquerda, preservando sempre o nervo Vago. Seguiu-se então a canulação desta artéria para registro da pressão arterial média. Semelhante manobra foi realizada afim de canular a veia

jugular externa com o propósito de injetar as substâncias testes e os padrões. Os registros das experiências foram realizados com transdutores P23 Statham (Gould, Oxnard, CA, EUA) acoplados a um polígrafo Narco BioSystems (4-DMB, Houston, TX, EUA). Antes do início das experiências procedeu-se à calibração do instrumento utilizado como padrão um manômetro de mercúrio numa escala de 50 a 250 mmHg.

A pressão arterial média foi calculada segundo a equação: $PAM: PD + (PS - PD)/3$

Onde PAM – Pressão arterial média; PD – pressão diastólica; PS – Pressão sistólica.

O veneno bruto de *Bothrops marajoensis* foi testado nas doses de 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ g/kg, e observada sua resposta pressora. Em outro grupo, para avaliar se efeitos hipotensores obtidos eram oriundos de reflexo do tipo Bezöld-Jarisch por ação do veneno em quimioceptores ventriculares, realizou-se o mesmo procedimento, em animais atropinizados (1 μ g/kg de atropina). O procedimento foi realizado até que um bloqueio positivo fosse obtido, ou seja, 80% ou mais de diminuição da resposta ao agonista. O veneno de *Bothrops marajoensis* foi utilizado na dose de 100 μ g/kg, e observada sua resposta pressora.

Também se avaliou no mesmo sistema a ação de duas fosfolipases, miotoxinas básicas, e uma lectina isoladas do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*.

4.3.2 Perfusão de Coração Isolado (LANGENDORFF, 1898)

Ratos machos, Wistar, pesando entre 250 e 350 g após submetidos a anestesia com pentobarbital sódico(50mg/kg), foram decapitados 20 minutos após heparinização (500UI/kg). O tórax foi aberto e o coração banhado com solução perfusora. A aorta foi canulada acima da válvula aórtica e assim iniciada a perfusão retrógrada com a solução de Krebs-Henseleit tamponada com bicarbonato. O pH da solução foi ajustado para 7,4 e equilibrado com 95% O₂ – 5% CO₂ a uma temperatura de 37° C. A concentração final de sais no tampão foi de (g/l): NaCl 6.7, NaHCO₃ 2.1, KCl 0.37, KH₂PO₄ 0.17, MgSO₄ H₂O 0.144, CaCl₂ H₂O 0.154, e glicose 0.65.

As variações de pressão foram lidas através de um transdutor de pressão (P23 Statham) ligado ao sistema. A força isométrica de contração foi medida através de um transdutor de força (model F60, Narco BioSystems) conectado a um polígrafo de quatro canais (Narco Biosystems). Os corações foram montados sob uma tensão de 2 g. A frequência

e ritmo cardíaco foram acompanhados através do registro contínuo das contrações espontâneas. O coração foi perfundido por meio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow) e o fluxo de perfusão mantido em 12 ml/min (figura 5). O veneno bruto de *Bothrops marajoensis* foi utilizado nas doses de 0.3, 1, 3, 10 e 30 μ g/ml.

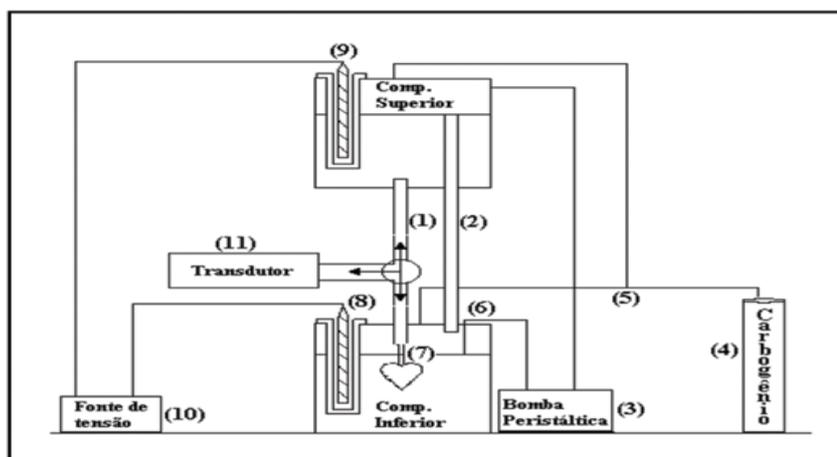


Figura 5 - Figura esquemática do sistema de perfusão cardíaca em ratos

Nota: Ao centro compartimentos interligados por mangueira de perfusão (1); (2) mangueira lateral; (3) mangueira peristáltica, (4) cilindro de carbogênio; (5) mangueira para condução do carbogênio; (6) mangueira para circulação da solução; (7) cânula para aorta; (8) e (9) resistência; (10) fonte de tensão; (11) transdutor de pressão

Fonte: Colugnati *et al.* (2005)

4.3.3 Átrio isolado (VAN ROSSUM, 1963)

O tecido foi obtido de ratos machos, Wistar, pesando entre 300 e 350 g após submetidos a anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg), os átrios direitos foram incisados, montados verticalmente em banhos com capacidade de 5 ml e superfundidos com solução de Krebs-Henseleit (pH 7.4) mantido a uma temperatura de 37° C e aerado com carbogênio. A concentração final de sais no tampão foi de (g/l): NaCl 6.7, NaHCO₃ 2.1, KCl 0.37, KH₂PO₄ 0.17, MgSO₄ H₂O 0.144, CaCl₂ H₂O 0.154, e glicose 0.65. As peças isoladas foram conectadas, sob tensão inicial de 2g, a um transdutor de força (Narco Biosystems) de registro isométrico em polígrafo, mantidas em equilíbrio por uma hora com lavagens a cada

15 min, antes da execução do experimento. O veneno bruto de *Bothrops marajoensis* foi utilizado nas doses de 0.3, 1, 3, 10 e 30 μ g/ml.

4.3.4 Atividade eletrocardiográfica

Ratos Wistar, machos, pesando de 250-300 g foram submetidos a jejum de 24 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e submetidos à avaliação eletrocardiográfica.

Os animais foram mantidos em decúbito dorsal e canulada veia jugular para injeção do veneno. Eletrodos bipolares foram implantados subcutaneamente (derivação II), acoplados a um aparelho eletrocardiográfico (EKA-8 Burdick) de registro de pena. O registro foi realizado antes, após a administração de salina e após administração do veneno 100 μ g/kg.

A análise do registro foi feita pela observação da duração dos intervalos dos segmentos, Q-T e P-R e análise qualitativa.

4.3.5 Perfusão em leito vascular mesentérico

O mesentério foi perfundido em sistema aberto (figura 6) com solução de Krebs contendo: 114.0mM de NaCl; 4.96mM de KCl; 1.24mM de KH_2PO_4 ; 0.5mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 24.99mM de NaHCO_3 ; 2.10mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; e 3.60mM de glicose. A solução foi mantida a 37°C e o leito foi perfundido a um fluxo constante (4mL/min) enquanto a variação da pressão foi mensurada pela média das pressões de perfusão através de um transdutor (Statham P23, Gould, Oxnard, CA, USA) conectado ao sistema. As variações na pressão de perfusão foram continuamente registradas por um fisiógrafo de quatro-canaís (Narco BioSystems, Houston, TX, USA). A integridade funcional do endotélio foi testada em leitões pré-contraídos com fenilefrina (0.1 micromolar) após adição de acetilcolina (0,1 micromolar). A resposta vasodilatadora correspondente a mais de 50% do valor pressórico induzido por fenilefrina era considerada na presença de endotélio funcional. A seguir, o leito era lavado com solução de Krebs-Henseleit sem fenilefrina. Após um período de repouso de 30 minutos o leito foi novamente pré-contraído com fenilefrina (1 micromolar) e concentrações crescentes (0.1, 1 e 100 μ L/mL) do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* ou salina (isovolumetricamente) foram injetadas no sistema em intervalos constantes de 3 min. A

vasodilatação foi expressa com percentual de queda em relação ao incremento pressórico induzido por fenilefrina (considerado como 100%).

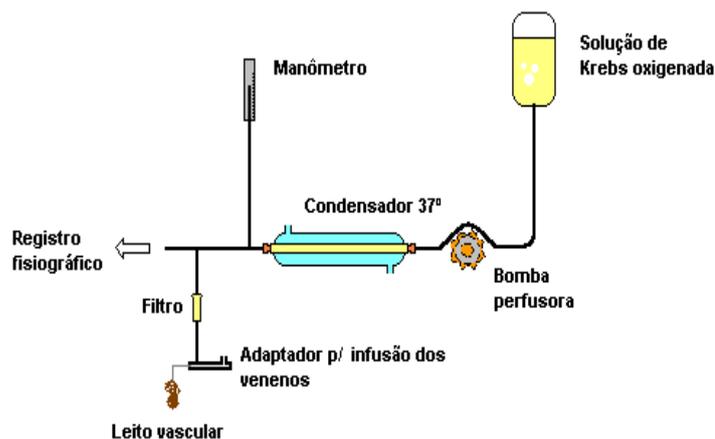


Figura 6 - Desenho esquemático do sistema de perfusão de leito vascular mesentérico
Fonte: Braga (2006)

4.4 Avaliação da nefrotoxicidade

4.4.1 Perfusão renal

Ratos Wistar machos, pesando entre 250-350g foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg) e preparados para nefrectomia. Injetou-se 3ml de manitol a 20 % na veia femoral, com intuito de melhorar o acesso cirúrgico ao ureter. Após anti-sepsia do abdômen, realizou-se a incisão com base na linha Alba, o ureter foi isolado e canulado com tubo de polietileno (PE₅₀), a artéria renal foi canulada e a mesentérica superior ocluída em seu lado direito e pinçada no seu lado esquerdo. Com pequeno corte em seu tecido introduzimos a cânula por 3 a 5 mm e fixou-se a cânula à artéria. Logo a seguir, o órgão foi isolado com pinças e seccionado, promovendo a retirada do rim e ureter.

Os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo albumina bovina 6g%: NaCl 138g, KCl 7g, NaH₂PO₄ · H₂O 3,2g, MgSO₄ · 7 H₂O 5,8g e Uréia 10g. 48 horas antes dos experimentos, 100mL desta solução foi separada e acrescidos

$\text{NaHCO}_3 = 4,2\text{g}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} = 0,74\text{g}$, glicose = 2g, e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000mL com água bidestilada. Foi retirado 300mL desta solução, na qual foi adicionada albumina bovina (6g%). Em seguida, solução com albumina foi dialisada, com objetivo de retirar substâncias contaminantes. Nos demais grupos foram utilizados os mesmos procedimentos do grupo controle até os 30 minutos de perfusão, após este período foi adicionado em 100 ml da solução, contendo o veneno ou suas frações liofilizadas (diluídos em 1 ml de solução salina 0,9%) e adicionadas ao sistema, ficando com a dosagem final de 0.03,0.3 e 3 $\mu\text{g/ml}$.

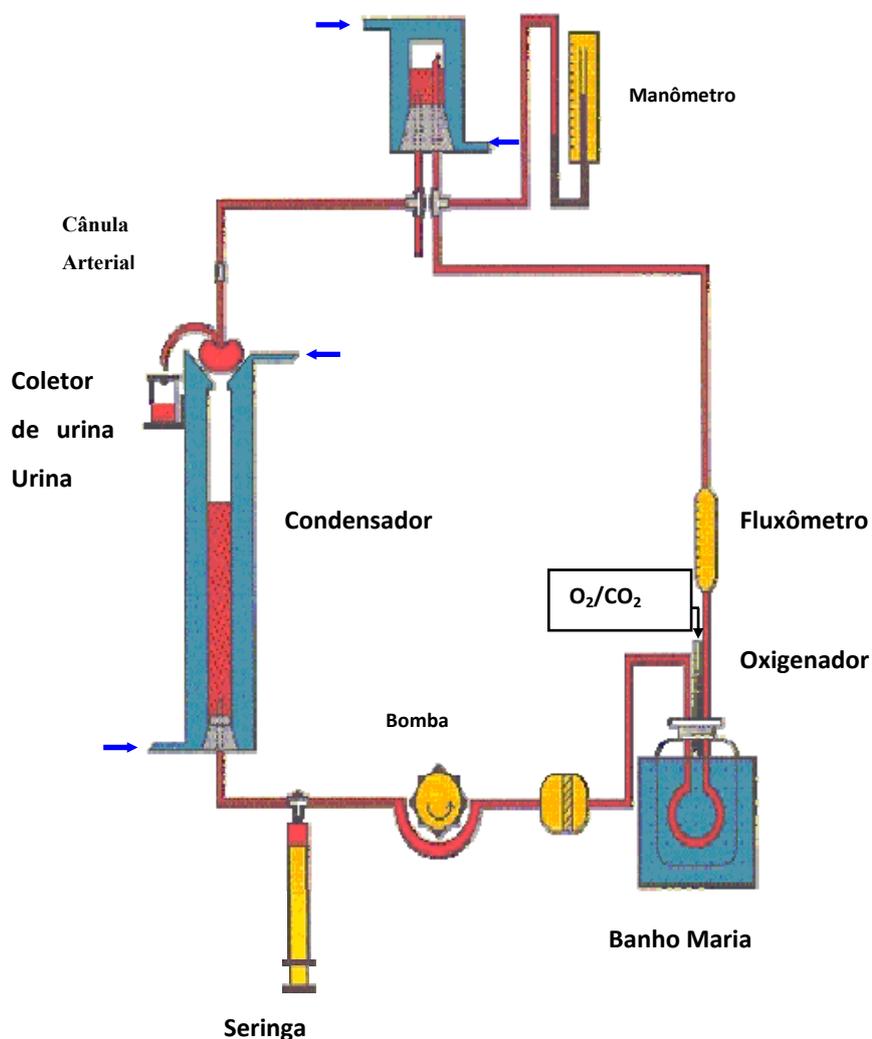


Figura 7 - Representação gráfica do sistema de perfusão de rim isolado com recirculação

Os experimentos foram iniciados após a adaptação do órgão ao sistema de perfusão num tempo de aproximadamente 20 minutos. O tempo total de perfusão do órgão foi de 120 minutos. Durante esse período, foram observadas as medidas do fluxo e pressão de perfusão.

4.4.1.1 Avaliação bioquímica de perfusatos e urinas

Foram realizados testes bioquímicos de dosagem de sódio e potássio, pelo método de fotometria de chama (Flame photometer - modelo 443IL). As dosagens de cloro foram realizadas seguindo o método descrito pelo kit do fabricante Labtest. A inulina foi dosada a partir do mesmo material, através de hidrólise direta. Finalmente foi medida a osmolaridade das amostras com um osmômetro (vapor Pressur osmometer - modelo 5100c ESCOR). Todas as análises bioquímicas foram realizadas na Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará.

4.4.1.2 Cálculo dos parâmetros funcionais renais

Foram utilizadas as seguintes fórmulas para determinação dos parâmetros funcionais renais :

1. **FU (mL.g⁻¹. min⁻¹) = Fluxo urinário** $FU = (\text{Peso do volume urinário} / \text{Peso do rim esquerdo}) \times 10$ (admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água)
2. **PP (mmHg) = Pressão de perfusão.** Leitura em manômetro
3. **RFG (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Ritmo de filtração glomerular** $RFG = (\text{DOU in} / \text{DOP in} \times FU)$ onde DOU in = densidade ótica da inulina na urina e DOP in = densidade ótica da inulina no perfusato
4. **FPR (mL.g⁻¹.min⁻¹) = Fluxo de perfusão renal** (registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo)
5. **RVR (mmHg/mL.g⁻¹.min⁻¹) = Resistência vascular renal** $RVR = PP \text{ (mmHg)} / FPR$
6. **FNa⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Sódio filtrado** $FNa^+ = RFG \times PNa^+$ (PNa^+ = Concentração de sódio no perfusato)
7. **ENa⁺ (μEq.g⁻¹. min⁻¹) = Sódio excretado** $ENa^+ = FU \times UNa^+$ (UNa^+ = Concentração de sódio na urina)

8. $TNa^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Sódio transportado } TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$
9. $\%TNa^+ = \text{Percentual de sódio transportado } \%TNa^+ = TNa^+ \times 100 / FNa^+$
10. $Cosm (mL.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Clearance osmótico } [Uosm / Posm] \times FU$ (onde $Uosm =$ Osmolaridade urinária e $Posm =$ Osmolaridade do perfusato)
11. $FK^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Potássio filtrado } FK^+ = RFG \times PK^+$ ($PK^+ =$ concentração de potássio no perfusato)
12. $EK^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Potássio excretado } EK^+ = FU \times UK^+$ ($UK^+ =$ Concentração de potássio na urina)
13. $TK^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Potássio transportado } TK^+ = FK^+ \times EK^+$
14. $\%TK^+ (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Percentual de potássio transportado } \%TK^+ = TK^+ \times 100 / FK^+$
15. $TCl^- (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Cloro transportado } TCl^- = FCl^- \times ECl^-$
16. $\%TCl^- (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Percentual de cloro transportado } \%TCl^- = TCl^- \times 100 / FCl^-$

4.5 Avaliação da neurotoxicidade

4.5.1 Nervo Frênico de Diafragma de ratos (BULBRING, 1946)

Ratos machos, Wistar, pesando entre 250 e 350 g depois de submetidos à anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg), foram intubados para ventilação mecânica e submetidos a cirurgia para excisão do hemidiafragma e nervo frênico (Bülbring, 1946). Após incisão da linha Alba a cavidade torácica, nervo frênico foi isolado com auxílio de uma pinça de vidro, da inserção no diafragma até a base do coração. O hemidiafragma esquerdo e o nervo frênico foram isolados e montados em banhos para registro isométrico. Após estabilização em solução de Krebs-Henseleit (pH da solução ajustado para 7,4 e equilibrado com 95% O₂ – 5% CO₂ a uma temperatura de 37° C) e concentração final de sais no tampão de (mmol/l): NaCl 113.8, NaHCO₃ 22.0, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 7 H₂O 1.1, CaCl₂ 2 H₂O 2.5, e glicose 11. O nervo foi estimulado com pulsos submáximos de onda quadrada (0,2 ms: 0,1 HZ) por estimulador GRASS (Grass, Quincy, Massachusetts, USA). Curvas dose- resposta (0.01 a 300 µg/ml) do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* foram obtidas.

4.5.2 Canal deferente de camundongos

Camundongos swiss albinos, machos, pesando de 30-35 g foram sacrificados por deslocamento cervical. Realizou-se incisão abdominal média com dissecação de ambos os canais deferentes a partir da cauda do epidídimo até a próstata. Um segmento de aproximadamente 1 cm de comprimento, livre de tecido adiposo, foi retirado de cada porção prostática. Ambos os fragmentos foram montados verticalmente em banhos isométricos sob tensão de 0.25g em cuba orgânica de 5 ml de volume contendo solução de Krebs-Henseleit livre de Mg^{2+} , com pH 7.4, com seguinte composição: NaCl 118 mM, KCL 4.75 mM, $CaCl_2$ 54mM, KH_2POH_4 0,93mM, $NaHCO_3$ 24mM, Glicose 11mM, EDTA 0,027mM. e ácido ascórbico 0,1 mM. O meio foi mantido a 37 °C e aerado com 95% O_2 e 5% CO_2 . Os tecidos foram submetidos por campo elétrico transmural 20V, 0,4Hz e 0,5ms.

O veneno bruto de *Bothrops marajoensis* e suas frações PLA₂ (tipo 1 e tipo 2) e lectina foram testados de forma isolada, nas doses de (10ng a 30µg/ ml) adicionados de forma crescente. As fosfolipases também foram analisadas associadas para avaliar um possível efeito sinérgico. Em outro ensaio Ioimbina (10µM) foi adicionada ao banho na resposta máxima do efeito causado pelo veneno. Num terceiro experimento avaliou-se a possibilidade de efeito pós-sináptico através da contração obtida por noradrenalina (NA; 10µM), ATP (30 µM) ou carbacol (Cch; 10 µM) em Krebs normal e enriquecido com guanetidina 10µM e fentolamina 100µM.

4.6 Análises estatísticas

Os resultados foram mostrados como média ± erro padrão em cada grupo. Diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando teste *t* de Student ou Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni considerando-se como ponto de corte uma probabilidade de ocorrência da hipótese nula de 5% ($p < 0,05$).

4.7 Aspectos éticos

Este Projeto foi devidamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará, atendendo a todas as normas de cuidados com animais.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da toxicidade Cardiovascular

5.1.1 Pressão Arterial

A resposta pressora do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* utilizando as doses de 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, demonstrou uma diminuição da pressão arterial média (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $31,6 \pm 5,3$ mmHg) e da frequência cardíaca (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $66,9 \pm 5,4$ bpm), sem alterações significativas na frequência respiratória (figuras 8, 9 e 10 respectivamente). Os mesmos experimentos realizados em ratos atropinizados (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de atropina) demonstraram a permanência da queda pressórica (figura11) e da frequência cardíaca (figura12). A variação da pressão arterial média com veneno foi de $-73,9 \pm 15,6$ mmHg; dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e em ratos atropinizados $-72,9 \pm 11,7$ mmHg, na mesma dose. A frequência cardíaca registrada na maior dose do veneno bruto (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foi de $66,9 \pm 15$ bpm e $67,7 \pm 17$ bpm nos animais atropinizados. Não houve alteração na frequência respiratória nos ratos atropinizados ($97,9 \pm 9,6$ mim veneno bruto, com atropina $98.3\% \pm 7.4$ mim) (figura13).

As respostas pressóricas obtidas com a administração de duas fosfolipases (PLA₂ tipo 1 e tipo 2) isoladas do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* demonstraram que ambas reduziram a pressão arterial média (figuras 14 e 17) e a frequência cardíaca (figuras 15 e 18), sem alterações significativas na frequência respiratória (figuras 16 e 19). Porém a fosfolipase tipo1 demonstrou uma ação depressora mais intensa tanto na frequência cardíaca (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 65 ± 5 b.p.m) como na pressão arterial média (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $30,3 \pm 3,4$ mmHg) quando compara a fosfolipase tipo 2 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $45,4 \pm 5,4$ mmHg; $76,8 \pm 5,4$ b.p.m). A adição das duas fosfolipases no mesmo ensaio não demonstrou ação sinérgica ou aditiva.

A administração de uma lectina extraída do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* utilizando as doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ demonstrou ação depressora da frequência cardíaca (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ $82,9 \pm 9,6$ b.p.m) e da pressão arterial média ($35,6 \pm 8,1$ mmHg) sem alterações significativas na frequência respiratória (controle: $32,09 \pm 0,9$ movimentos inspiratórios por minuto; Bmj:300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $35,6 \pm 8,1$ movimentos inspiratórios por minuto) (figuras 20, 21 e 22 respectivamente).

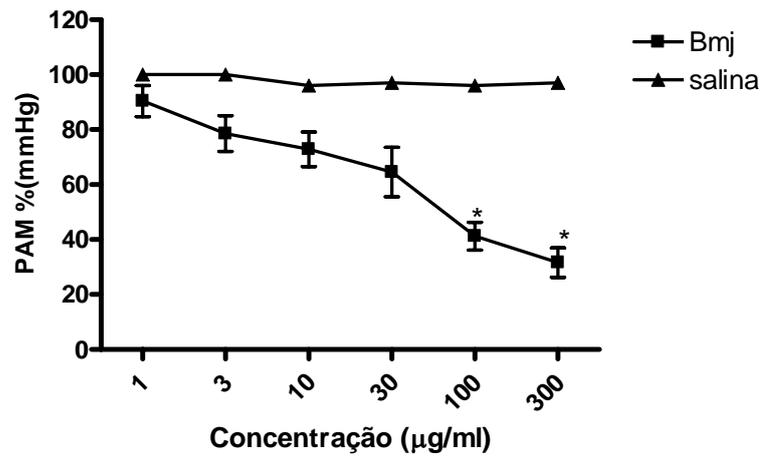


Figura 8 – Efeito na pressão arterial média em ratos tratados com o veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) utilizado nas doses 1, 3, 10, 30, 100 e 300 µ g/kg. *p<0.05, (n=6).

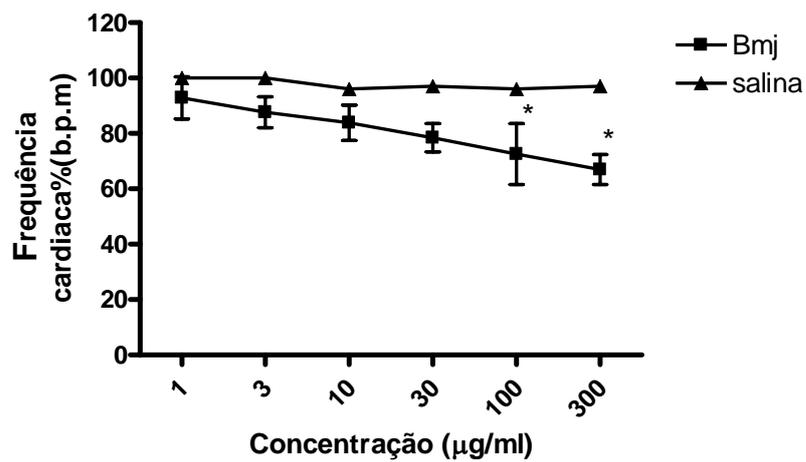


Figura 9 - Frequência cardíaca em ratos tratados com veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) utilizado nas doses de 1,3,10, 30, 100 e 300 µ g/kg. *p<0.05,(n=6).

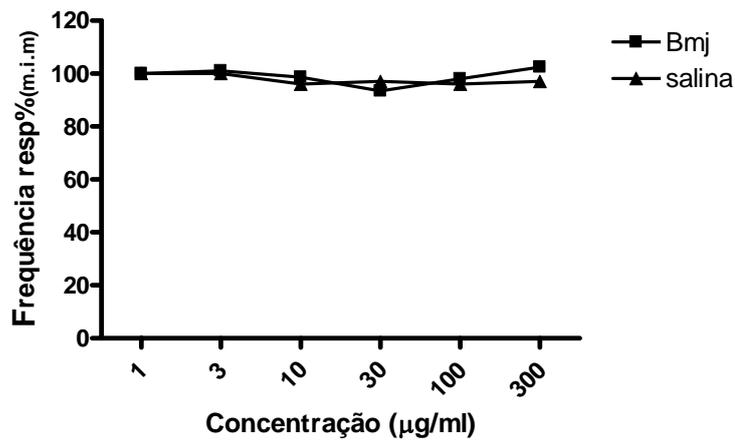


Figura 10 - Avaliação da frequência respiratória em ratos tratados com veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) utilizado nas doses de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg . *p<0.05, (n=6).

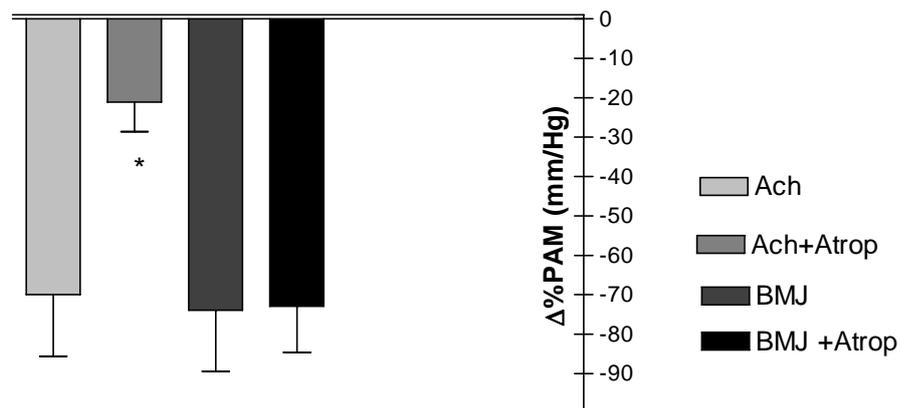


Figura 11 - Variação da pressão arterial média em ratos atropinizados, 1µg/kg de atropina, após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) na dose de 100 µg/kg . *p<0.05, (n=6).

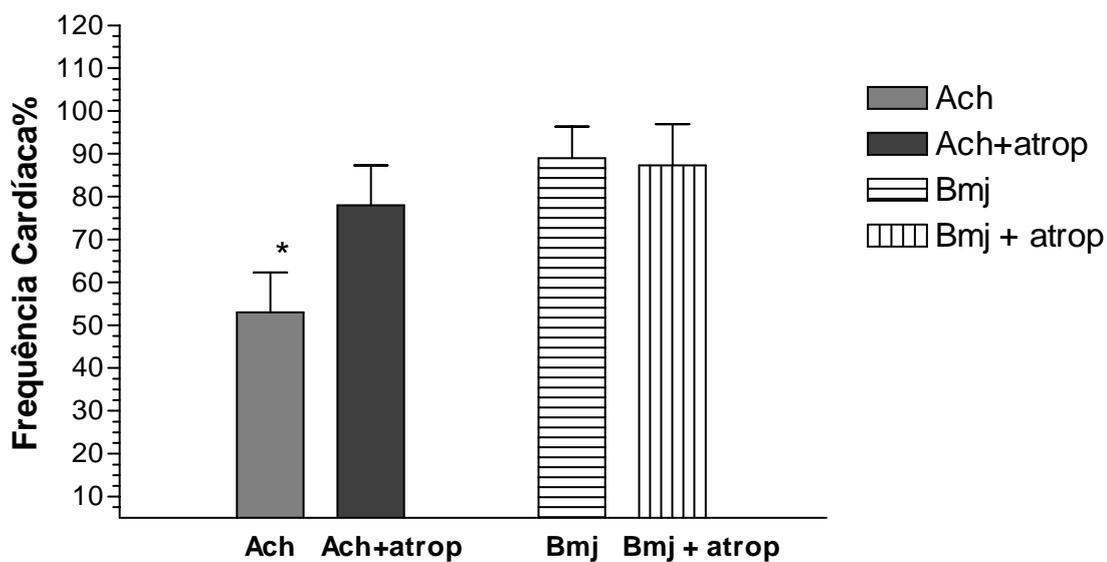


Figura 12 - Avaliação da frequência cardíaca em ratos atropinizados, 1µg/kg de atropina, após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) utilizado na dose de 100 µg/kg . *p<0.05, (n=6).

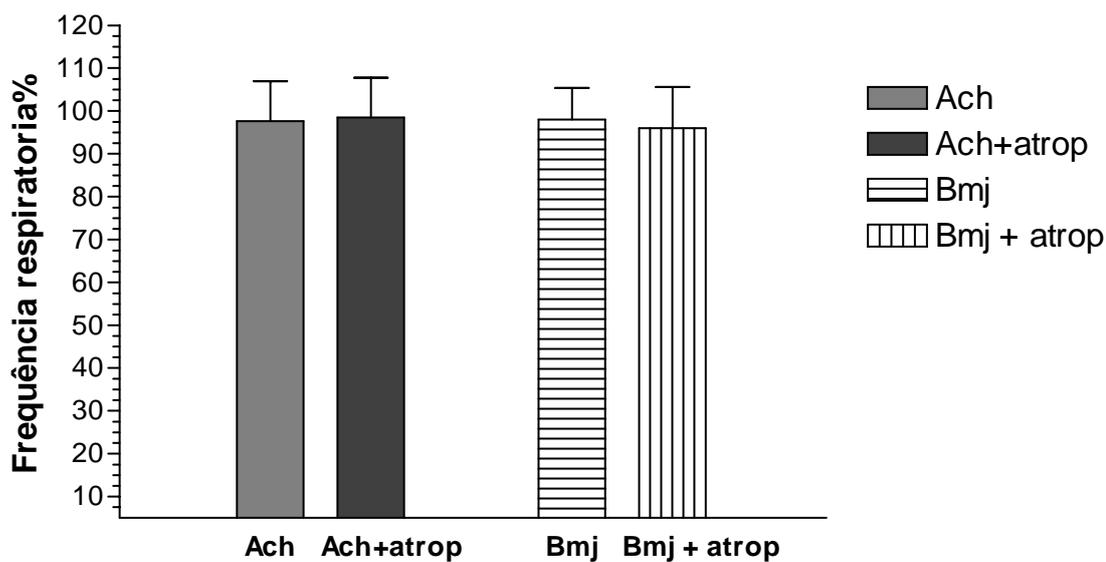


Figura 13 - Avaliação da frequência respiratória em ratos atropinizados, 1µg/kg de atropina, após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) utilizado na dose de 100 µg/kg. *p<0.05, (n=6)

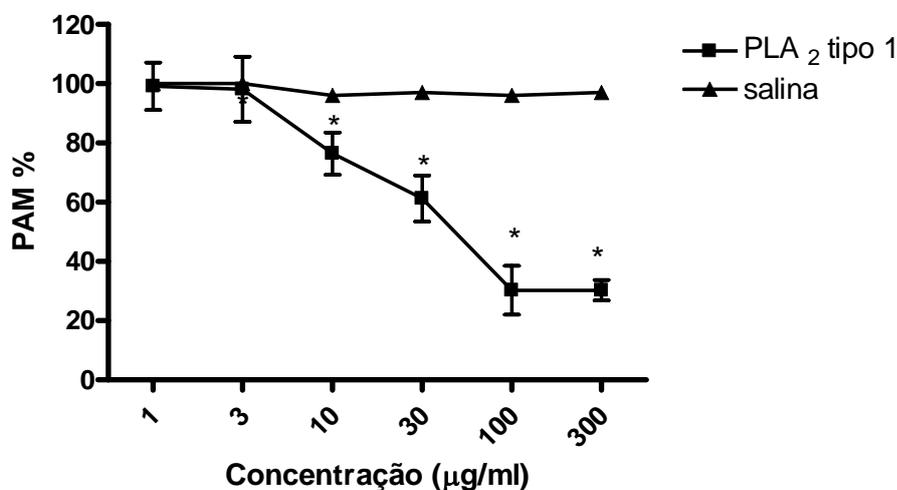


Figura 14 - Avaliação da pressão arterial média em ratos após administração da fosfolipase tipo 1 (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. *p<0.05, (n=6)

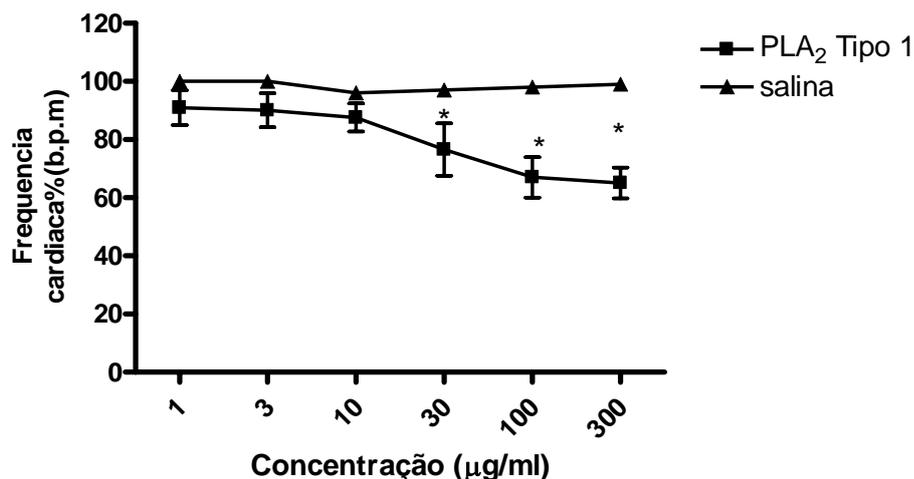


Figura 15 - Avaliação da frequência cardíaca em ratos após administração da fosfolipase tipo 1 (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. *p<0.05, (n=6)

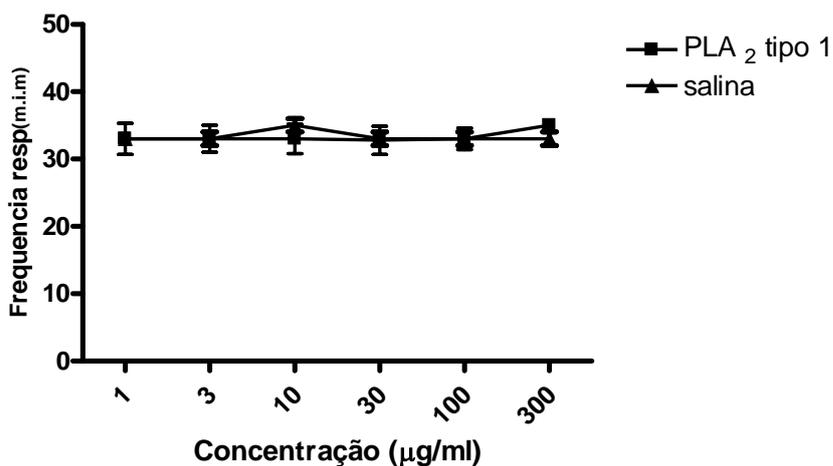


Figura 16 - Avaliação da frequência respiratória em ratos após administração da fosfolipase tipo 1 (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. *p<0.05, (n=6)

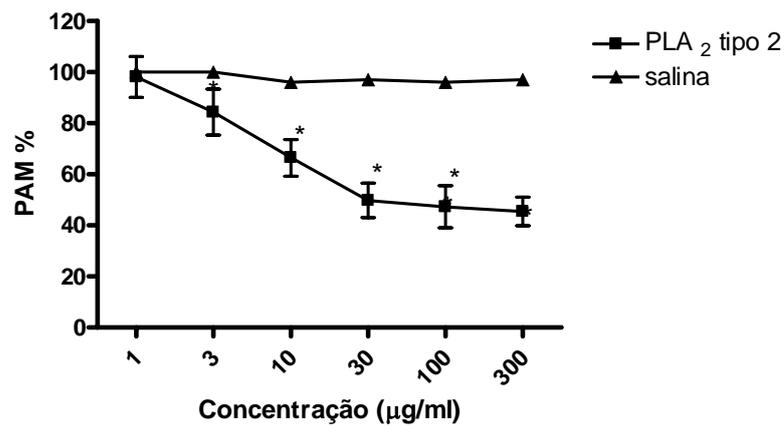


Figura 17 – Avaliação da pressão arterial média em ratos após administração da fosfolipase tipo 2 (1 ,3 ,10 ,30 ,100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. *p<0.05,(n=6)

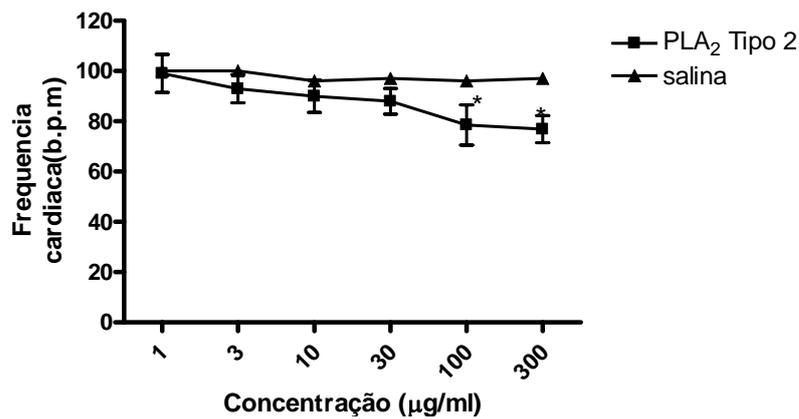


Figura 18 – Avaliação da freqüência cardíaca em ratos após administração da fosfolipase tipo 2 (1, 3 ,10 ,30 ,100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. *p<0.05 ,(n=6)

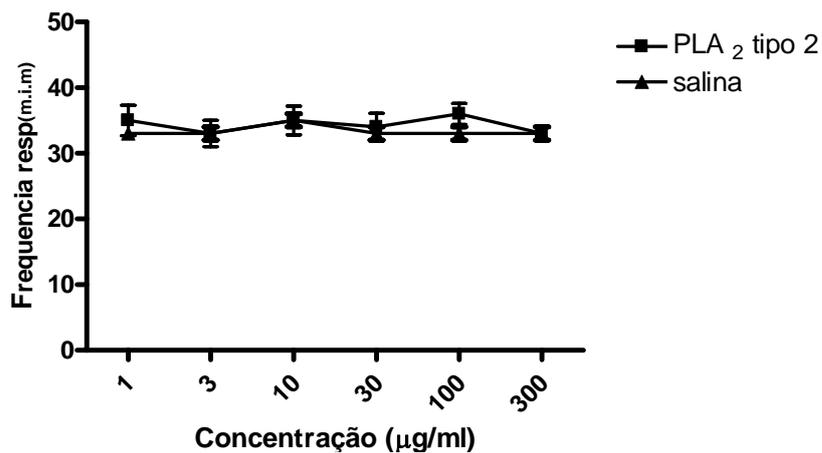


Figura 19 - Avaliação da freqüência respiratória em ratos após administração da fosfolipase tipo 2 (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. * $p < 0.05$, (n=6)

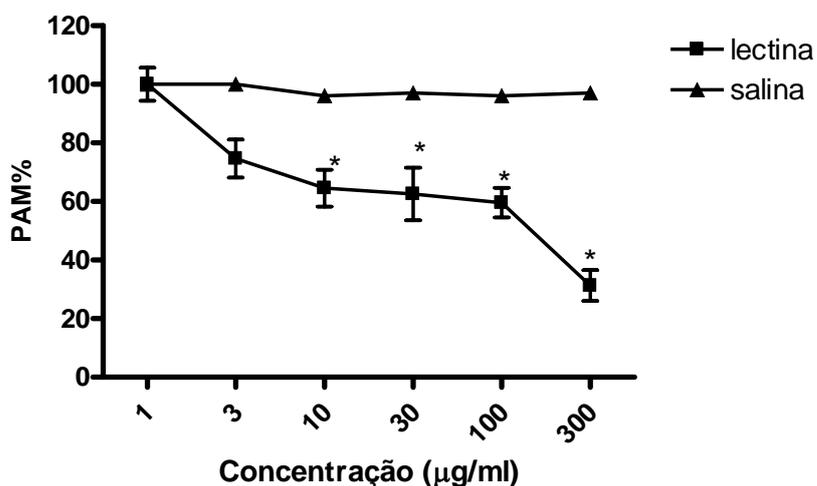


Figura 20 - Avaliação da pressão arterial média em ratos após administração da lectina (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. * $p < 0.05$, (n=6).

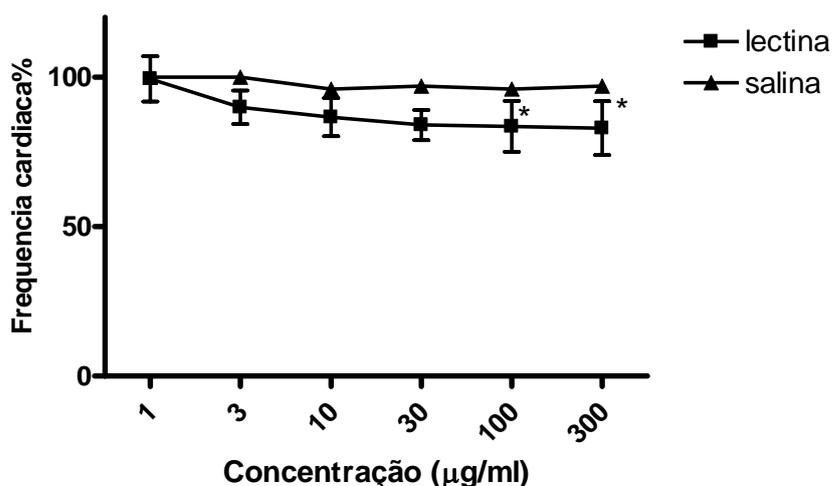


Figura 21 - Avaliação da frequência cardíaca em ratos após administração da lectina (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. *p<0.05, (n=6)

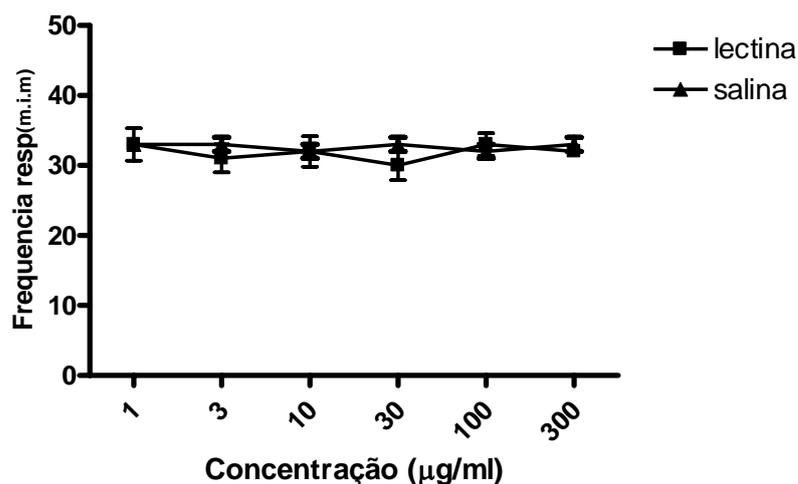


Figura 22 - Avaliação da frequência respiratória em ratos após administração da lectina (1,3, 10, 30, 100 e 300 µg/kg) isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. *p<0.05, (n=6)

5.1.3 Perfusão de Coração Isolado

Após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* utilizado nas doses de 0,1, 0,3, 1, 10 e 30 µg/mL, na perfusão de coração isolado de ratos observou-se uma diminuição na força de contração miocárdio ($31.7 \pm 13.2\%$) (figura 23), acompanhada de um aumento da pressão de perfusão ($27.5\% \pm 3.6$ a $92.7\% \pm 24$ mmHg), (figura 24) sem alterações no fluxo coronariano (figura 25).

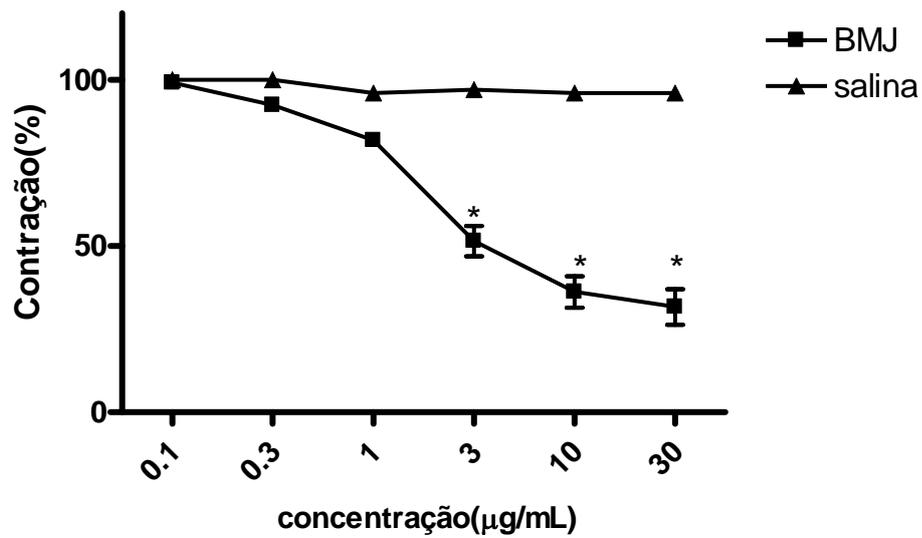


Figura 23 - Força de contração miocárdio, após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (BMJ) nas doses de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 e 30 µg/mL, na perfusão de coração isolado de ratos * $p < 0.05$, (n=6)

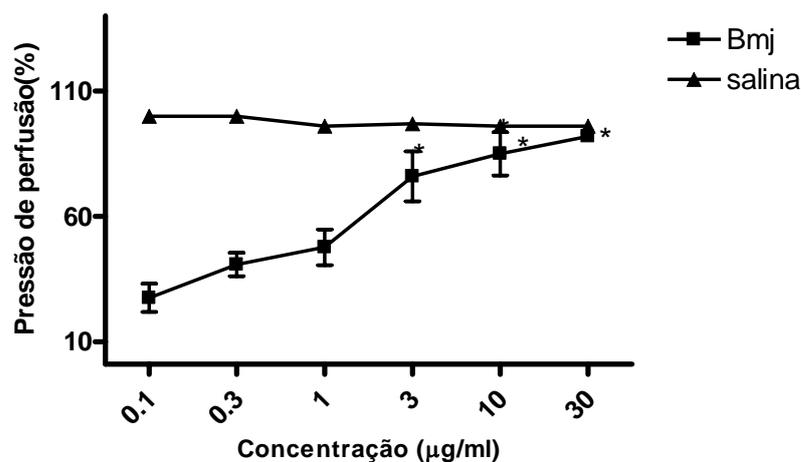


Figura 24 - Pressão de perfusão após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) nas doses de 0,1, 0,3, 1,3 ,10 e 30µg/mL, na perfusão de coração isolado de ratos *p<0,05,(n=6).

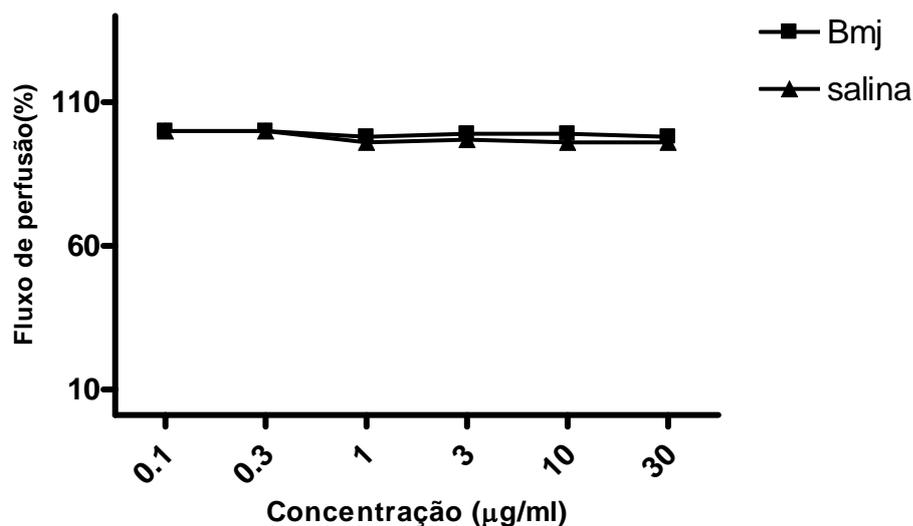


Figura 25 - Fluxo de perfusão coronariano após administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) nas doses de 0,3, 1, 3,10,30 e 100µ g/kg, na perfusão de coração isolado de ratos *p<0,05,(n=6)

5.1.3 Átrio isolado

Avaliação da atividade do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* nas doses de 0,3, 1, 3,10 e 30 µg/ml em átrio isolado de ratos demonstrou alterações significativas de nos parâmetros avaliados. A frequência cardíaca reduziu para (62,9% ±3,7 , Bmj a 30 µg/mL). A amplitude da contração atrial reduziu de 11,5±1,1 cm para 6,2±1,3cm (Bmj a 30 µg/mL). (figura 26).

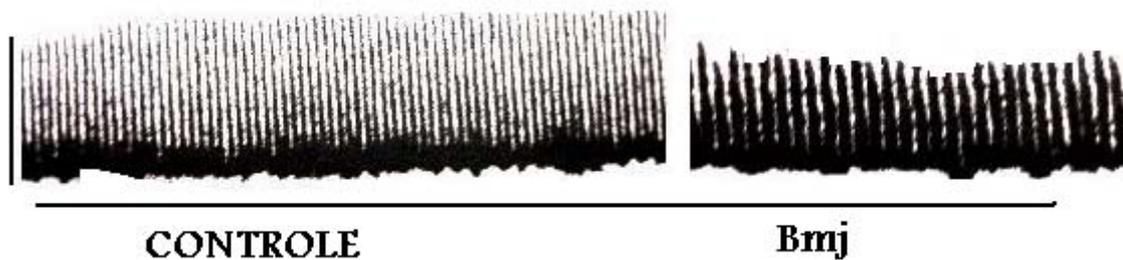


Figura 26 - Redução da amplitude de contração. Registro perfusão átrio isolado, antes (controle) e depois da administração de Bmj na dose de 30 $\mu\text{g/mL}$.

5.1.4 Atividade eletrocardiográfica

A injeção endovenosa com o veneno bruto de *Bothrops marajoensis* em ratos provocou um bloqueio átrio ventricular gradual até um bloqueio completo (figura 27 B e tabela 2). A relação da frequência atrial e frequência ventricular durante o bloqueio são de 2/1. Os dados brutos das ondas, complexos, intervalos de segmentos do eletrocardiograma estão demonstrados na tabela 2. Observou-se também a presença de Flutter atrial (67% por repetição); Hiperpolarização tardio e complexo QRS invertido indicando arritmia e dificuldade de condução atrial. Aumento significativo nos intervalos PP e RR, indicam diminuição da frequência cardíaca.



Figura 27 A - Registro do eletrocardiograma em ratos antes da administração das drogas. (controle)



Figura 27 B - Registro do eletrocardiograma em ratos após a administração veneno bruto na dose de *Bothrops marajoensis* dose 100 µg/kg .

Tabela 1 - Dados brutos das ondas, complexos, intervalos de segmentos do eletrocardiograma após a injeção endovenosa com o veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 100µ/kg, em ratos.

Parâmetros	Controle	salina	BMJ
Intervalo PP (mm)	208 ±6.2	208± 22.64	457±0.7*
Intervalo RR (mm)	182 ±10.69	182 ±6.12	414±0.7*
QRS duração(ms)	98 ± 8.12	97.9 ±1.1	101±9.7
QRS Amplitude(mm)	5.8 ±0.8	5.5 ±0.6	5.5 ±1.2
Intervalo QTc	14 ±0.53	13.9 ±0.2	12.6 ±0.9
OndaP Amplitude(A)	0.2 ±0.032	0.18 ±0.05	0.21±0.2
Intervalo PR(mm)	66 ±0.8	66 ±0.9	89 ±1.6 *

Nota: Aumento significativo no intervalo PP e RR, indicando diminuição da frequência cardíaca. Aumento intervalo PR demonstrando bloqueio de condução.*Bmj vs controle (p<0,05; ANOVA seguida de correção de teste de Bonferroni).Dados expressos como média ± erro padrão.

5.1.5 Perfusão em leito vascular mesentérico

A administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* nas doses de 3, 30, e 300 $\mu\text{g/mL}$ não produziu alterações significativas tanto no fluxo quanto na pressão de perfusão (figuras 28 e 29).

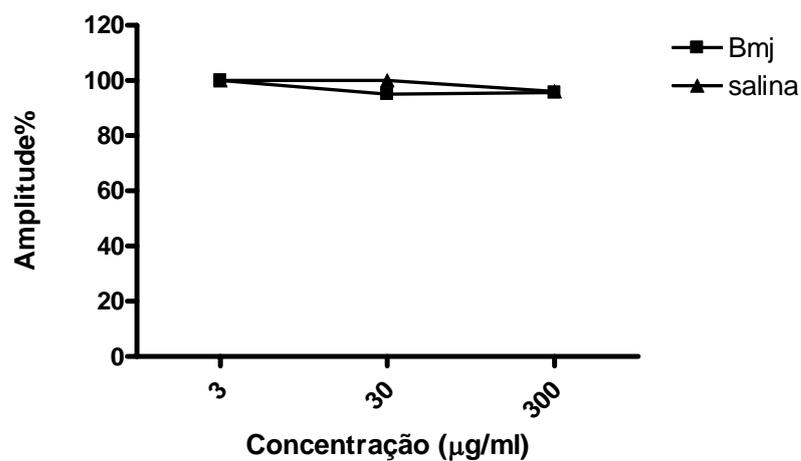


Figura 28 - Efeito do Veneno bruto de *Bothrops marajoensis* nas doses 3, 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$ em leito vascular mesentérico pré- contraído com fenilefrina. Resultados expressos em média \pm EPM.

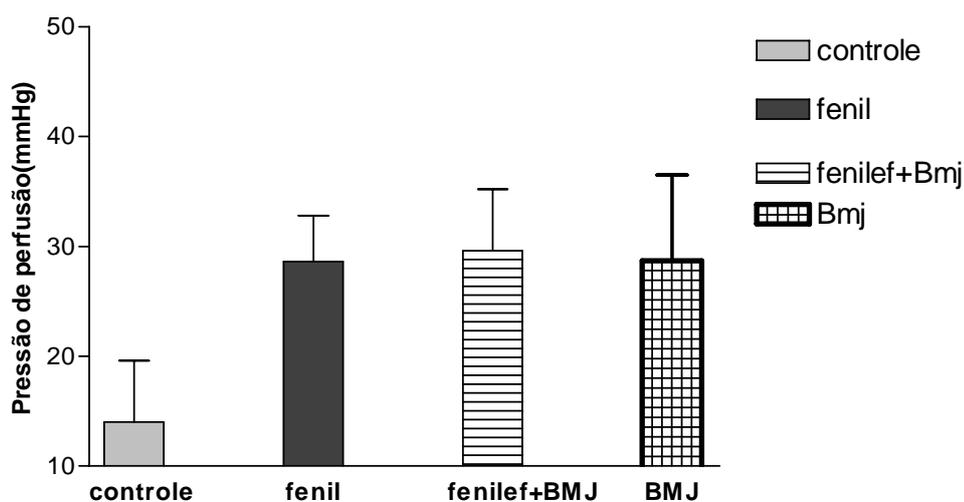


Figura 29 - Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 300 µg/mL em leito vascular mesentérico précontraído com fenilefrina. Resultados expressos em média ±EPM.

5.2 Avaliação da nefrotoxicidade

5.2.1 Perfusão renal

A administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (na doses de 3 µg/mL) no sistema de perfusão renal em ratos demonstrou um decréscimo significativo dos parâmetros vasculares a partir dos 90 min. Ocorreu aumento do fluxo nos 120 min. (figuras 30 e 31). A pressão de perfusão decaiu para $75,1 \pm 4,5$ mmHg em comparação com o controle $109,11 \pm 5,1$ mmHg. A resistência vascular renal teve um decréscimo de 64% em comparação ao controle ($C_{90} = 5,6 \pm 0,4$ mmHg; $Bmj_{90} = 3,6 \pm 0,22$ mmHg). Os parâmetros funcionais também tiveram um decréscimo. A partir dos 60 min. de perfusão o fluxo urinário decaiu até atingir os valores de $0,12 \pm 0,03$ mL/g/min., equivalente a 66.6% do controle ($C_{30} = 0,18 \pm 0,01$ mL/g/min.) (figura 32). O ritmo de filtração glomerular alterou de $C_{30} = 0,83 \pm 5,0$ mL/g/min. para $Bmj_{120} 0,33 \pm 0,8$ mL/g/min.; decréscimo de 40% com relação ao controle (figura 33). Os transportes de sódio e de cloreto apresentaram uma redução a partir dos 90 min. de perfusão, contudo, o transporte de potássio permaneceu sem alterações (figuras 34, 35 e 36).

A administração da fosfolipase tipo 1 nas dose de 3µg/mL, extraída do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* no sistema de perfusão renal apresentou resultados diferentes do veneno bruto. A pressão de perfusão, a resistência e o fluxo não apresentaram alterações

significativas (figuras 37, 38 e 39). Porém com decréscimo no transporte de sódio, cloreto e potássio (figuras 40, 41 e 42)

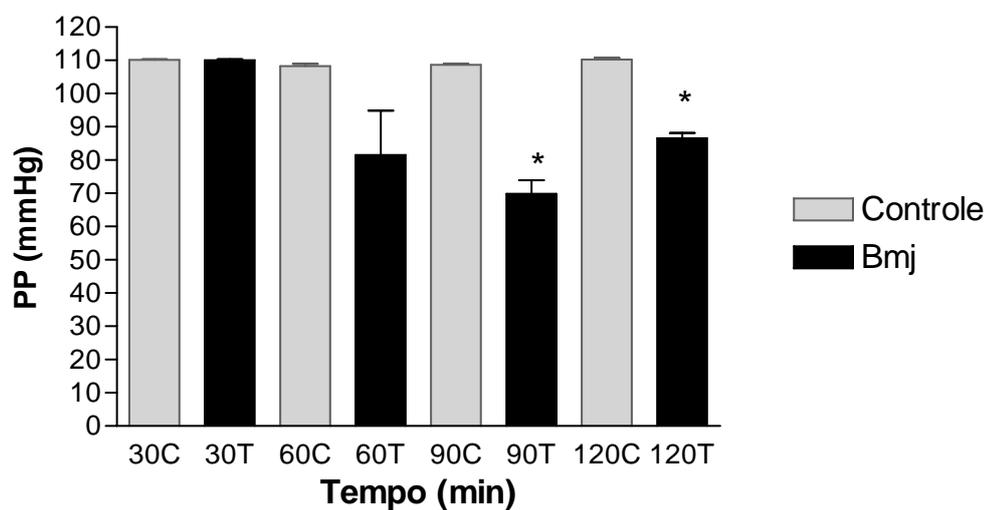


Figura 30 - Pressão de perfusão em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) na dose 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n=6$

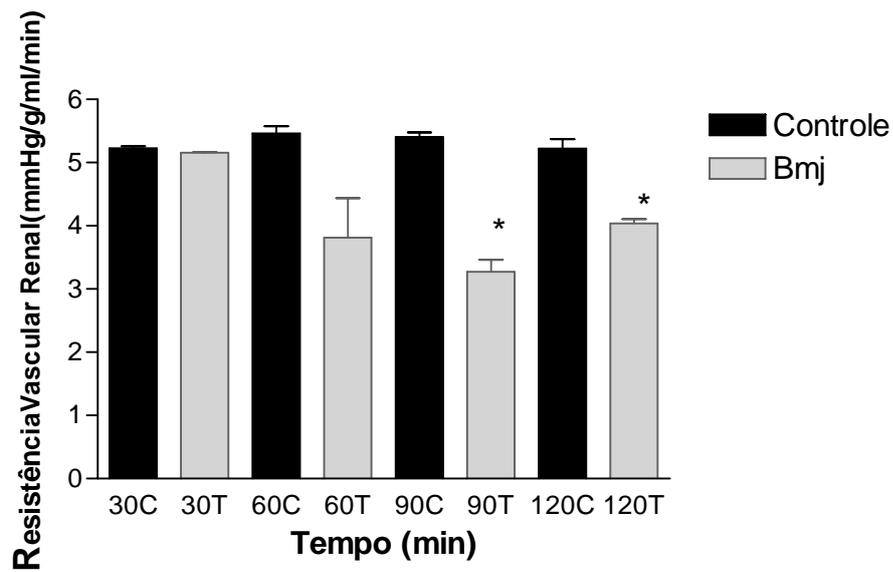


Figura 31 - Resistência vascular renal em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n=6$.

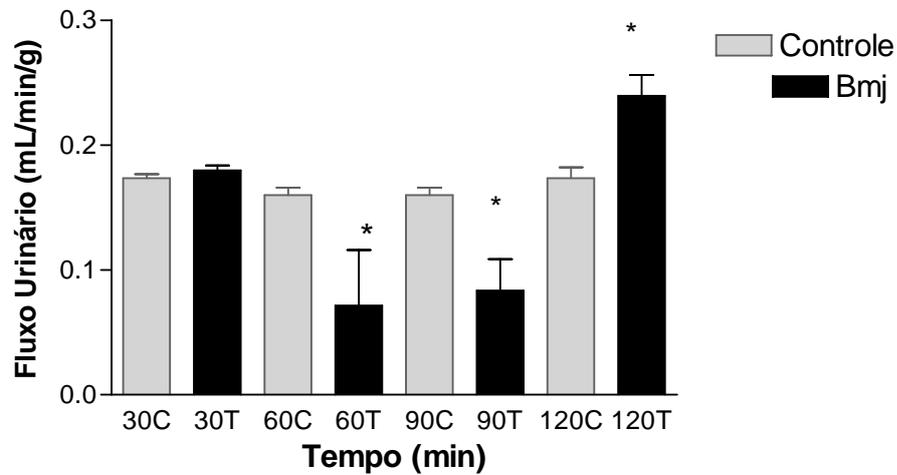


Figura 32 - Fluxo urinário em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n=6$.

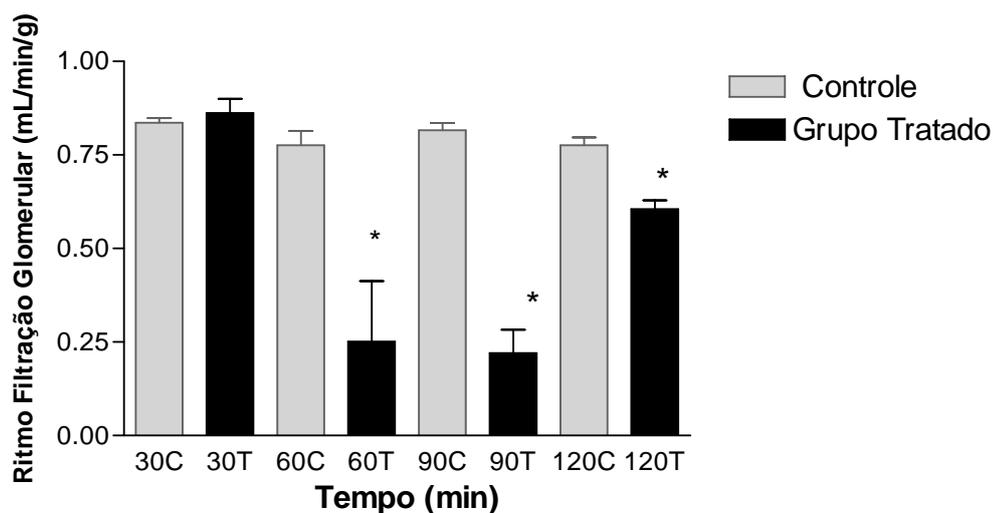


Figura 33 - Ritmo de filtração glomerular. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 3 μ g/mL. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n=6$.

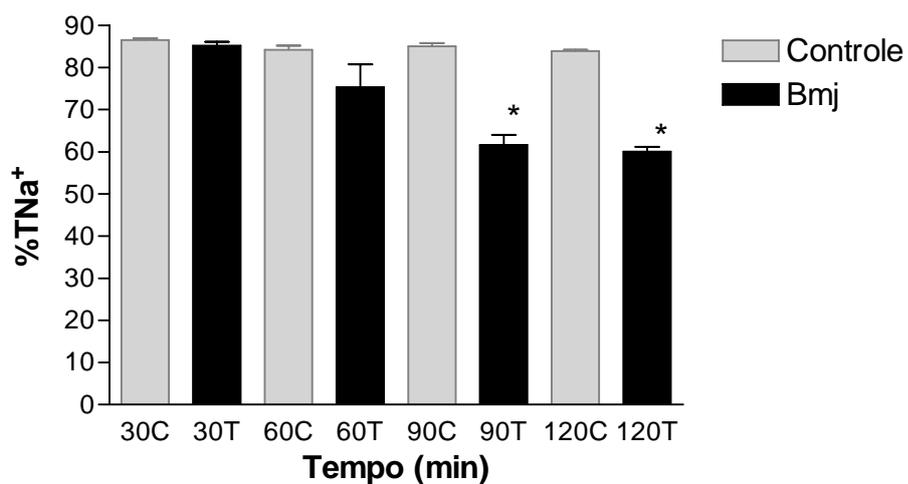


Figura 34 - Percentual transporte total de sódio em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 3 μ g/mL. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n=6$

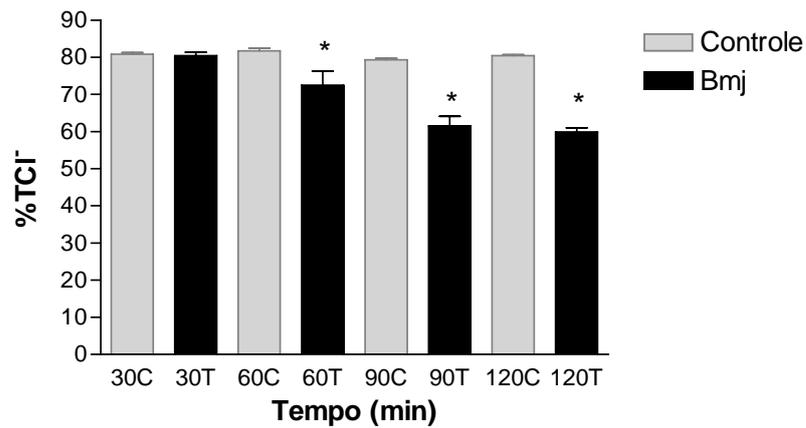


Figura 35 - Percentual transporte total de cloreto em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 3 µg/mL. Dados em média ±EPM. *p<0,05, n=6.

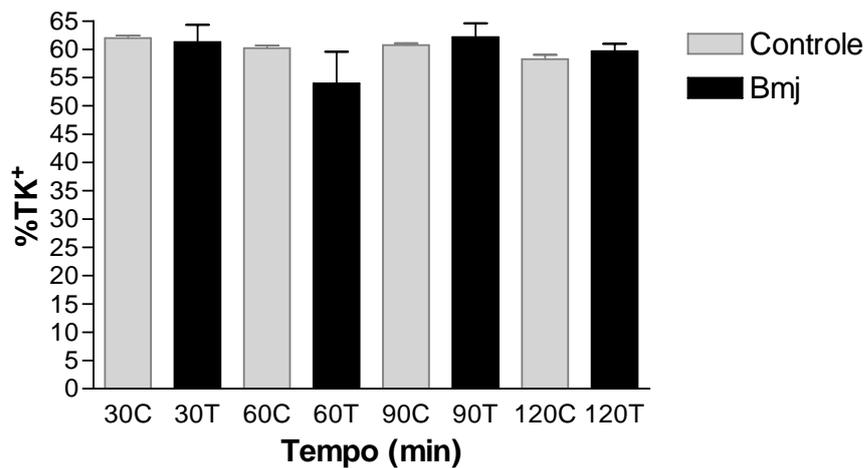


Figura 36 - Percentual transporte total de potássio em rim isolado de ratos. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na dose de 3 µg/mL. Dados em média ±EPM. *p<0,05, n=6.

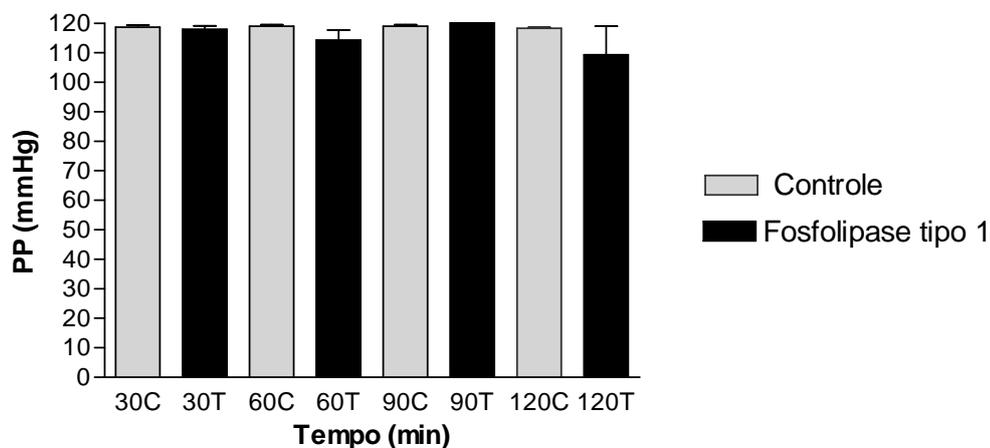


Figura 37 - Efeito da fosfolipase tipo 1 na dose 3 $\mu\text{g/mL}$, isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na pressão de perfusão renal de ratos. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n = 6$

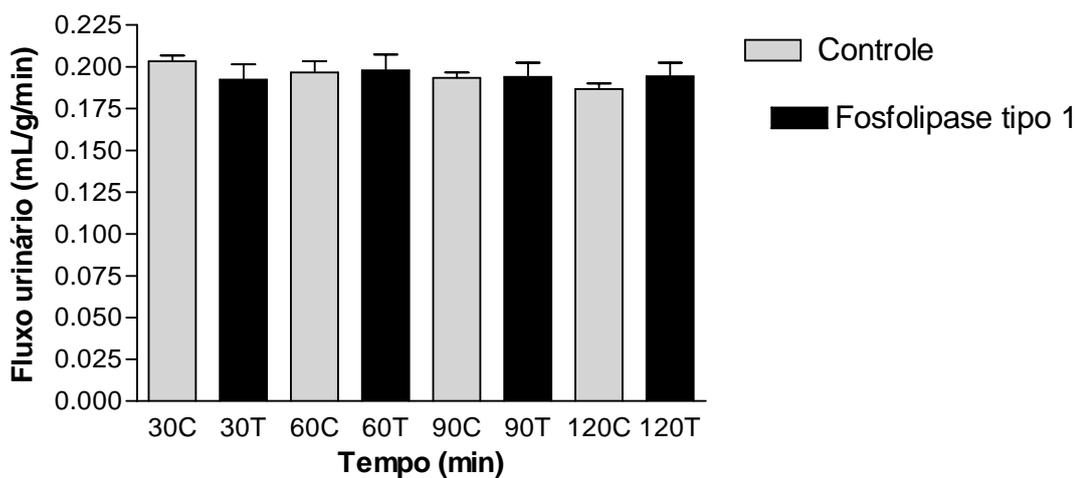


Figura 38 - Efeito da fosfolipase tipo 1, na dose 3 $\mu\text{g/mL}$, isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* no fluxo urinário. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n = 6$

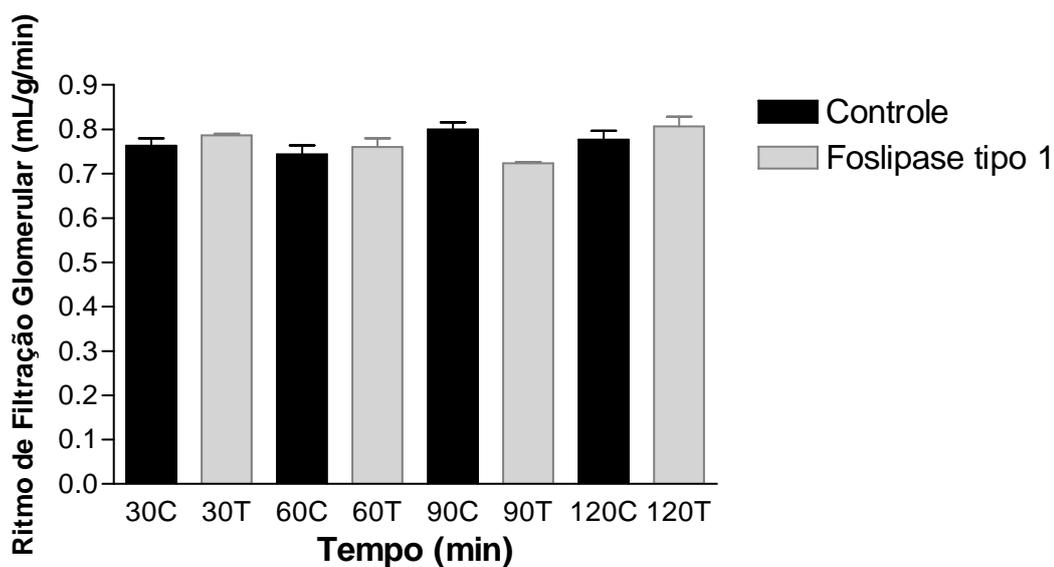


Figura 39 - Efeito da fosfolipase tipo 1, na dose 3 $\mu\text{g/mL}$, isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* no ritmo de filtração glomerular. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$, $n=6$

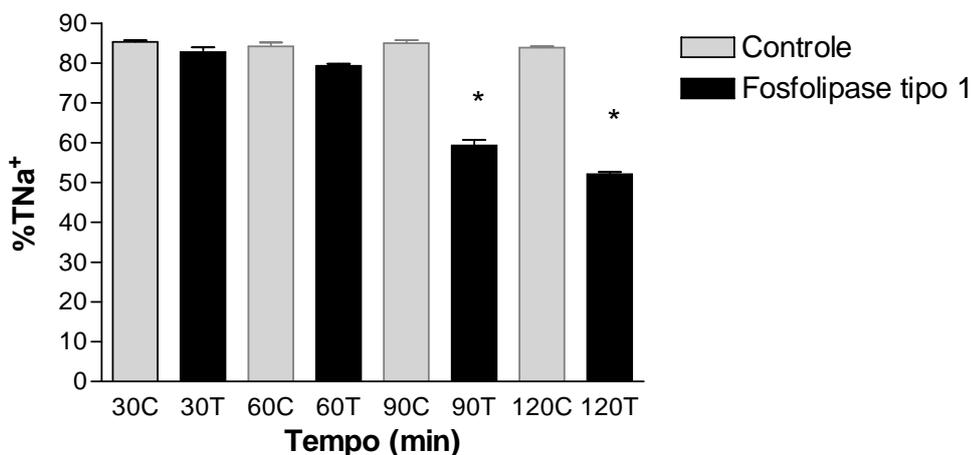


Figura 40 - Transporte de sódio. Efeito da fosfolipase tipo 1 na dose de 3 $\mu\text{g/mL}$, extraída do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na perfusão renal de ratos. Dados em média \pm EPM. * $p < 0,05$.

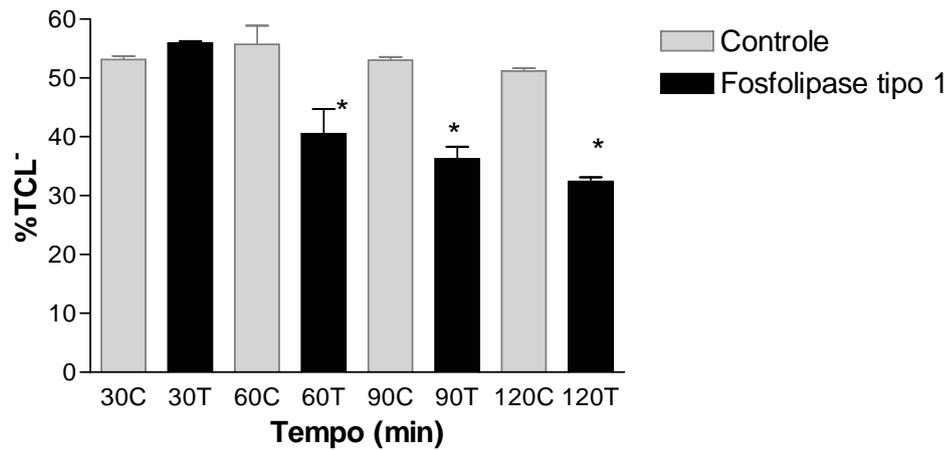


Figura 41 - Transporte de cloretos. Efeito da fosfolipase tipo 1 na dose de 3 µg/mL do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na perfusão renal de ratos. Dados em média ±EPM. *p<0,05.

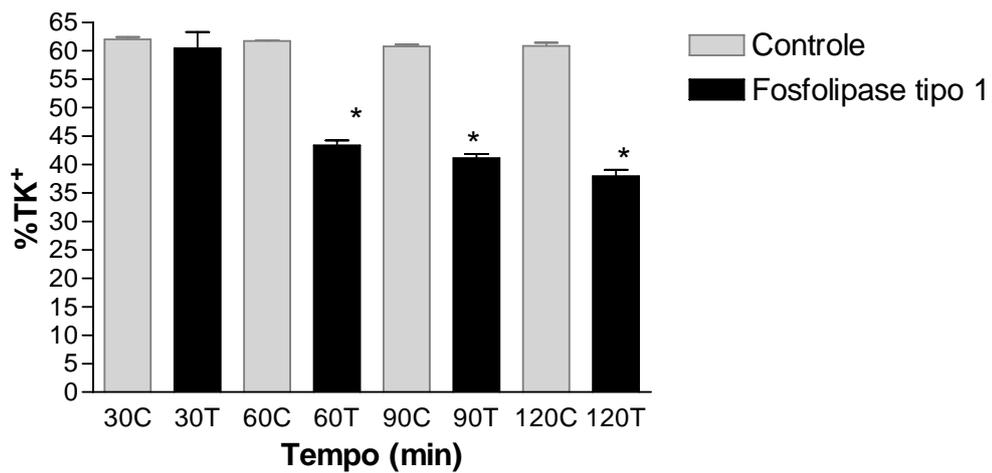


Figura 42 - Transporte de potássio. Efeito da fosfolipase tipo 1 na dose de 3 µg/mL do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* na perfusão renal de ratos. Dados em média ±EPM. *p<0,05.

5.3 Avaliações da neurotoxicidade

5.3.1 Nervo Frênico de Diafragma de ratos

A Administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* nas doses crescentes de 0,01 a 300µg/ml, no ensaio do nervo frênico em ratos, mostrou um bloqueio na força de contração dose dependente, com efeito significativo nas maiores doses (300 µg/mL $21,20 \pm 5,6$) (figura 43).

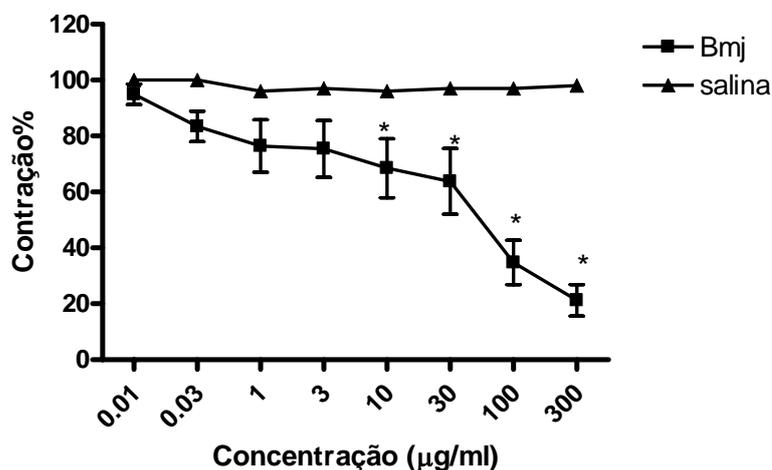


Figura 43 - Força de contração. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) doses crescente (0,01 a 300 µg/ml) em nervo frênico de rato estimulado por campo elétrico. (* $p < 0,05$) $n = 6$

5.3.2 Canal deferente de camundongos

O ensaio com o veneno bruto de *Bothrops marajoensis* no canal deferente de camundongos induziu a uma inibição dose dependente da contração estimulada por campo elétrico, com resposta máxima em $97,7 \pm 9,2 \%$ (figura 44). Este feito não foi revertido pela Ioimbina nem por naloxone. (figura 45 e 46, respectivamente). Em outro estudo a adição do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (10 µg/ml) inibiu a contração neurogênica de $68 \pm 8\%$ (figura 47-A) quando comparado com nenhuma queda significativa pela contração com Cch,

ATP ou NA (em Krebs normal ou enriquecido com guanetidina 10 μ M e fentolamina 100 μ M) (figuras 47-B; 47-C e 47-D, respectivamente).

As frações, PLA₂ (tipo 1 e tipo 2) demonstraram uma inibição da contração dose dependente, figuras 48 e 49, respectivamente. Porém a fosfolipase tipo 2 apresentou maior efeito (inibição de 97,3 \pm 0,3 %) em comparação com a fosfolipase tipo 1 (inibição de 73,3 \pm 6,5 %). As fosfolipases associadas não demonstraram efeito sinérgico (figura 50). A lectina nas doses de (0.01 a 30 μ g/ml) adicionados de forma crescente demonstrou uma inibição dose dependente da contração (inibição 72 \pm 7,4 %) (figura 51).

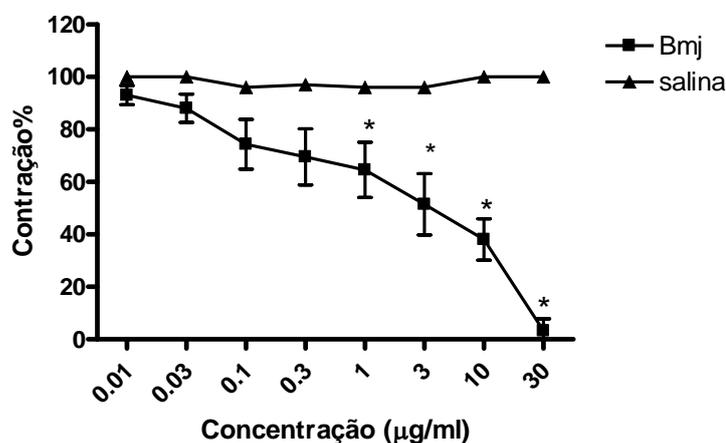


Figura 44 - Força de contração. Efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) em doses crescente (0,01 a 30 μ g/ml) em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico. (* $p < 0,05$) $n = 6$.

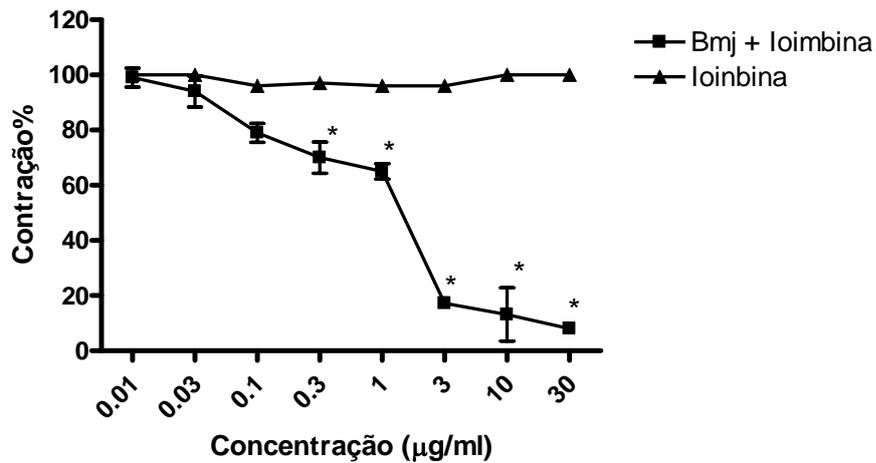


Figura 45 - Força de contração na presença ioimbina. Veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) doses crescente (0,01 a 30µg/ml) em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico. (* p<0.05) n=6

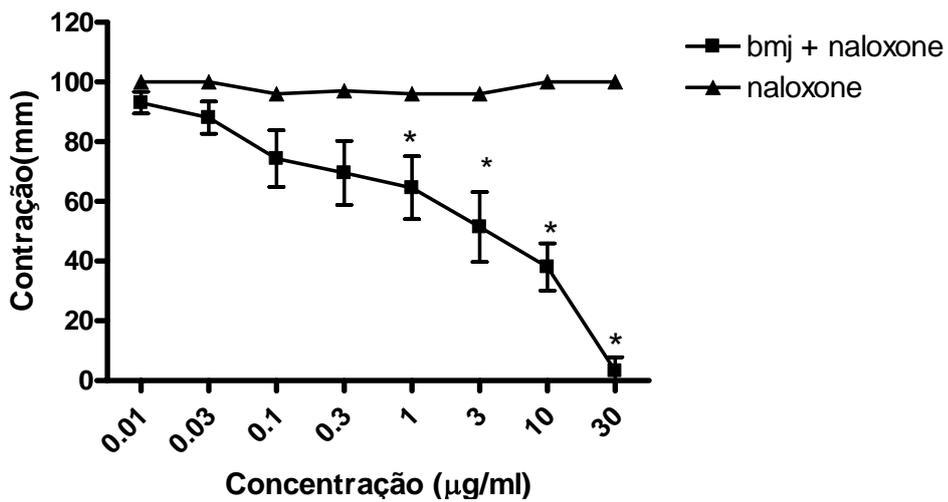
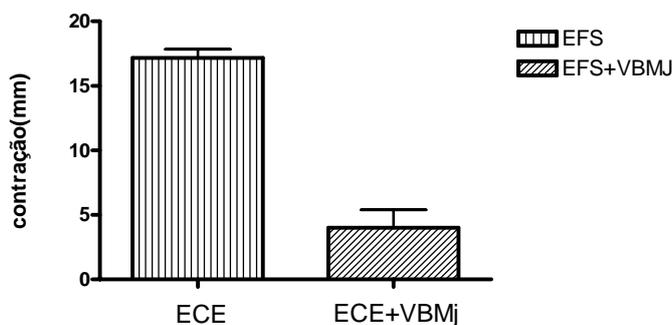
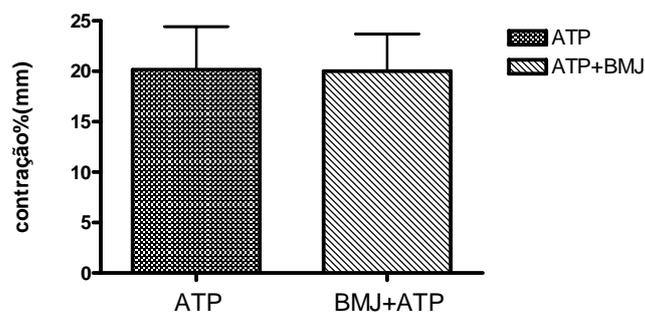


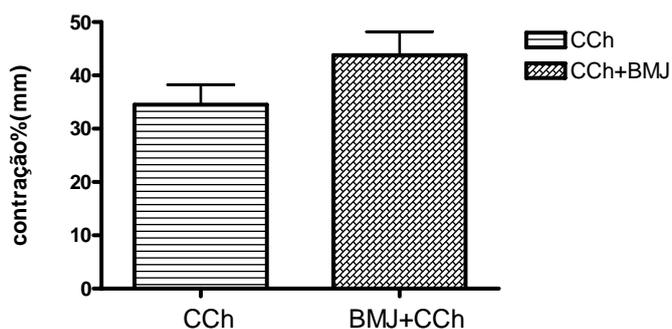
Figura 46 – Força de contração. Na presença naloxona Veneno bruto de *Bothrops marajoensis* nas doses de 0.01 a 30 µg/mL, em canal deferente de camundongos. (*p<0.05) n=6



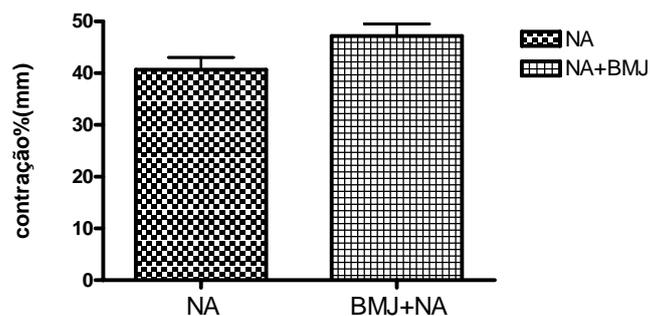
47-A



47-C



47-B



47-D

Figura 47 - Inibição da contração neurogênica estimulada por campo elétrico (ECE) pelo veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj). (10 µg/ml) Comparação com nenhuma queda significativa pela contração com NA, ATP ou Cch (em Krebs normal ou enriquecido com guanetidina 10µM e fentolamina 100µM)

Nota: **A** - Inibição da contração neurogênica estimulada por campo elétrico (ECE) pelo veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) (10 µg/ml). (* p<0.05) n=6; **B** - Efeito de Bmj na contração com Cch (em Krebs normal ou enriquecido com guanetidina 10µM e fentolamina 100µM). n=6; **C** - Efeito de Bmj na contração com ATP (em Krebs normal ou enriquecido com guanetidina 10µM e fentolamina 100µM). n=6; **D** - Efeito de Bmj na contração com NA (em Krebs normal ou enriquecido com guanetidina e fentolamina). n=6

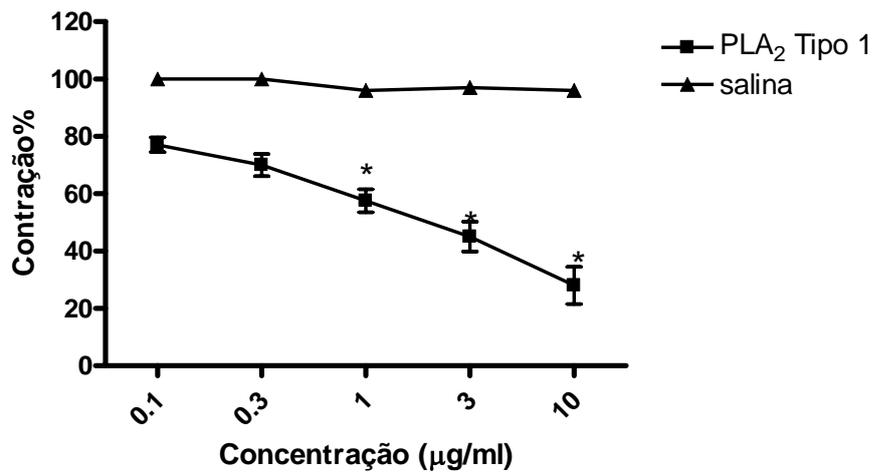


Figura 48 – Força contração. Efeito da fosfolipase tipo 1 (PLA₂ tipo 1) do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) doses crescente (0,1 a 10µg/ml) em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico. (*p<0.05) n=6

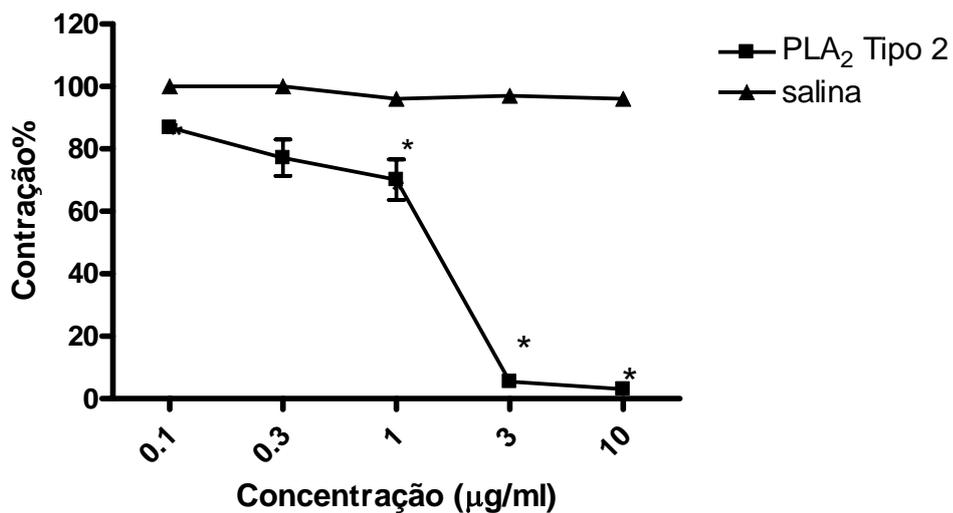


Figura 49 – Força contração. Efeito da fosfolipase tipo 2 (PLA₂ tipo 2) do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) doses crescente (0,1 a 10µg/ml) em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico. (*p<0.05) n=6

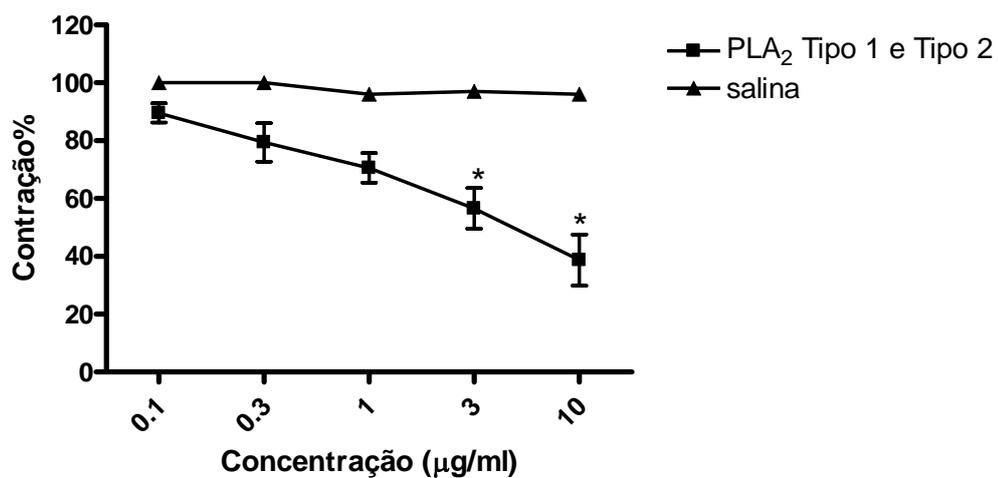


Figura 50 – Força contração. Efeito da associação das fosfolipases tipo1 e tipo 2 (PLA₂ tipo 1 e tipo 2) do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (Bmj) doses crescente (0,1 a 10µg/ml) em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico (*p<0.05) n=6

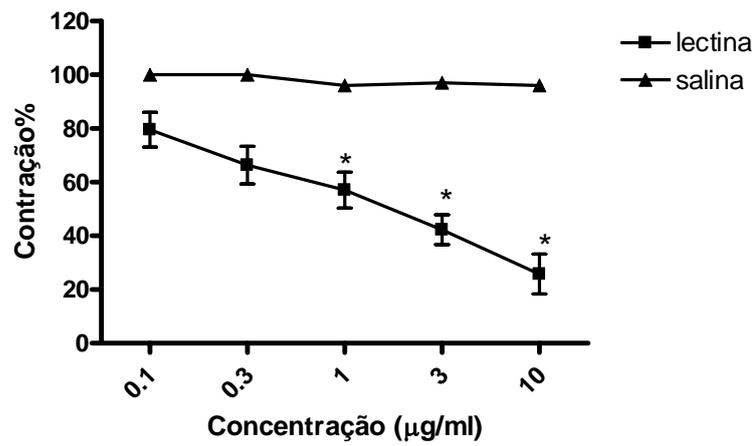


Figura 51 – Força contração. Efeito da lectina do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* (BMJ) doses crescente (0,1 a 10µg/ml) em canal deferente de camundongos estimulado por campo elétrico. (* $p < 0.05$) $n = 6$

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliações da toxicidade Cardiovascular

A diminuição da pressão arterial média causada pelo veneno *Bothrops marajoensis* representa um achado comum para o gênero. Alterações cardiovasculares são descritas no veneno de diversas espécies do gênero botrópico (ROCHA e SILVA *et al.*, 1949; GUTIERREZ; LOMONTE, 1989; SIFUENTES, 2008).

A fim de avaliar se efeitos hipotensores obtidos eram oriundos de reflexo do tipo Bezöld-Jarisch por ação do veneno em quimioceptores ventriculares, realizou-se administração as mesmas doses em ratos atropinizados. O reflexo Bezöld-Jarisch descreve reflexos cardiovasculares envolvendo receptores sensoriais cardíacos localizados principalmente no ventrículo esquerdo, com vias vagais aferentes não mielinizados influenciados por estímulo mecânico ou químico. Sua estimulação resulta em aumento da atividade parassimpática e em inibição da atividade simpática. Quando ativado ocorre o desenvolvimento da tríade: bradicardia, hipotensão e náusea. Atropina por seu efeito muscarínico antagonista é efetiva no aumento da frequência e diminuição desses sintomas (BEZOLD, 1867; JARISCH, 1937; MARK, 1983).

O bloqueio autonômico com atropina não alterou a diminuição pressórica causado pelo o veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. A ausência de alterações significantes em comparação aos animais não atropinizados demonstraram que o efeito hipotensor e bradicárdico obtido com veneno bruto não estão relacionados à ativação do sistema parassimpático.

Os resultados obtidos com a administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* em sistema de perfusão em coração isolado de ratos indicam qualitativamente uma relação inversa entre a força de contração e pressão de perfusão sem alterações no fluxo de perfusão.

O sistema de Langendorff baseia na perfusão retrógrada (via artéria Aorta) do coração isolado. Como a inervação autonômica extrínseca é isolada da inervação cardíaca, apenas os nervos autonômicos intrínsecos são analisados.

A avaliação eletrocardiográfica obtida com veneno bruto de *Bothrops marajoensis* demonstrou um bloqueio de condução elétrica, com diminuição da frequência cardíaca.

Os achados eletrocardiográficos em ratos justificam as respostas hipotensoras obtidas com a administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*. O decréscimo da frequência cardíaca e da resposta inotrópica no átrio isolado, associados aos achados eletrocardiográficos sugerem um efeito possível sobre a geração de potenciais de ação. Esta ação pode ser devida a uma resposta direta da ação do veneno sobre o miocárdio e as fibras de condução cardíaca.

Estudos realizados com miotoxinas isoladas de várias serpentes do gênero *Bothrops* demonstraram que as mesmas interagem com a membrana plasmática por uma região molecular distinta de seu sítio catalítico com a perda da permeabilidade seletiva para íons como cálcio, mediadores importantes no processo de necrose muscular. São agrupadas em miotoxinas fosfolipásicas, miotoxinas básicas de baixo peso molecular, cardiotoxinas de venenos de Elapídeos e miotoxinas hemorrágicas. As miotoxinas básicas de baixo peso molecular atuam especificamente nos canais de sódio do sarcolema, induzindo a um influxo de sódio que traz como consequência despolarização e contração muscular com vacuolização do retículo sarcoplasmático. As cardiotoxinas são polipeptídios básicos capazes de desorganizar a estrutura das membranas, sendo sua ação miotóxica uma consequência da alteração drástica que as mesmas induzem no sarcolema do músculo esquelético (GUTIÉRREZ , 2002; BARBOSA *et al*, 2006)

A atividade cardiotoxica induzida pelo veneno bruto de *Bothrops marajoensis* pode estar relacionada a ação direta de miotoxinas presentes na sua constituição.

As sarafotoxinas (SRTXs) são peptídeos cardiotoxicos pertencentes à família das endotelinas (Ets) isoladas apenas do veneno de serpentes do gênero *Atractaspis* . Além de se assemelharem biológica e estruturalmente as endotelinas, atuam nos mesmos receptores (KURNIK *et al*. 1999; BORGHERESI *et al.*, 2001).

As endotelinas são reconhecidas como vasoconstritores endógenos potentes produzidos em vários tipos de tecidos. Endotelina 1 (ET-1) é produzida tanto nas células endoteliais como nas células musculares lisas dos vasos, causando vasoconstrição de artérias e veias, além de produzir proliferação das células musculares lisas dos vasos. A produção da endotelina é regulada por estímulos mecânicos e químicos como hipóxia, lesão da parede

vascular, trombina, angiotensina II e insulina. Os antagonistas de seus receptores sugerem que esses peptídeos desempenham importantes papéis no desenvolvimento de certas patologias tais como a hipertensão sistêmica e insuficiência cardíaca congestiva (BATLOUNI *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 1998; KIM; RUBIN, 2002).

Outra suposição para justificar a ação cardiovascular do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* poderia estar relacionada a uma provável isquemia do miocárdio induzindo ao espasmo coronariano, efeito esse mediado por endotelinas.

A possibilidade do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* diminuir a resistência vascular periférica ficou pouco provável visto que não apresentou nenhum efeito significativo na perfusão de leito vascular mesentérico de ratos, pré-contraído com fenilefrina, como também isoladamente, na ausência de fenilefrina.

A atividade hipotensora de fosfolipases isoladas de serpentes do gênero *Bothrops* não está claramente relatada na literatura. As duas frações fosfolipases (fosfolipase tipo 1 e tipo 2) obtidas do veneno de *Bothrops marajoensis* demonstraram ações semelhantes ao veneno bruto, ou seja, hipotensão e bradicardia. Porém, fosfolipase tipo 1 demonstrou uma ação depressora mais intensa tanto na frequência cardíaca como na pressão arterial média quando compara a fosfolipase tipo 2. A adição das duas fosfolipases no mesmo ensaio não demonstrou ação sinérgica ou aditiva, o que nos leva a considerar esta atividade hipotensora com mecanismos de ação distintos.

Fosfolipases extraídas do veneno de *Bothrops jararacussu* também demonstraram ações cardiovasculares diferentes quando estudada em sistema de pressão arterial em ratos (MARCUSSE *et al.*, 2003).

A administração de uma lectina extraída do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* apresentou diminuição tanto pressão arterial como da frequência cardíaca.

A atividade depressora no sistema cardiovascular por lectinas botrópicas tem sido relatada (PANUNTO *et al.*, 2006; BRAGA *et al.*, 2006).

6.2 Avaliação da Nefrotoxicidade

A administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* no sistema de perfusão renal sugere uma atividade nefrotóxica. O decréscimo significativo dos parâmetros vasculares, pressão de perfusão e resistência vascular renal e nos parâmetros funcionais, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário, demonstram achados comumente relatados em outros venenos de serpentes do mesmo gênero.

Braga *et al.* (2006), avaliando os efeitos renais e vasculares do veneno bruto de *Bothrops insularis* no sistema de perfusão em ratos, demonstram uma diminuição dos parâmetros vasculares e funcionais. Trabalhos distintos com veneno de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca* no mesmo sistema demonstraram uma diminuição da pressão de perfusão, resistência vascular, fluxo urinários, ritmo de filtração glomerular com reversão dos efeitos no fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular no final do experimento (MONTEIRO; FONTELES, 1999; HAVT *et al.*, 2001).

Os efeitos renais no envenenamento ofídico podem ser decorrentes de coagulação intravascular disseminada, ação nefrotóxica direta pela atividade proteolítica do veneno ou a espasmos dos vasos sangüíneos decorrente da liberação de substâncias vasoativas (CHAIYABUTR; SITPRIJA, 1999; CALGAROTTO *et al.*, 2008).

Substâncias vasoativas como histamina, serotonina e fator de ativação plaquetária (PAF) podem ser liberados de rim isolado de rato (PIROTZKY *et al.*, 1984).

O PAF e outros fatores dependentes de cicloxigenase como prostaglandina e tromboxano demonstraram uma anulação nos efeitos sobre o fluxo urinário, ritmo de filtração glomerular, sem alterar a atividade do veneno na pressão de perfusão e transporte de íons, alterações provocadas por veneno de *Bothrops jararaca* com a presença dos bloqueadores (WEB 2086, indometacina) (MONTEIRO; FONTELES, 1999).

O PAF em doses baixas produz vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Doses elevadas induzem a atividade espasmogênica da musculatura lisa pela liberação de tromboxano A₂ (TXA₂) e leucotrienos. Sua origem são precursores lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF) liberados pela fosfolipase A₂ dos fosfolipídios de membrana celular, podendo ele

mesmo ativar a fosfolipase A2 com conseqüente produção de eicosanóides (RANG *et al.*, 2004)

A enzima cicloxigenase catalisa a transformação de ácido araquidônico a mediadores lipídicos como as prostaglandinas e tromboxanos. Possui importância na função da homeostase, agregação plaquetária e fisiologia renal. Caracterizadas duas isoformas: cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2). A COX-1 está expressa constitutivamente em todos os tecidos do organismo é a única isoforma presente em plaquetas, onde leva à formação de TXA₂. Encontra-se no endotélio vascular e no tecido renal, entre outros tecidos. Possui participação em condições patológicas como inflamação. A enzima COX-2 apresenta expressão aumentada principalmente durante processos inflamatórios, apesar de ter sido demonstrada sua expressão constitutiva em alguns tecidos do sistema nervoso central e do rim (BOMBARDIER *et al.*, 2000).

Ferreira *et al.* (1965), demonstraram que o veneno do veneno botrópico possuía fatores que intensificavam a resposta à bradicinina. Esses fatores potencializadores da bradicinina constituíam uma família de peptídeos que inibiam a cininase II, inativadora da bradicinina. Erdös e colaboradores demonstraram que a cininase II e a ECA são na verdade uma mesma enzima, que catalisa tanto a síntese da angiotensina II – uma potente substância pressora quanto a destruição da bradicinina – um potente vasodilatador.

A diminuição dos parâmetros renais avaliados com o veneno bruto de *Bothrops marajoensis* está relacionada a fatores diversos que se somam na resposta das alterações demonstradas neste trabalho. Os potencializadores da bradicinina tão bem descrito por Ferreira, 1992, poderiam estar envolvidos na queda principalmente da pressão de perfusão e resistência vascular renal, já que influenciam na liberação renal de bradicinina seguida de óxido nítrico. As alterações de redução descritas para fluxo urinário e ritmo de filtração glomerular podem estar relacionadas à liberação do PAF.

Fatores natriuréticos poderiam justificar o aumento do ritmo de filtração glomerular, do fluxo urinário e eliminação de sódio, como observado com a permanência da diminuição da pressão de perfusão e resistência renal, no final do experimento.

A atividade renal de um tipo de fosfolipase (denominada fosfolipase tipo 1) foi analisada. Esta fração foi escolhida por apresentar maior atividade depressora, no sistema de

pressão arterial em ratos. Os resultados demonstraram respostas diferentes das obtidas com veneno bruto, mostrando que o veneno apresenta mecanismos de ação distintos desta atividade fosfolipásica. Outras frações necessitam ser avaliadas no mesmo sistema.

Barbosa *et al.* (2002), avaliando os efeitos do veneno de *Bothrops moojeni* e suas frações no sistema de perfusão renal observaram que o veneno completo demonstrou efeitos semelhantes aos dos venenos botrópicos em geral, mas as frações fosfolipásicas A₂ demonstraram características opostas, sugerindo que a somatória das frações resulta num conjunto de ações com efeitos mais complexos.

Analisando exclusivamente a atividade fosfolipásica A₂ obtidas do veneno de *Bothrops moojeni*, no sistema de perfusão renal, Barbosa e *et al.* obtiveram resultados semelhantes aos obtidos por Braga *et al.* com veneno de *Bothrops insularis* no mesmo sistema. Um aumento da pressão de perfusão, ritmo de filtração glomerular, fluxo urinário e transporte de potássio.

Análise histopatológica do veneno bruto de *Bothrops insularis* demonstrou alterações compatíveis com efeito citotóxico direto. (DA CRUZ HOFLING *et al.*, 2001).

Existe a possibilidade de um efeito tóxico direto do veneno bruto de *bothrops marajoensis* sobre as células renais. Esta atividade poderia desencadear a um quadro de insuficiência renal aguda, com redução da reabsorção de eletrólitos pelas células tubulares lesadas e relaxamento da musculatura lisa dos vasos renais.

6.3 Avaliações da Neurotoxicidade

6.3.1 Nervo Frênico Diafragma de ratos

Na extremidade terminal dos axônios motores existem vesículas sinápticas contendo acetilcolina (Ach). Quando aplicado um impulso elétrico no neurônio motor dá-se a despolarização da membrana plasmática com surgimento do aumento da permeabilidade da mesma ao cálcio extracelular. Vesículas de Ach são liberadas na fenda sináptica que se liga a receptores nicotínicos existentes na membrana da célula motora, aumentando a

permeabilidade desta aos íons sódio e conseqüente despolarização da membrana celular, estimulando o surgimento da contração na fibra muscular esquelética. Estes receptores são sensíveis a dessensibilização. A Ach pode automoludar-se a nível pré-sináptico quer por mecanismos inibitórios (Muscarínicos, Alfa 2, Beta, receptores para Oxido nítrico) limitando a quantidade de Ach liberada, evitando uma estimulação exacerbada das células efectoras; quer por mecanismos facilitatório (nicotínicos, alfa 1, beta1), promovendo um aumento da Ach liberada, com rápida e máxima ativação do músculo esquelético (LANGER 1997; WESSLER, *et al.*, 1988; MINIC *et al.*, 2002).

Em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos, com estimulação elétrica indireta, o veneno de *Bothrops lanceolatus* induziu aumento inicial das contrações musculares e o aparecimento de contrações espontâneas (efeitos pré-sinápticos) seguido por bloqueio neuromuscular de 70 %. A Neostigmina e a 4-aminopiridina antagonizaram o bloqueio produzido pelo veneno, nessa preparação, (ARAUJO, 2007).

A atividade miotóxica associada ao bloqueio neuromuscular tem sido demonstrada tanto em serpentes do gênero *Bothrops* como também em outros gêneros de serpentes peçonhentas.

Um estudo comparativo do efeito dos venenos brutos de *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus* sobre a junção neuromuscular demonstrou que ambas causavam bloqueio total neuromuscular (SARAGUACI, 2005)

Efeito do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* nas preparações nervo frênico-diafragma de rato demonstrou um bloqueio neuromuscular antagonizado pela neostigmina (Neo) e a 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP). Estudos histológicos e ultra-estruturais mostraram que o mesmo induzia a pronunciada miotoxicidade. Os autores sugeriram uma ação do veneno nos receptores colinérgicos nicotínicos pós-sinápticos (SERAFIM, 2000).

A neostigmina, ao inibir a acetilcolinesterase, aumenta a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica sendo capaz de deslocar competitivamente agentes causadores do bloqueio. A 4-aminopiridina, além do efeito inibidor de dessensibilização de receptores nicotínicos da placa terminal, provoca grande aumento da quantidade de acetilcolina. Esse aumento é resultante de duas ações distintas na membrana das terminações nervosas, a inibição dos canais de potássio, que produz aumento na duração do potencial de

ação, e o maior influxo de íons cálcio para as terminações nervosas motoras durante a despolarização da membrana. (MATSUO *et al.*, 1978; MONTEIRO *et al.*, 2008).

As miotoxinas são comuns na composição dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. São proteínas com estrutura de fosfolipase A₂ que atuam nas células musculares causando o efeito de mionecrose. Podem ser classificadas em dois grupos de acordo com o grupamento protéico. As que apresentam lisina no resíduo 49 ou aspartato atuam diretamente na membrana plasmática das células musculares, originando um fluxo adicional de cálcio desencadeando uma série de efeitos degenerativos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1987).

A primeira miotoxina do veneno *Bothrops* foi isolada em 1984 por e Gutiérrez colaboradores com veneno de *Bothrops asper* (GUTIÉRREZ; CERDAS, 1984). Alguns anos depois Lomonte e colaboradores isolaram miotoxinas botrópicas de *B. atrox* (LOMONTE *et al.*, 1990).

A Administração do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* em doses crescente no ensaio do nervo frênico em ratos mostrou um bloqueio na força de contração dose dependente, com efeito significante nas maiores doses. Este bloqueio pode ser induzido por uma inibição tanto a nível pré-sináptico como pós-sináptico.

Experimentos utilizando agentes bloqueadores neuromusculares poderiam ser utilizados na expectativa de esclarecimento do mecanismo de ação do bloqueio neuromuscular demonstrado. Agentes como neostigmina ou aminopiridina poderiam ser utilizados para evidenciar uma possível ação miotóxica induzida pelo veneno bruto.

6.3.2 Canal deferente de camundongos

Algumas toxinas pré-sinápticas têm sido isoladas do veneno das principais famílias de serpentes, (*Elapidae*, *Hydrophiidae* e *Viperidae*) demonstrando a importância de sua atividade. Essas toxinas possuem atividade fosfolipásica que podem estar envolvidas na ação dos venenos de serpentes, incluindo a imobilização e a morte da presa. Interessantemente suas atividades neurotóxicas não parecem ter relação direta com a atividade fosfolipásica e subsequente hidrólise da membrana de fosfolipídios (ROSEMBERG *et al.*, 1989; HARRIS, 1997).

Neurotoxinas pré-sinápticas podem possuir um único canal polipeptídico ou múltiplas subunidades. Essas toxinas produzem bloqueio neuromuscular por inibição da liberação de acetilcolina do nervo terminal (HARRIS, 1997; HODGSON; WICKRAMARATNA, 2002).

A neurotransmissão do canal deferente de camundongos é estudada através da estimulação elétrica da inervação em preparações isoladas (VENTURA 1998). Essas contrações musculares são mediadas pela combinação de noradrenalina e ATP, liberados como co-transmissores dos neurônios simpáticos. Sendo esta resposta neurogênica bifásica, com a ativação rápida inicial mediada principalmente pelo ATP pela ativação de receptores purinérgicos e a segunda pela noradrenalina, ativação de receptores alfa- adrenérgicos (HOYLE, 1990; WITT, 1991).

A ioimbina, bloqueador alfa-2 adrenérgico, reduz a liberação de noradrenalina nos terminais nervosos (De ANDRADE *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2009).

Naloxona é um antagonista opióide estruturalmente relacionado à morfina com ação antagonista em receptores μ (mu), δ (delta), κ (capa) (LIMBERGER *et al.*, 1986)

Os receptores opióides são classificados em cinco tipos: μ (mu), δ (delta), κ (capa), σ (sigma) e ϵ (épsilon). Alguns destes receptores são divididos em subtipos. Os receptores μ_3 e κ_3 provocam analgesia a nível supra-espinhal. A ativação de receptores delta potencializa a analgesia induzida pela ligação dos opióides a receptores mu. Estes receptores estão acoplados a subunidade de proteínas G, podendo ocorrer efeitos excitatórios ou inibitórios por inibição da via cAMP, redução da condutância de canais de cálcio dependentes, aumento do influxo de potássio, ativação da fosfolipase C e do fosfatidilinositol, ou inibição da proteína C quinase. (GOLDSTEIN; NAIDU, 1989; QUOCK *et al.*, 1999)

Neste trabalho a não reversão do efeito induzido pelo veneno bruto de *Bothrops marajoensis* no canal deferente de camundongos com a adição de ioimbina ou naloxona demonstra que a inibição da contração obtida não possui relação nível de receptores Alfa 2 (α -2), μ (mu), δ (delta), κ (capa).

O veneno bruto de *Bothrops marajoensis* não demonstrou nenhum efeito sobre a contração induzida pelos principais agonistas purinérgicos carbacol, derivado sintético da acetilcolina; ATP ou noradrenalina, em meio adicionado de guanetidina (inibidor pré-

sináptico de neurônios simpáticos pós-ganglionares) ou Fentolamina, (bloqueador dos receptores alfa1 e alfa-2 adrenérgicos), apesar de inibir a contração induzida por estímulo elétrico. Este efeito demonstra provável atividade a nível pré-sináptico.

Galbiatti (2006), avaliando a atividade neuromuscular de uma fosfolipase A₂ obtida do veneno bruto de *Bothrops marajoensis*, observou um bloqueio da contração dose dependente não afetando significativamente a contração exógena por Ach ou KCl sugerindo uma ação pré-sináptica .

Diversos trabalhos sugerem a ação de atividade fosfolipase A₂ com ação neurotóxica. *Bothrops Jararacussu* (NERY , 2008); *Bothrops alcatraz* (NARVAES, 2007); serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Crotalus* (RODRIGUES-SIMIONI, 2004)

Neste trabalho, as frações, PLA₂ (tipo 1 e tipo 2) demonstraram uma inibição da contração dose dependente com a fosfolipase tipo 2 apresentando maior efeito . A inibição pré-sináptica da neurotransmissão autonômica pelo veneno bruto de *Bothrops marajoensis* não dependente de agonistas pré-sináptico opióides, nem α_2 adrenoceptor pode estar relacionado com atividade fosfolipásica A₂, visto ser um componente comum de venenos Botrópicos e possuir atividade pré-sináptica descrita em venenos de serpentes de outros gêneros.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O veneno bruto de *Bothrops marajoensis* apresentou uma ação hipotensora e bradicárdica independente de ativação de quimioceptores ventriculares do sistema nervoso parassimpático; com bloqueio na condução elétrica cardíaca.

Suas frações (fosfolipase tipo 1 e tipo 2 e uma lectina) também possuem ação hipotensora e bradicardia, com maior potência para fosfolipase tipo 1.

No sistema de perfusão renal em ratos do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* demonstrou um decréscimo significativo da pressão de perfusão da resistência vascular renal do fluxo urinário ritmo de filtração glomerular dos transportes de sódio e de cloreto.

A administração da fosfolipase tipo 1, isolada do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* no sistema de perfusão renal gerou decréscimo somente no transporte de sódio, cloreto e potássio .

O ensaio do nervo frênico em ratos mostrou um bloqueio na força de contração dose dependente.

No canal deferente de camundongos o veneno bruto de *Bothrops marajoensis* demonstrou inibição da contração estimulada por campo elétrico. Este efeito não dependente de agonistas pré- sináptico opióides, nem α_2 adrenoceptor.

As frações, PLA₂ (tipo 1 e tipo 2) obtidas do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* demonstraram uma inibição da contração em canal deferente de camundongos dose dependente com a fosfolipase tipo 2 apresentando maior efeito.

A ausência de efeito do veneno bruto de *Bothrops marajoensis* sobre a contração induzida pelos principais agonistas purinérgicos em meio adicionado de guanetidina ou fentolamina demonstra provável atividade a nível pré-sináptico.

REFERÊNCIAS

- ABREU, V. A. **Estudo comparativo dos efeitos do veneno bruto de *Bothrops neuwiedi goyazensis*, *B.n.paranaensis* e *B.n.diporus* sobre a junção neuromuscular de preparações isoladas de ave e de mamífero.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Farmacologia, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335-393, Apr. 2002.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, J.; CARNEIRO, G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a 15 acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Int. Med. Trop.**, v. 28, n. 4, p. 220-227, 1985.
- ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, Dec. 2008.
- ANTHONY, J. Essai sur l'évolution anatomique de l'appareil venimeux des ophidiens. **Ann. Sci. Natur. Zool.**, v. 17, p. 7-53, 1995.
- ARAÚJO, A. L. **Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus*.** Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- ARAÚJO, I. C.; ROCHA, M. L.; VALENÇA, R. C.; MAIA, M. B.; GUARNIERI, M. C.; ARAÚJO, D. A. Pharmacokinetics of the venom of *Bothrops erythromelas* labeled with ¹³¹I in mice. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 526-529, Sept. 2008 .
- ARAÚJO, L. L. **Ação do veneno de *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) na junção neuromuscular e no músculo esquelético de camundongos.** 2005. 180 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAUM, F. R. Biochemical and Biological differentiation of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 102B, n. 4, p. 727-732, 1996.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jaraca). **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 943-946, 1986.
- 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 America rattlesnake (*Crotalus durissis terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.
- BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. **Mediators Inflamm.**, v.5, n. 5, p. 305-323, 1996.

BARBOSA, P. S.; HAVT, A.; FACÓ, P. E.; SOUSA, T. M.; BEZERRA, I. S.; FONTELES, M. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MONTEIRO, H. S. Renal toxicity of Bothrops moojeni snake venom and its main myotoxins **Toxicon**, v. 40, n. 10, p. 1427-1435, Oct. 2002.

BARBOSA, P. S.; MARTINS, A. M.; ALVES, R. S.; AMORA, D. N.; MARTINS, R. D.; TOYAMA, M. H.; HAVT, A.; NASCIMENTO, N. R.; ROCHA, V. L.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The role of indomethacin and tezosentan on renal effects induced by Bothrops moojeni Lys49 myotoxin. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 837-837, June 2006,

BARBOSA, P. S.; MARTINS, A. M.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S.; FERREIRA, D. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from Bothrops jararacussu venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 376-386, Sept. 2005.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **J. Bras. Med.**, v. 65, p. 209-250, 1993.

BARRAVIERA, B. Systemic inflammatory response syndrome in envenoming. **Toxicon**, v. 35, p. 13-14, 1997.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P. C. M. Acidentes por Serpentes do Gênero “*Bothrops*” In: BARRAVIERA, B. (Coord.) **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994.

BATLOUNI, M.; LEITE LUNA, R.; CASTRO, I.; SILVEIRA SBISSA, A.; ARMAGANIJAN, D.; CHAVES JUNIOR, H. C.; NOBRE, F.; PEREIRA DA CUNHA, C. Multicenter comparative study of felodipine-ER and nifedipine-OROS in the treatment of mild-to-moderate arterial hypertension. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 66, n. 4, p. 247-251, Apr. 1996.

BEGHINI, D. G.; DAMICO, D. C.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DELATORRE, M. C.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S. Ability of rabbit antiserum against crotoxin to neutralize the neurotoxic, myotoxic and phospholipase A2 activities of crotoxin from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 1, p. 240-248, Feb. 2008.

BEZOLD, A. von; Ludwig Hirt (1844-1907): *Über die physiologischen Wirkungen des essigsäuren Veratrine*. Untersuchungen aus dem. **Physiologischen Laboratorium em Würzburg**, v. 1, p. 73-122, 1867.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharm. Theor.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 62, p. 325-372, 1989.

BJARNASON, J. B.; FOX, W. J. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p.n735-746, 2003.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Bothrops moojeni snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 2, p. 217-222, Aug. 2002.

BOER-LIMA, P. A.; GONTIJO, J. A.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Histologic and functional renal alterations caused by Bothrops moojeni snake venom in rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n. 5, p. 698-706, Nov. 1999.

BOMBARDIER, C.; LAINE, L.; REICIN, A.; SHAPIRO, D.; BURGOS-VARGAS, R.; DAVIS, B.; DAY, R.; FERRAZ, M. B.; HAWKEY, C. J.; HOCHBERG, M. C.; KVIEN, T. K.; SCHNITZER, T. J. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 21, p. 1520-1528, 2000.

BOMBARDIER, C.; LAINE, L.; REICIN, A.; SHAPIRO, D.; BURGOS-VARGAS, R.; DAVIS, B.; DAY, R.; FERRAZ, M. B.; HAWKEY, C. J.; HOCHBERG, M. C.; KVIEN, T. K.; SCHNITZER, T. J. VIGOR Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 21, p. 1520-1528, Nov. 2000.

BON, C. Snake venom and pharmacopoeia. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a Natural History**. New York: Sterling Publishing Co., 1997. p.194-209.

BON, C. The natural toxins. **Biochimie**, v. 82, p. 791-792, 2000.

BONFIM, V. L.; DE CARVALHO, D. D.; PONCE-SOTO, L. A.; KASSAB, B. H.; MARANGONI, S. Toxicity of phospholipases A(2) D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from Bothrops jararacussu venom. **Cell Biol. Toxicol.**, Oct. 2008.

BORGHERESI, R. A. M. B. **Expressão, processamento e filogenia do precursor das sarafotoxinas**. 2000. 110 p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2000.

BORGHERESI, R. A. M. B.; PALMA, M. S.; DUCANCEL, F.; CAMARGO, A. C. M.; CARMONA, E. Expression and processing of recombinant sarafotoxins precursor in *Pichia pastoris*. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1211-1218, Aug. 2001.

BORGHERESI, R. A.; LEROY, J. M.; YOGI, A.; DOSSANTOS, R. A.; BRENO, M. C.; TOSTES, R. C. Pharmacologic and Molecular Characterization of the Vascular ET_A Receptor in the Venomous Snake *Bothrops jararaca*. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 231, n. 6, p. 729-735, June 2006.

BORJA-OLIVEIRA, C. R.; SOARES, A. M.; ZAMUNÉR, S. R.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Intraspecific variation in neurotoxic and myotoxic activities of Bothrops neuwiedii venoms. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 8, n. 1, p. 88-101, 2002.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 859-867, June 2006.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; DE MENEZES, D. B.; BARBOSA, P. S.; EVANGELISTA, J. S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 329-338, Mar. 2007.

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

BRENES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Immunohistochemical demonstration of the binding of *Bothrops asper* myotoxin to skeletal muscle sarcolemma. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 1987.

BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V. **Venomous Animals and their Venoms**. Orlando: Academic Press Incorporated Orlando, 1971.

BULBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, Suppl. 4, p. 3-26, 1946.

BUSH, S. P.; SIEDENBURG, E. Neurotoxicity associated with suspected southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*) envenomation. **Wilderness Environ. Med.**, v. 10, n. 4, p. 247-249, winter 1999.

CADLE, J. E. Problems and approaches in the evolution ary history of venomous snakes. **Mem. Inst. Butantan**, v. 46, p. 255-274, 1983.

CALGAROTTO, A. K. **Physicoquematical and biologic characterization of phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* venom**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; DA SILVA, S. L.; SOUZA, G. H.; EBERLIN, M. N.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A(2) BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 2008.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University Press, 1989. 425 p.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

CHAIYABUTR, N.; SITPRIJA, V. Pathophysiological effects of Russell's viper venom on renal function. **J. Nat. Toxins** v. 20, n. 5, p. 574-577 1999.

CHIPAUX, J. P.; WILLIAMS, V. AND WHITE, J. review article: Snake venom variability: Methods of study and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p.1270-1303, 1991.

COLUGNAT, D. B.; GOMES, P. A. P.; ARIDA, R. M.; ALBUQUERQUE, M.; CYSNEIROS, R. M.; CAVALHEIRO, E. A.; SCORZA, F. A. Avaliação de parâmetros cardíacos em animais com epilepsia: possível causa de morte súbita? **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 63, n. 4, p 342 dez. 2005.

DA CRUZ HÖFLING, M. A.; PARONETTO, C. C.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilh a) venom and a phospholipase A2-containing fraction. **Histol. Histopathol.**, 2001.

DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 2004.

DA ROCHA, M. M. T.; FURTADO, N. F. Caracterização individual do veneno de *B. Alternatus* em função da distribuição geográfica no Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 22, n. 2, p. 383-393, 2005.

DALTRY, J.C.; WUSTER, W.; THROPES, R. S. Diet and snake venom evolution . **Nature**, 1996.

De ANDRADE, C. A.; PINTO, J. G.; ANDRADE, R. N.; MARTELLI, A. L.; ZICKER, C. M.; Estudo bacteriológico de abscessos causados por picada de serpentes., São Paulo v. 10, n. 5, p. 574-577, 1989.

DeANDRADE, C. A.; De ANDRADE, G.M.; De PAULA, De LUCAS, L. A. Involvement of alpha 1- adrenoceptores on renal responses to central moxonidine and alpha-methylnoradrenaline. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 607, n. 1/3, p. 60-67, Apr. 2009.

DENTERGHEM, C. M. K.; CARNEIRO, S. M.; MARKUS, R. P.; YAMANOUYE, N. Stimulation of the alpha-adrenoceptor triggers the venom production cycle in the venom gland of *Bothrops Jararaca*. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 411-416, 2002.

DRICKAMER, K. Recognition of complex carbohydrates by Ca(2+)-dependent animal lectins. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 2, n. 5, p. 574-577 1993

DUARTE, M. R.; SANTOS, S. M. A.; CARDOSO, J. L. C. Na attack on a human by a Green anaconda. **Bull. Chicago Herpetol. Soc.**, Chicago, v. 35, n. 7, 2000.

DURIGON, A. M.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; DAL BELO, C. A. Neuromuscular activity of *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom in mouse nerve-muscle preparations. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.11, n.1, p.22-33, Jan./Mar. 2005.

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, p. 295-301, jul./ago. 1997.

FERREIRA, M. L.; MOURA-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O.; CARDOSO, J. L.; MOTA, I. Toxic activities of venom from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577 1992.

FERREIRA, S. H. A bradykinin – potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 24, p. 163-169, 1965.

FERREIRA, S. H. A bradykinin – potentiating factor. **Hypotensive Peptides**, v. 10, n. 1, p. 574-577 1966.

FERREIRA, S. H.; SILVA, M. R. E. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (Bradykinin Potentiating Factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, p. 347-349, 1965.

FERREIRA, S. H.; SILVA, M. R. E. Potentiation of bradykinin by dimercaptofropanol (Bal) and other inhibitors of its destroying enzyme in plasma. **Bioch. Pharmacol.**, v. 13, n. 2, p. 52-577, 1962.

FONSECA, F. V. **Isolamento e caracterização de um novo conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoacido oxidase do veneno de *Crotalus durissus cascavella***, Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FONTELES, M. C.; MOREIRA LIMA, A. A. A study of tachyphylaxis and vascular escape in the isolated rabbit kidney: effects of PGE. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v. 24, n. 2, p. 39-44, 1983.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role Of Metals In Snake Venoms For Hemorrhage, Esterase And Proteolytic Activities. **Biochem. Pharm.**, v. 20, p. 1549-1556, 1971.

FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; MIURA, S.; YOSHIDA, E.; SHIMA, H.; NISHIDA, S.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; TANIUCHI, Y.; KAWASAKI, T. Isolation and characterization of jararaca GPIIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. **Thromb. Haemost.**, v. 6, n. , p. 574-577 1995.

FURTADO, M. F. D. **Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* em função da idade das serpentes**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

FURTADO, M. F. D.; COLLETO, G. M. D. D.; DIAS DA SILVA, W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 149-159, 1991a.

FURTADO, M. F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, London, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991b.

FURTADO, M. F. D.; SANTOS, A. M.; KAMIGUTI, A. S. Age-related biological activity of south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **J. Venom. Anim. Toxin. Incl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 186-201, 2003.

GALBIATTI C.; LEITE, G. B.; MARANGONI, S.; PONCE-SOTO, L.; CAVALCANTE W. L. G.; BONFIM, V. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular activity of a Phospholipase A2 from *Bothrops marajoensis* venom. In: SYMPOSIUM OF THE BRAZILIAN SOCIETY ON TOXINOLOGY, 9. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 1, P 23-26, 2006.

GANS, C. **Physiology of the Reptilia**. London: Academy Press, 1978. v. 12.

GARCIA, R. G.; CABRAL, R. D.; MOREIRA, J. S. R.; LOUREIRO, C. L.; LIMA, F.; GOMES, G. P. P.; MARIANTE, G. Endotelinas: importância nas funções cardiovasculares / Endothelins and their importance in cardiovascular functions. **Rev. Med. Hosp. São Vicente de Paulo**, v. 10, n. 22, p.39-47, jan./jun. 1998.

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

GOLDSTEIN, A.; NAIDU, A. Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. **Mol. Pharmacol.**, 1989.

GUIMARÃES, A. Q.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; FERREIRA DE ARAÚJO, P. M.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm Res.**, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, n. 2, p. 377-394. 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, 1989.

GUTIERREZ, J. M.; CERDAS, L.; ODELL, G. V. Isolation And Partial Characterization Of A Myotoxin From *Bothrops Asper* Venom: Partial Characterization and Action On Skeletal Muscle. **Toxicon**, v. 22, p. 115-123, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase **Microvasc. Res.**, v. 71, n. 1, p. 55-63, Jan. 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CERDAS, L. Effects of a myotoxic phospholipase A2 isolated from *Bothrops asper* venom on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Toxicon**, 1987.

HARRIS, J. B. Toxic phospholipases in snake venom: an introductory review. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, v. 70, p. 235-250, 1997.

HARVEY, M. B. Revision of Bolivian *Apostolepis* (Squamata:Colubridae). **Copeia**, New York, v. n. 2, p. 388-409, 1999.

HAVT, A.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The renal effects of Bothrops jararacussu venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, n. 12 Dec. 2001.

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

HAWGOOD, B.; SANTANA DE SÁ, S. Changes In Spontaneous And Evoked Release Of Transmitter Induced By Cortoxin Complex And Its Component Phospholipase A₂ At The Frog Neuromuscular Junction. **Neuroscience**, v. 4, p. 293-306, 1979.

HAYASHI, M. A.; NASCIMENTO, F. D.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577 2008.

HELDER N. de A.; COSTA, T. B. G.; CAVALCANTE, M. L. F. Estudo dos Acidentes Ofídicos Provocados por Serpentes do Gênero Bothrops Notificados no Estado da Paraíba. **Rev. Biol. Ciênc. Terra**, v. 5, n. 1, 2004.

HERDOIZA, G. L.; OLIVEIRA, P. F.; MARKS, S. G.; ZANOLLI, M. B.; PODOLAN, E.; BRANCO, P. P.; MULINARI, A. S.; LAFFITTE, A.; CARVALHO, J. G. Alterações eletrocardiográficas em ofidismo. / Electrocardiographic changes in ophidism. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 40, n. 5, p. 319-323, 1983.

HODGSON W. C.; WCKRAMARATNA, In vitro neuromusculr activity of sanake venoms. **Clin Exp. Pharmacol. Physiol.**, 2002.

HOMISI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SNATO-NET, H.; RODRIGUES-SIMIONIL, G. J. R. Fractionation of Bothrops Jaracussu snake venom. **Toxicon**, 1988.

HOYLE, C. H. Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery possible receptor classes and transmitles fuction. **Gen. Pharmacol.**, v. 21, n. 6, p. 827-831, 1990.

INSTITUTO BUTANTAN. **O Butantan e as serpentes do Brasil**. São Paulo, 1996. 1 CD ROM

JARISCH, A.; JARISCH, C.; HENZE A. C.; HENZE, Ü. Blutdrucksenkung durch chemische Erregung depressorischer Nerven. Über Blutdrucksenkung durch Chemische Erregung depressorischer Nerven. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 1937, 187: 706-Naunyn-Schmiedebergs **Archiv. für Exp. Pathol. Pharmakol.**, v. 187, p. 706-730, 1937.

JEBALI, J.; BAZAA, A.; SARRAY, S.; BENHAJ, K.; KARBOUL, A.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; GARGOURI, A. C-type lectin protein isoforms of Macrovipera lebetina: cDNA cloning and genetic diversity. **Toxicon**, 2009.

JIA, Y.; PÉREZ, J. C. Recombinant expression and affinity purification of snake venom gland parvalbumin in *Escherichiacoli*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, 2009.

JORGE DA SILVA, N. *Micurus*. In: NICOLELLA, BARROS, E.; TORRES, J. B.; MARQUES, M. G. B. (Ed.). **Acidente com animais peçonhentos: consulta rápida**. Porto Alegre., 1997.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 34, p. 347-354, 1992.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 34, p. 347-354, 1994.

JURGILAS, P. **BPO41**: uma antihemorrina presente no soro de *P. opossum*, isolamneto, caracterização co metaloproteases presentes isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu*. Dissertação (Mestrado) – 2000.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L.; THEAKSTON, R. D.; SANO MARTINS Coagulopathy and haemorrhagin human victims of *Bthrops jararaca* envenoming in Brazil. **Toxicon**, v. 25, n. 5, p. 574-577 1991.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, 1996.

KAMIGUTI, A. S.; SLUPSPSKY JR, Z.; HAY, C.R. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhgin, metalloproteinase fromm the venom of *Bthrops jararaca*. **Haemost.**, 1994.

KAMIGUTI, A. S.; SOUSA E SILVA, M. C.; MORENA, P.; NAHAS, L. The anticoagulatint effect of *Bothrops catelnaudi* snake venom. **Toxicon**, 1985.

KARALLIEDDE L. Animal toxins. **Br. J. Anaesth.**, 1995.

KARDONG, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids & elapids. **Mem. Inst. Butantan**, v. 46, p. 105-118, 1983.

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

KIM, N. H.; RUBIN, L. J. Endothelin in health and disease: endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary artery hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.**, v. 7, n. 1, p. 9-19, 2002.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

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.

KINI, R. N. Are C-Type Lectin-Related Proteins Derived By Proteolysis Of Metalloproteinase/Desintegrin Precursor Proteins? **Toxicon**, v. 34, p. 1287-1294, 1996.

KINI, R. N.; EVANS, H. J. Structural Domains In Venom Proteins: Evidence That Metalloproteinases And nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (desintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65-106, 1987.

KURNIK, D.; HAVIV, Y.; KOCHVA, E. A snake bite by the Burrowing Asp, *Atractaspis engaddensis*. **Toxicon**, v. 37, p. 223-227, 1999.

LANDUCCI, E. T The amino acid sequence of bothropasin an Asp 49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* venom with low phospholipase A₂ activity. **J. Protein Chem.**, 1998.

LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. **Pflügers Archiv.**, v. 61, p. 291-332, 1898.

LANGER, S. Z. Twenty-five years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 95-99, 1997.

LIMBERGER, N.; SPÄTH, L.; HÖLTING, T.; STARKE, K. **Mutual interaction between presynaptic alpha 2- adrenoceptores and opioid Kappa-receptores at the noradrenergic axons of rabbit brain cortex.** **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 334, n. 2, p. 166-171, Oct. 1986.

LINBERGER, N.; SPÄTH, L.; HÖLTING, T, STARKE K., **Mutual interaction between LOMONTE, B. **Tissue damage and inflammation induce by sanake venoms.**** Goteborg: Tyckt e Bunden, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine - 49 phospholipase A₂myotoxin from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v.42, p. 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v. 28, p. 1137-1146, 1990.

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

MARINS, M.; SOARES, A. Atividade nucleotídica sobre DNA induzida por venenos de serpentes. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE

FEDERAL DE SÃO CARLOS, 12., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 1997. P. 104-110.

MACHADO BRAGA COSTA MARTINS, A. M.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; FERREIRA BARBOSA, P. S.; DE SOUSA OLIVEIRA, I. M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO, E. B.; RAMOS FAGUNDES, F. H.; FONTELES, M. C.; AZUL MONTEIRO, H. S. Purification and renal effects of phospholipase A(2) isolate d from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p.181-190, Feb. 2008.

MACHADO BRAGA, M. D.; COSTA MARTINS, A. M.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; FERREIRA BARBOSA, P. S.; DE SOUSA OLIVEIRA, I. M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO, E. B.; RAMOS FAGUNDES, F. H.; FONTELES, M. C.; AZUL MONTEIRO, H. S. Purification and renal effects of phospholipase A(2) isolate d from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 181-190, Feb. 2008.

MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E.; Cunha, M. P.; CAPRAJ, C.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. Antidepressante like effect of extract of *rosamarinus* of.in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 2009.

MARCUSSI, S.; URZEDA, M. A.; MAZZI, M. V.; AMUI, S. F.; FERNANDES, V. C.; CAMBRAIA, R. S.; SILVEIRA, L. B.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Estudo Funcional comparativo entre as Fosfolipases A2 ácida e básicas isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu*. 2003.

MARK, A. L. The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 1, p. 90-102, 1983.

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

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

MATSUO, S.; RAO, D. B.; CHAUDRY, I. Interaction of muscle relaxants and local anesthetics at the neuromuscular junction. **Anesth. Analg.**, v. 57, p. 580-587, 1978.

MCDOWELL, S. Systematics. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S.; (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: McGraw-Hill, 1987. p. 3-50.

MELGAREJO. A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

MINIC, J.; MOLGO, J.; KARISSON, E.; KREJCI, E. Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. **Eur. J. Neurosci.**, v. 15, p. 439-448, 2002.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenomation by Bothrops in the State of Bahia: epidemiological and clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2007.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenomation by *Bothrops* in the State of Bahia: epidemiological and clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2007

MOLLIER, P.; CHWETZOFF, S.; MÉNEZ, A. A monoclonal antibody recognizing a conserved epitope in a group of phospholipase A2. **Mol. Immunol.**, v. 27, p. 7-15, 1990.

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

MONTEIRO, E. R.; Dossi, R. J. O.; ANTUNES, A. P.; CAMPAGNOL, D.; BETTINI, C. M.; CHOMA, J. C. Efeitos da metadona ou do neostigmine, associados à lidocaína administrados pela via epidural em cães / Effects of methadone or neostigmine in combination with lidocaine for epidural anesthesia in dogs. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 6, p. 1439-1446, dez. 2008.

MONTEIRO, H.S. Purification and biological activity of the thrombin substance isolated from Bothrops insularis venom. 2007.

MORENO, E.. Características clinicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 25, n. 5, p. 574-577, 2005.

MOURA-DA-SILVA, A. M. *et al.* Processing of tumor necrosis factor by venom metalloproteinases. **Eur. J. Immunol.**, 1996.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M.. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, London, v. 28, n. 11, p. 1293-1301. 1990a

MOURA-DA-SILVA, A. M.; D'IMPÈRIO LIMA, M. R.; NISHIKAWA, A. K.; BRODSKY, C. I.; SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F. D.; DIAS DA SILVA, W.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon**, London, v. 28, n. 1, p. 181-188, 1990b.

MURAKAMI, M. T.; LOURENZONI, M. R.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Biochemical and structural investigations of Bothropstoxin-II, a myotoxic Asp49 phospholipase A2 from Bothrops jararacussu venom. **Protein Pept. Lett.**, v. 15, n. 9, p. 1002-1008, 2008.

MUSIAL, J.; NIEWIAROWSKI, S.; RUCINSKI, B.; STEWART, G. J.; COOK, J. J.; WILLIAMS, J. A.; EDMUNDS, L. H. Inhibition Of Platelet Adhesion To Surfaces Of Extracellular Circuits By Desintegrins: Rgd-Containing Peptides From Viper Venoms. **Circulation**, v. 82, p. 261-273, 1990.

NAHAS, L.; KAMITUG, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and factor X-activator components of Bothrops snakes venoms. **Thromb. Haemost.**, 1979.

NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution in the protein coding regions is universal in Crotalinae snake venom. **Proc. Natl Acad Sci. USA**, n. 12, p. 5605-5609, 1995.

NARVAES, L. B.; ALBUQUERQUE, L. C.; MACIEL, A. A.; STAUB, H.; FRIEDRICH, M.; MARQUES, M. B.; ROHDE, L. E. Intraplaque hemorrhage assessed by high-resolution magnetic resonance imaging and C-reactive protein in carotid atherosclerosis. **J. Vasc. Surg.**, 2007.

NARVAES, L. V. P. **Isolamento e caracterização de toxinas do veneno de *Bothrops alcatraz* Marques, Martins e Sazima, 2002 e aspectos evolutivos com a dieta.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006 .

NASCIMENTO, L. B. (Ed.). **Herpetologia no Brasil.** Belo Horizonte: PUC-MG/ Fundação Biodiversitas e Fundação Ezequiel Dias, 1994.

NEDELKOV, D.; BIEBER, A. L. Detection of isoforms and isomers of rattlesnake myotoxins by capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry **J. Chromatography A**, v. 781, n. 1/2, p. ?, Sept. 1997.

NERY, A. A.; TRUJILLO, C. A.; LAMEU, C.; KONNO, K.; OLIVEIRA, V.; CAMARGO, A. C.; ULRICH, H.; HAYASHI, M. A. A novel physiological property of snake bradykinin-potentiating peptides-reversion of MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine. **Peptides**, v. ?, n. ?, p. ?. 2008

NETTO C. C.; GUEDES, H. L.; SILVA, F. P.; DE SALLES, C. M.; **ALEXANDRE**, G.; OLIVEIRA, C. L.; TORRIANI, I.; DE SIMONE, S. G. Structural characterization and low-resolution model of BJ-48, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararacussu* venom. **Biophys. Chem.**, v. ?, n. ?, p. ?, 2007.

NISENBOM, H. E.; PERAZZO, J. C.; MONSERRAT, A. I.; VIDAL, J. C. Contribution Of Phospholipase A₂ To Lethal Potency Of *Bothrops Alternatus* (*Vibora De La Cruz*) Venom. **Toxicon**, v. 24, p. 807-815, 1986.

PAHARI, S.; BICKFORD, D.; FRY, B. G.; KINI, R. M. Expression pattern of three-finger toxin and phospholipase A₂ genes in the venom glands of two sea snakes, *Lapemis curtus* and *Acalyptophis peronii*: comparison of evolution of these toxins in land snakes, sea kraits and sea snakes. **BMC. Evol. Biol.**, v. 27, n. 7, p. 175, Sept. 2007..

PANUNTO, P. C.; DA SILVA, M. A.; LINARDI, A.; BUZIN, M. P.; MELO, S. E.; MELLO, S. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. ?, n. ?, p. ?, 2006.

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

PIROTZKY, E.; BIDAULT, J.; BURTIN, C.; GUBLER, M. C.; BENVENISTE, J. Release of platelet-activating factor, slow-reacting substance, and vasoactive amines from isolated rat kidneys. **Kidney Int.**, v. ?, n. ?, p. ?, 1984.

PONCE-SOTO, L. A.; BONFIM, V. L.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, ? Determination of primary structure of two isoforms 6-1 and 6-2 PLA2 D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using in vitro neuromuscular preparation. **Protein J.**, v. ?, n. ?, p. ?, 2006.

PRIJATELJ, P.; JENKO PRAZNIKAR, Z.; PETAN, T.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Mapping the structural determinants of presynaptic neurotoxicity of snake venom **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1520-1529, June 2008.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; Tambourgi Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus, **Elsevier Ltd All rights reserved**. 2008.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.; FURTADO, M. F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. ?, n. ?, p. ?, 2008.

QUOCK, R. M.; BURKEY, T. H.; VARGA, E.; HOSOHATA, Y.; HOSOHATA, K.; COWELL, S. M.; SLATE, C. A.; EHLERT, F. J.; ROESKE, W. R.; YAMAMURA, H. I. The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. **Pharmacol. Rev.**, v. ?, n. ?, p. ?, 1999.

RAAB, W.; KAISER, E. Nephrotoxic Action Of Snake Venoms. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, n. 3, p. 1017-1020, 1966.

RAGE, J. C. Fossil History. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Ed.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillan, 1987.

RAGE, J. C.; WERNER, C. Mid-Cretaceous (Cenomanian) snakes from Wadi Abu Hashim, Sudan: The earliest snake assemblage. **Paleont. Afr.**, v. 35, p. 85-110, 1999.

RANG, W. Q.; DU, Y. H.; HU, C. P.; YE, F.; XU, K. P.; PENG, J.; DENG, H. W.; LI, Y. J. Protective effects of evodiamine on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Planta Med.**, v. ?, n. ?, p. ?, 2004 .

REICHL, A. P.; SERRANO, S. M. T.; ASSAKURA, M. T.; MANDELBAUM, F. R. Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 225-237, 1989.

REID, H. A. Cobra-Bites. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 540-561, 1964.

REZENDENDE, N. A.; AMARAL, C. F.; BAMBIIRRA, E. A.; LACHATT, J. J.; COIMBRA, T. M. Functional and Histopathological renal changes induced inrats *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. ?, n. ?, p. ?, 1989.

ROCHA E SILVA, M.; BERVALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, A hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin., **Am. J. Physiol.**, v. 156, p. 261-273, 1949.

ROCHA, I. C. A. **Estudo Epidemiológico dos acidentes ofídicos no Estado do Ceará.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HONSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geografic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: Biochemical characterization and biological activity. **Com. Biochem. Physiol. A**, v. 121, p. 215-222, 1998.

RODRIGUES-SIMIONI, L. **et al**, The Presynaptic Activity of Bothropstoxin-I, a Myotoxin from *Bothrops jararacussu* Snake Venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 95, n. 4, p. 175-182, 2004.

ROMANO-HOGE, **?**; SARWL, **?** Principais Serpentes de Interesse Médico. Reconhecimento. Distribuição Geográfica no Continente Americano. In: SOERENSEN, B. (Ed.). **Animais Peçonhentos**, Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. p. 1-46.

ROSEMBERG, P.; GHASSEMI, A.; CONDREA, E.; DHILLON, D.; YANG, C. C, Do chemical modifications dissociate between the enzymatic and pharmacological activities of beta bugarotoxin and notexin? **Toxicon**, v. 27, p. 137-159, 1989.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: BURCHER, W.; BUCKLEY, E. E. **Venomous animals and their venoms.** New York: Academic, 1971. p. 345-841.

ROZE, J. A. Coral snakes of the Americas. In: **AUTOR.** **Biology, identification, and venoms.** Malabar, Florida: Krieger Publishing Company, 1996.

RUCAVADO, A.; SOTO, M.; ESCALANTE, T.; LORÍA, G. D.; ARNI, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. **Thromb. Haemost.**, v. 94, n. 1, p. 123-131, July 2005.

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

SAI-NGAM, A. Phongtananant S, Nuchprayoon I. Phospholipase A2 genes and their expressions in Thai Russell's viper venom glands. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 395-399, 2008.

SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CASTRO, S. C. B.; TOMY, S. C.; **et al**. Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snake. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1045-1050, 1994.

SANT, S. M.; PUNDARE, N. M. Autopsy study of cases of snake bite with special reference to the renal lesions. **J. Postgrad. Med.**, v. 18, p. 181-188, 1972.

SANTOS, F.; SANT'ANA, C. D.; MARCUSSI, S.; MONTEIRO, L. F.; COPPEDE, J. S.; SILVEIRA, L. B.; CAMBRAIA, R. S.; FERNANDES, V. C.; FRANÇA, S. C.; SAMPAIO, S. V.; MAGALHÃES, **?** **Toxicon**, v. **?**, n. **?**, p. **?**, 2004.

SARAGUACI, H. O. S. **Estudo comparativo, bioquímico e imunofarmacológico do veneno total, da crotoxina e suas isoformas de crotapotina e PLA2 de *Crotalus durissus terrificus*. *C. d. ruruima* *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus*.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SERAFIM, F. G. **Efeitos do veneno de *Micrurus dumerilii carinicauda* na junção neuromuscular e no músculo esquelético de rato.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SIFUENTES, D. N.; EL-KIK, C. Z.; RICARDO, H. D.; TOMAZ, M. A.; STRAUCH, M. A.; CALIL-ELIAS, S.; ARRUDA, E. Z.; SCHWARTZ, E. F.; MELO, P. A. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 28-36, Jan. 2008.

SITPRIJA, V.; BOONPUCKNAVING, V. Snake venoms and nephrotoxicity. In: **AUTOR. Snake venoms.** **Cidade:** Springer-Verlag, 1979. p. 997-1018

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, M. M. S. **Identificação taxonômica das serpentes no estado de Pernambuco.** Monografia **(?????????) – Universidade ????????, Cidade,** 2001.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. ?, n. ?, p. ?, 2006.

STAR, L. Novel dual “small” vesicle modelo f ATP and noradrenaline. Mediated Sympathetic neuromuscular transmission. **Autonomic Neuroc. Basic Clin.**, v. 87, p. 16-36, 2001.

STJÄRNE, L. Basic mechanisms and local modulation of nerve impulse induced secretion of neurotransmitters from individual sympathetic nerve varicosities. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 11, p. 1-137, 1989.

STJÄRNE, L.; ASTRAMP, P.; **BAO, J. X.; GONOF; MSGHINA, M.; STJÄME.** Spatiotemporal pattern of quantal release ATP and Noradrenaline from sympathetic nerves. **Título do periódico**, v. ?, n. ?, p. ?461-496, 1994.

STORER, T. I.; **et. al.** **Zoologia geral.** 6. ed. rev. aum. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. p. 18. (Biblioteca Universitária, série 3, Ciências Puras; v.8).

TAKAHASHI, T.; OHSAKA, A. Purification And Some Properties Of Two Hemorrhagic Principles (Hr2a And Hr2b) In The Venom Of *Trimeresurus Flavoviridis*: Complete Separation Of The Principles From Proteolytic Activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v.. 207, p. 65-75, 1970.

TORRES, A. F. **et al.** Potencial antimicrobiano do veneno da serpente *Bothrops marajoensis*. In: REUNIÃO REGIONAL FeSBE, 2., 2008, **Cidade. Anais...Cidade, ano.**

TOYAMA, M. H.; COSTA, P. D.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**, v. 37, p. 1143-1153, 1999.

TU, A. T. **Handbook of natural toxins**. New York: Marcel Dekker, 1991. v. 15.

UNDERWOOD, G. **A Contribution to the Classification of Snakes**. London: Trustees of the British Museum, 1967. 179 p.

UTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CERDAS, L. Effects of a myotoxic phospholipase A₂ isolated from *Bothrops asper* venom on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Toxicon**, v. 25, p. 1244-1248, 1987.

VANN ROSSUM, Cumulative Dose-Response Curve II, Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 143, p. 2999, 1963.

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. p.205.

VENTURA, S. Autoinhibition, sympathetic cotransmission and biphasic contractile responses to trains of nerve stimulation in the rodent vas deferens. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. ?, n. ?, p. ?, 1998.

VERIDIANA RODRIGUES, M. **et al.** Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases a₂ from *bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Título do periodico**, v. ?, n. ?, p. ?, 2004.

VIDAL, J. C.; MOLINA, H.; STOPPANI, A. O. M. A General Procedure For The Isolation And Purification of Phospholipases A₂ Isoenzymes From *Bothrops* Venom. **Acta. Physical Latinoam.**, v. 23, p. 91-104, 1972.

VIDAL, J.C.; STOPPANI, A. O. M. Isolation And Purification Of Two Phospholipases A From *Bothrops* Venoms. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 145, p. 543-552, 1971.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: CORBETT, C. E. **Farmacodinâmica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. v. 71, p. 1044-1074.

VITAL BRAZIL, O. Venenos Ofídicos Neurotóxicos. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 26, p. 212-218, 1980.

VOGT, G.; STOCKER, W.; STORCH, V.; ZWILLING, R. Biosynthesis of Astacus protease, a digestive enzyme from crayfish. **Histochemistry**, v. 91, n. 5, p. 373-381, 1989.

WESSLER, I.; DIENER, A.; OFFERMANN, M. Facilitatory and inhibitory muscarine receptors on theof pirenzepine and dicyclomine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, v. 338, p. 138-142, 1998.

WITT, P. A.; KRAMER, T. H.; BURKS, T. F. Norepinephrine and ATP are synergistic in the mouse vas deferens preparation. *Eur. J. Pharmacol.*, v. ?, n. ?, p. ?, 1991.

WOLFGANG, W.; ROGER, S. T. Systematics of the *Bothrops atrox* complex. *Herpetologia*, v. ?, n. ?, p. ?, 1996.

WONG, O. F.; HIN-TAT, F.; SHING-KIT-TOMMY, L.; KA-KEUNG, L.; CHAK-WAH, K.; Simpson, I. D. A preliminary survey of Hong Kong snake shops and the potential snake bite risks for the healthcare system. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. ?, n. ?, p. ?, 2009.

YEH JZ, G. S.; WU, C. H. **et al** Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophys. J.*, v. 16, p. 77-81, 1976.

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

ZAMUNÉR STELLA, R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Analise do cDNA e dedução da estrutura primaria de uma PLA2 basica, neurotoxica in vitro, do complexo crotoxina, a partir de mRNA extraido do veneno total de *Crotalus durissus collilineatus*, *Toxicon*, v. ?, n. ?, p. ?, 2004.

ZAMUNÉR, S. R. **Capacidade neutralizante de antiveneno comercial sobre as atividades neurotóxica e miotóxica de venenos botrópicos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

ZAMUNER, S. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMIONI, L. The screening of *Bothrops* venoms for neurotoxic activity using the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon*, v. 34, p. 314-315, 1996.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introduction RY biology of amphibians and reptiles**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.