

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE PELE DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM O VENENO TOTAL DA SERPENTE *Philodryas nattereri*

Rebeca Horn Vasconcelos¹
João Alison de Moraes Silveira²
Glacyane Bezerra de Moraes¹
Joselito de Oliveira Neto¹
Francisco Antonio Felix Xavier Junior¹
Karen Denise da Silva Macambira¹
Natacha Teresa Queiroz Alves²
Roberta da Rocha Braga³
Diva Maria Borges-Nojosa³
Celia Maria de Souza Sampaio⁴
Helena Serra Azul Monteiro²
Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista^{1*}

RESUMO

Venenos de serpentes são compostos por substâncias ativas complexas, sendo a maioria delas de natureza proteica, causando diversos efeitos no ser humano e animais domésticos podendo levar ao óbito. *Philodryas nattereri* é uma serpente nativa da região do Ceará, sendo encontrada em todo o estado. Esse estudo teve por objetivo conhecer as alterações morfofisiológicas de pele de camundongos após inoculação com o veneno total desta serpente. Os animais foram distribuídos em dois grupos que receberam concentrações de 40µg/mL e 20 µg/mL respectivamente, inoculados via subcutânea, além de um terceiro grupo que recebeu via intradérmica 40µg/mL do veneno. Os resultados macroscópicos apresentaram a presença de uma crosta na região inoculada, bem como a presença de hemorragia, tal atividade foi confirmada por achado histopatológico. Microscopicamente, todos os grupos experimentais apresentaram infiltrado inflamatório linfoblástico e de polimorfonucleares, hemorragia, edema, e presença de fibrose. O veneno da serpente *Philodryas nattereri* alterou a arquitetura normal do tegumento. Nossos resultados corroboraram em demonstrar tais alterações, uma vez que esta substância tóxica de origem animal, presente na nossa biodiversidade nordestina apresenta poucos dados na literatura, sendo desta forma, uma importante ferramenta para estudos das alterações morfofisiológicas de pele.

Palavras-chave: *Philodryas nattereri*, veneno, pele.

¹ Laboratório de Histologia dos efeitos causados pelos venenos de serpentes e plantas – HISTOVESP. Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. Brasil.

² Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas- LAFAVET. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil.

³ Núcleo Regional de Ofiologia- NUROF. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil

⁴ Coordenação de Ciências Biológicas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. Brasil.

*Contato para correspondência: janainaserrazul@gmail.com

MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN MICE SKINS INOCULATED WITH THE TOTAL SNAKE VENOM OF *Philodryas nattereri*

ABSTRACT

Snake venoms are composed of complex active substances, most of them of protein nature, causing various effects on humans and domestic animals and can lead to death. *Philodryas nattereri* is a native snake Ceara region, found throughout the state. This study aimed to know the morphological and physiological changes in mouse skin after inoculation with the total venom this serpente. The animals were divided into two groups that received concentrations of 40µg/mL and 20µg/mL respectively, inoculated subcutaneously, and a third group that received intradermal 40µg/mL of the venom. The macroscopic results showed the presence of a crust in the inoculated area, and the presence of bleeding, this activity was confirmed by histopathological analysis. Microscopically, all experimental groups had lymphoblastic and polymorphonuclear inflammatory infiltration, hemorrhage, edema, and fibrosis. The venom of the snake *Philodryas nattereri* altered the normal integument architecture. Our results corroborate to demonstrate such changes, since this toxic substance of animal origin present in our Northeast biodiversity presents few literature data, thereby being an important tool for the study of morphological and physiological changes in the skin.

Keywords: *Philodryas nattereri*, venom, skin.

LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN LA PIEL DE RATONES CAUSADAS POR EL VENENO DE LA SERPIENTE *Philodryas nattereri*

RESUMEN

Los venenos de serpientes se componen de sustancias activas complejas, la mayoría de ellos de naturaleza proteica, provocando diversos efectos sobre los seres humanos y en los animales domésticos pueden llevar a la muerte. *Philodryas nattereri* es una serpiente nativa de la región de Ceará, que se encuentra en todo el estado. Este estudio tuvo como objetivo conocer los cambios morfológicos y fisiológicos en la piel de ratones después de la inoculación con todo el veneno de esta serpiente. Los animales fueron divididos en dos grupos que recibieron las concentraciones de 40µg/mL y 20µg /mL, respectivamente, por vía subcutánea inoculado, y un tercer grupo recibieron intradérmica 40µg/mL veneno. Los resultados macroscópicos mostraron la presencia de una costra en el área inoculada, y la presencia de sangrado, esta actividad se confirmó por análisis histopatológica. Microscópicamente, todos los grupos experimentales tuvieron infiltración linfoblástica y polimorfonucleares inflamatoria, hemorragia, edema y fibrosis. El veneno de la serpiente *Philodryas nattereri* altera la arquitectura normal del tegumento. Nuestros resultados corroboran para demostrar tales cambios, ya que esta sustancia tóxica de origen animal presente en nuestra biodiversidad Northeast presenta pocos datos de la literatura, siendo por lo tanto una herramienta importante para el estudio de los cambios morfológicos y fisiológicos en la piel.

Palabras clave: *Philodryas nattereri*, veneno, piel.

INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos constituem um dos maiores problemas de Saúde Pública na América Latina (1), sendo atualmente classificados como doença negligenciada pela OMS (World Health Organization, 2014). Apesar da incidência mundial e de sua gravidade serem desconhecidas, estima-se que ocorra cerca de 2.500.000 casos de envenenamentos por serpentes peçonhentas ao ano, o que resulta em, aproximadamente, 125.000 mortes e inúmeros casos resultam em sequelas graves (2).

Dentre os países latinos, o Brasil ocupa a 1ª colocação em números de casos, justificada pela sua grande extensão territorial (3). Foram registrados 103.422 acidentes ofídicos, com 464 óbitos entre os anos de 2010 a 2013, sendo segundo o Sinan, no ano de 2012, 19.946 casos de acidentes ofídicos em humanos no país (4).

O Brasil possui uma das mais ricas faunas de serpentes do Planeta, sendo conhecidas 366 espécies, pertencentes atualmente a dez famílias: *Anomalepididae* (6 espécies), *Leptotyphlopidae* (14), *Typhlopidae* (6), *Aniliidae* (1), *Tropidophiidae* (1), *Boidae* (12), *Colubridae* (34), *Colubridae* (237), *Elapidae* (27), e *Viperidae* (28). Dessas, 15% (55 espécies) são consideradas peçonhentas e são responsáveis por cerca de 20 mil acidentes ofídicos anualmente no País (5). Apesar disto, levantamentos têm demonstrado que cerca de 20 a 40% dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por serpentes colubrídeas (6,7).

As serpentes da família *Colubridae*, gênero *Philodryas* são consideradas não peçonhentas (8). No entanto, alguns casos de envenenamento humano têm sido relatados na literatura (9). A baixa incidência de acidentes causados por *Philodryas* é devido à anatomia dos dentes inoculadores (localizados na região posterior do maxilar), o que dificulta injetar o veneno, além do seu comportamento não agressivo (10).

O veneno produzido pelas serpentes é composto por toxinas. Existe uma grande variedade de estruturas tóxicas decorrente da evolução das espécies. Assim, cada espécie de serpente possui seu veneno com a sua composição química característica, levando a uma variação dos efeitos do mesmo no organismo humano.

A pele é o primeiro órgão que entra em contato com o veneno, uma vez que todo e qualquer acidente ofídico ocorre pela inoculação da peçonha na mesma. Tem a função de proteção (não só dos raios ultravioleta por meio da melanina, como protege contra a perda de água e contra o atrito); colabora na termoregulação do corpo; além de participar do processo de excreção de várias substâncias (11).

A despeito da grande diversidade de serpentes opistóglifas brasileiras é escasso o conhecimento das propriedades bioquímicas e farmacológicas de seus venenos, e considerando a importância dos acidentes ofídicos causados pelas serpentes do gênero *Philodryas*. O objetivo deste trabalho foi de estudar os efeitos biológicos do veneno total da *Philodryas nattereri* (*P. nattereri*) na pele de camundongos. Para este fim, foram observadas as alterações macroscópicas e histológicas provocadas por tal, inoculados via subcutânea em peles de camundongos nas concentrações de 40µg/mL e 20µg/mL e, por via intradérmica na concentração de 40µg/mL.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Veneno

O veneno total foi extraído e gentilmente cedido pela professora doutora Diva Maria Borges Nojosa e pela médica veterinária Roberta da Rocha Braga do Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) do departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC,

Fortaleza, Brasil. O veneno foi liofilizado e mantido a temperatura de -20°C até o momento de sua utilização, onde foi diluído em solução salina (0,9%, w/v solução de NaCl).

Animais experimentais

Camundongos machos Swiss (20-30g), foram mantidos em alojamento com temperatura controlada, umidade relativa do ar 65,3 % e 12 h claro/escuro, receberam água e comida *ad libitum*. Os animais e os protocolos experimentais utilizados neste estudo estão de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará – UECE, número de protocolo 2669326/2014.

Protocolo Experimental

Foram utilizados 34 camundongos, pesando aproximadamente 25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram distribuídos em dois grupos: inoculados via subcutânea e via intradérmica. O grupo que utilizou a via subcutânea foi dividido em três subgrupos, onde 08 animais receberam a concentração de $40\mu\text{g/mL}$ (Grupo A); 8 animais receberam $20\mu\text{g/mL}$ (Grupo B) e 6 animais formam o grupo controle (Grupo C), recebendo solução salina. Aqueles que formam o grupo inoculado via intradérmica foram divididos em dois subgrupos, onde 6 animais receberam a concentração de $40\mu\text{g/mL}$ (Grupo D) e 6 animais formaram o grupo controle (Grupo E). As concentrações estão de acordo com estudos encontrados na literatura (12).

Antes dos experimentos os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico de 8 horas. Posteriormente foram anestesiados com xilazina e quetamina por via intraperitoneal (i.p) com a dose de $0,1\text{mL}/10\text{g}$ e a analgesia foi feita com $0,1\text{mg}/\text{kg}$ de tramadol. Em seguida ocorreu a tricotomia na região do dorso, onde ocorreu a inoculação utilizando agulhas hipodérmicas em seringas de insulina as diferentes concentrações do veneno total.

Após um intervalo de duas horas, 50% dos animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical, em seguida foram retirados fragmentos de pele de aproximadamente $1,5\text{ cm}^2$ da região do dorso com auxílio de *punch*, para verificar a atividade hemorrágica. Os outros animais do grupo foram mantidos vivos, com água e ração a vontade por um período de 72h, quando foram eutanasiados e sua pele retirada para análise da atividade de necrose [adaptado (13)]. Desta forma, sendo os parâmetros avaliados: presença de edema na derme, organização dos tecidos conjuntivos frouxo e denso, neoformação vascular, integridade do epitélio e presença de hemorragia e infiltrado inflamatório. Para eutanásia os animais foram previamente anestesiados e procedeu-se o deslocamento cervical. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos específicos para resíduo biológico e congeladas para posterior coleta pela empresa responsável pelo descarte de material biológico da Universidade Estadual do Ceará.

Análise Macroscópica e Microscópica

O local de aplicação do veneno na pele foi fotografado por uma câmera fotográfica da marca Sony®, modelo Cyber Shot 16.1 megapixels, para análise macroscópica. Para análise histológica, os fragmentos da pele foram acondicionados em frascos contendo solução de formol tamponado a 10% por um período de 24 horas. Em seguida esses fragmentos foram lavados em água corrente por uma hora para eliminação de resíduos de formol. Posteriormente os mesmos foram transferidos para o etanol a 70% permanecendo imerso nesta substância por um período de 24 horas, sendo iniciado o processo de desidratação em sucessivas diluições crescentes de etanol. Posteriormente passaram pelo processo de

diafanização, parafinização e em seguida foram levados para corte no micrótomo na espessura de 3 μ m. Procedeu-se a coloração do material por Hematoxilina-Eosina (HE) e, posteriormente novas lâminas receberam a coloração Tricômio de Masson para observação da distribuição de fibras colágenas. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz (MOTIC BA310, Moticam 2000).

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média, onde n representa o número de experimentos. Foi considerada diferença estatística significativa os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados histológicos são considerados não-paramétricos e, para tanto, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis, para análise de significância da diferença entre as médias.

RESULTADOS

Efeito macroscópico da exposição ao veneno de *P.nattereri*

Duas horas após a inoculação do veneno, observou-se a formação de uma crosta, bem como hemorragia nos três grupos inoculados com veneno, sendo mais evidente no grupo que recebeu via subcutânea na concentração de 40 μ g/mL (Figura 1C).

Imediatamente após a eutanásia, a hemorragia foi considerada intensa, observando macroscopicamente a superfície interna da pele (Figura 1B e Figura 1D). Estes resultados se apresentaram em todos os grupos, exceto no controle (Figura 1A).

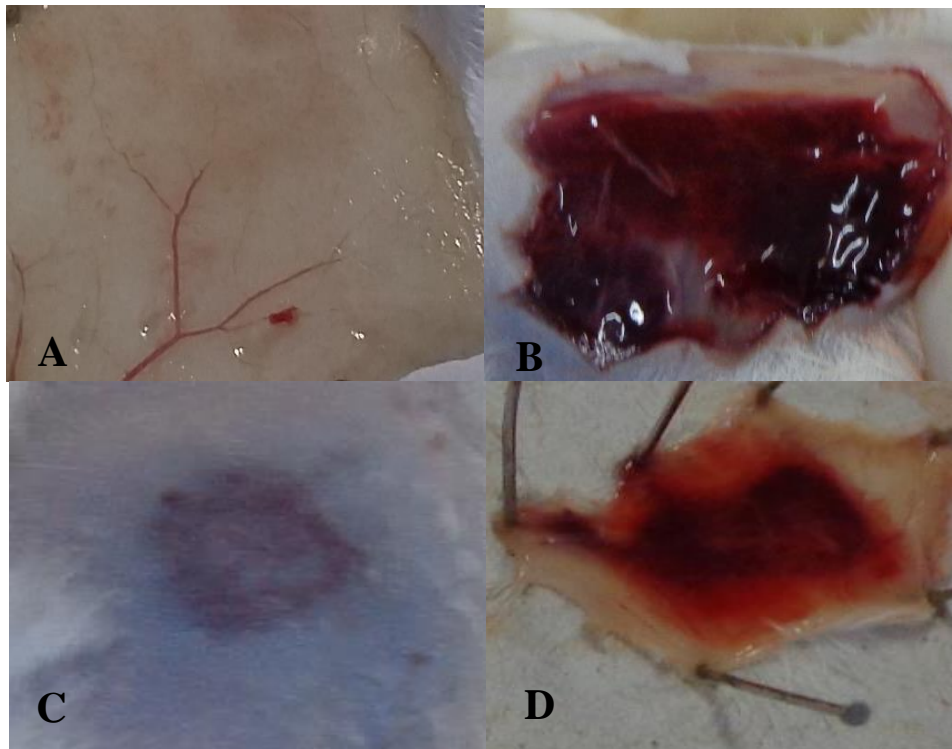


Figura 1. Aspectos macroscópicos de cortes representativos de pele exposta ao veneno total da *Philodryas nattereri* no local da inoculação A – Grupo controle via SC. B – Hemorragia macroscópica no grupo B, concentração de 20 μ g/mL, via SC. C - Grupo A, região do dorso 2h após inoculação de 40 μ g/mL via SC. D - Grupo D, hemorragia macroscópica onde foi inoculado via ID, 40 μ g/mL.

Análise histológica da pele corada por HE inoculada com veneno de *P.nattereri*

O grupo controle mostrou apenas pontos difusos de infiltrado inflamatório linfoblástico e de polimorfonucleares, classificados como discreto (Figura 2A). As alterações histológicas se apresentaram em todos os grupos, em ambas as vias de administração, de maneira crescente e dose dependente, quando comparada ao grupo controle.

Presença de intenso infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos, no grupo A que foi eutanasiado com 2 horas. Passou a ser moderada nos animais que foram eutanasiados nas 72 horas após inoculação. No grupo B, as células inflamatórias tiveram uma intensidade moderada nos animais eutanasiados em 72 horas. Aqueles que foram eutanasiados com 2 horas após inoculação apresentaram discreto infiltrado inflamatório difuso. O mesmo ocorreu com o grupo D, com a presença de plasmócitos e mastócitos. Desta forma, todos os grupos que receberam concentrações de venenos apresentaram uma média moderada para infiltrado inflamatório (Tabela 1).

Hemorragia foi observada macroscopicamente após as 2 primeiras horas de inoculação, sendo confirmada microscopicamente, visto que ela se mostrou intensa em todos os grupos, sendo a grupo A de maior intensidade (Figura 2A) próxima a camada muscular estriada esquelética. Nos animais eutanasiados com 72 horas, a atividade hemorrágica se manteve presente microscopicamente, porém sua intensidade passou a ser leve, e, em cada grupo, observou-se um animal com tal atividade ausente. A média apresentou-se moderada para a hemorragia em todos os grupos, exceto os controles (Tabela 1).

O halo necrótico foi de grau leve e apenas nos animais eutanasiados com 72 horas do grupo A. Nos demais grupos, esta atividade esteve ausente (Tabela 1).

Presença de edema em todos os animais do grupo A, variando em todos os graus, dando uma média intensa. No grupo B, um animal não apresentou edema, porém os outros se apresentaram de forma intensa. Assim como tal, o grupo D também apresentou um animal com ausência de edema, porém nos demais animais do grupo a atividade foi moderada (Tabela 1).

Observou-se em todos os grupos, exceto controle, neovascularização na derme reticular e vasos congestos próximos a musculatura.

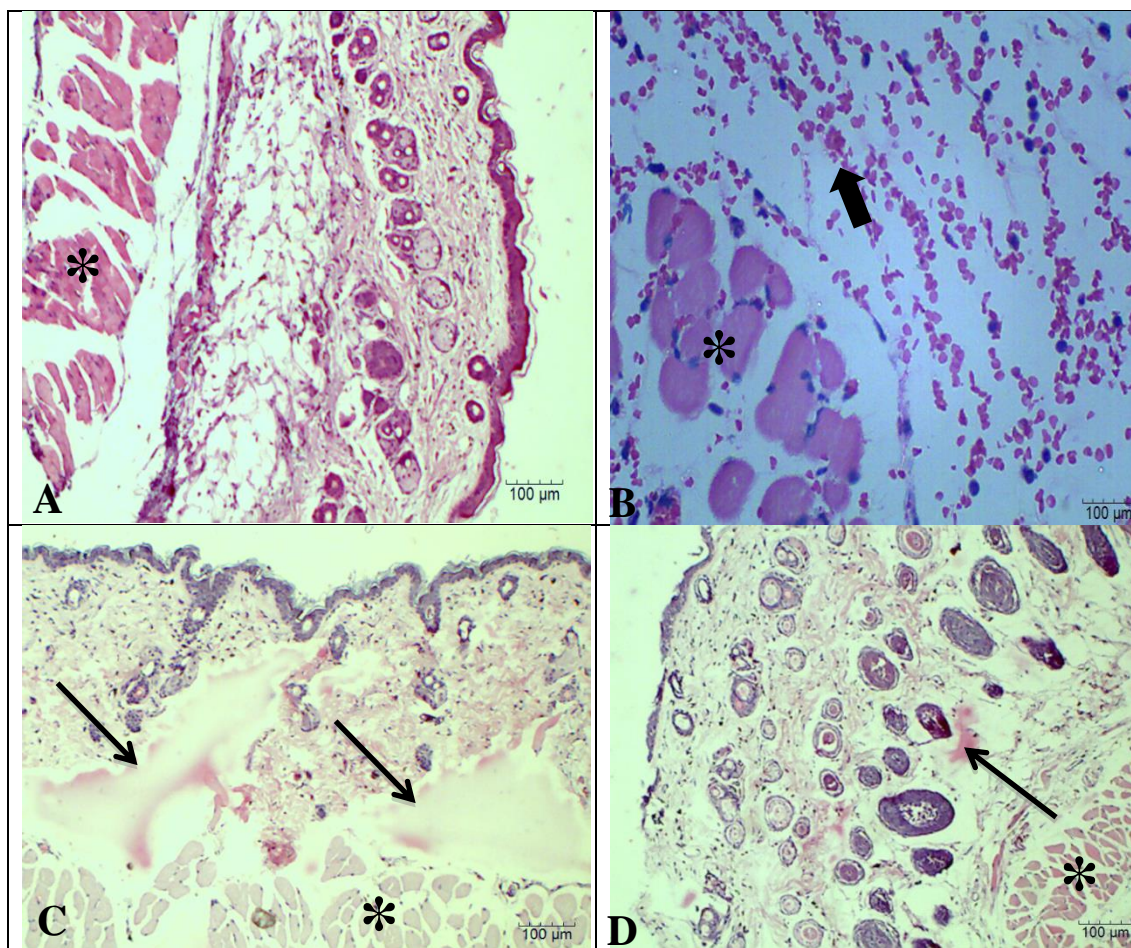


Figura 2. Fotomicrografias de cortes histológicos da região da pele (derme profunda) do dorso de camundongos exposta ao veneno total na concentração de 40 μg via SC da *P. nattereri* (H&E). Em A– Grupo controle, aumento de 100x. B- presença de hemorragia, aumento de 400x. C- Formação de edema, aumento de 200x. D - Presença de edema, descontinuidade de epiderme, acúmulo de fibras colágenas, aumento de 100x. (*) Camada muscular subcutânea (➡) Hemorragia (→) edema. Microscópio Trinocular Motic® BA310 (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) e software Motic Image Plus 2.0.

Tabela 1. Efeitos citotóxicos do veneno de *Philodryas nattereri* em diferentes concentrações e vias de administração sobre a pele do dorso de camundongos

Grupos experimentais	Infiltrado inflamatório	Hemorragia	Necrose	Edema	Fibrose
GA- 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SC	2	2	1	2	3
GB- 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SC	2	2	0	3	2
GC- Controle SC	1	0	0	0	0
GD- 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ID	2	2	0	2	3
GE- Controle ID	1	0	0	0	0

0-AUSENTE 1-LEVE OU DISCRETA 2- MODERADA 3- INTENSA

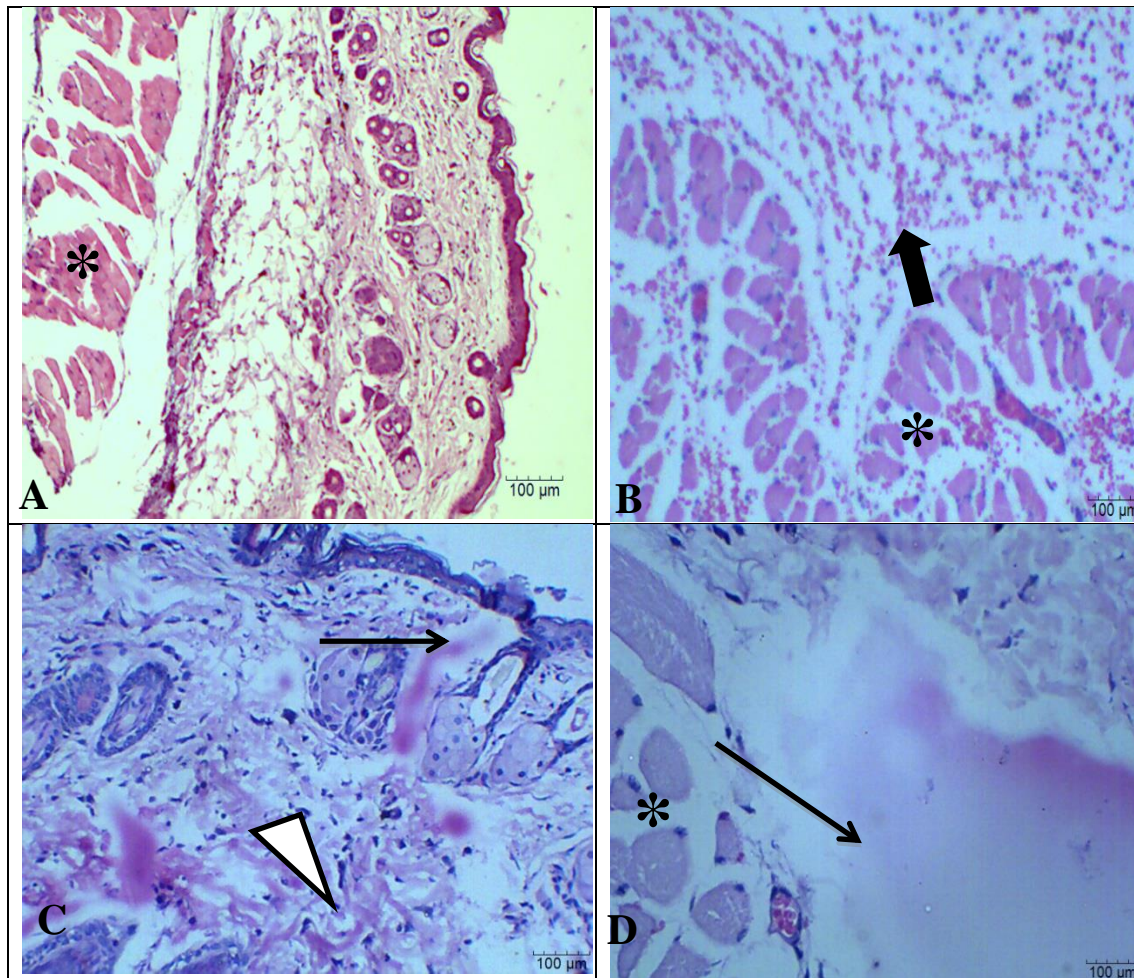


Figura 3. Fotomicrografias de cortes histológicos da região da pele (derme profunda) do dorso de camundongos exposta ao veneno total na concentração de $20 \mu\text{g}$ via SC da *P. nattereri* (H&E). Em A - Grupo controle (100x). B - presença de hemorragia (200x). C - Acúmulo de fibras colágenas e presença de edema (200x). D - Formação de edema, próximo à musculatura (400x) (*) – Camada muscular subcutânea; (➔) Hemorragia (➔) edema (▴) acúmulo de fibras colágenas. Microscópio Trinocular Motic® BA310 (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) e software Motic Image Plus 2.0.

Análise histológica da pele corada por Tricômio de Masson inoculada com veneno de *P.nattereri*

A fibrose apresentou-se de forma intensa em todos os animais do grupo A (Figura 4B e 4D), exceto um animal que apresentou atividade leve. Os animais do grupo B (Figura 4C), que receberam a concentração de $20\mu\text{g/mL}$, apresentaram uma média de fibrose variando de leve a intensa, ficando uma média moderada. Para o grupo D, um animal não apresentou tal atividade, porém nos demais animais a fibrose foi mais intensa, justificando, assim, uma média intensa para o grupo (Tabela 1).

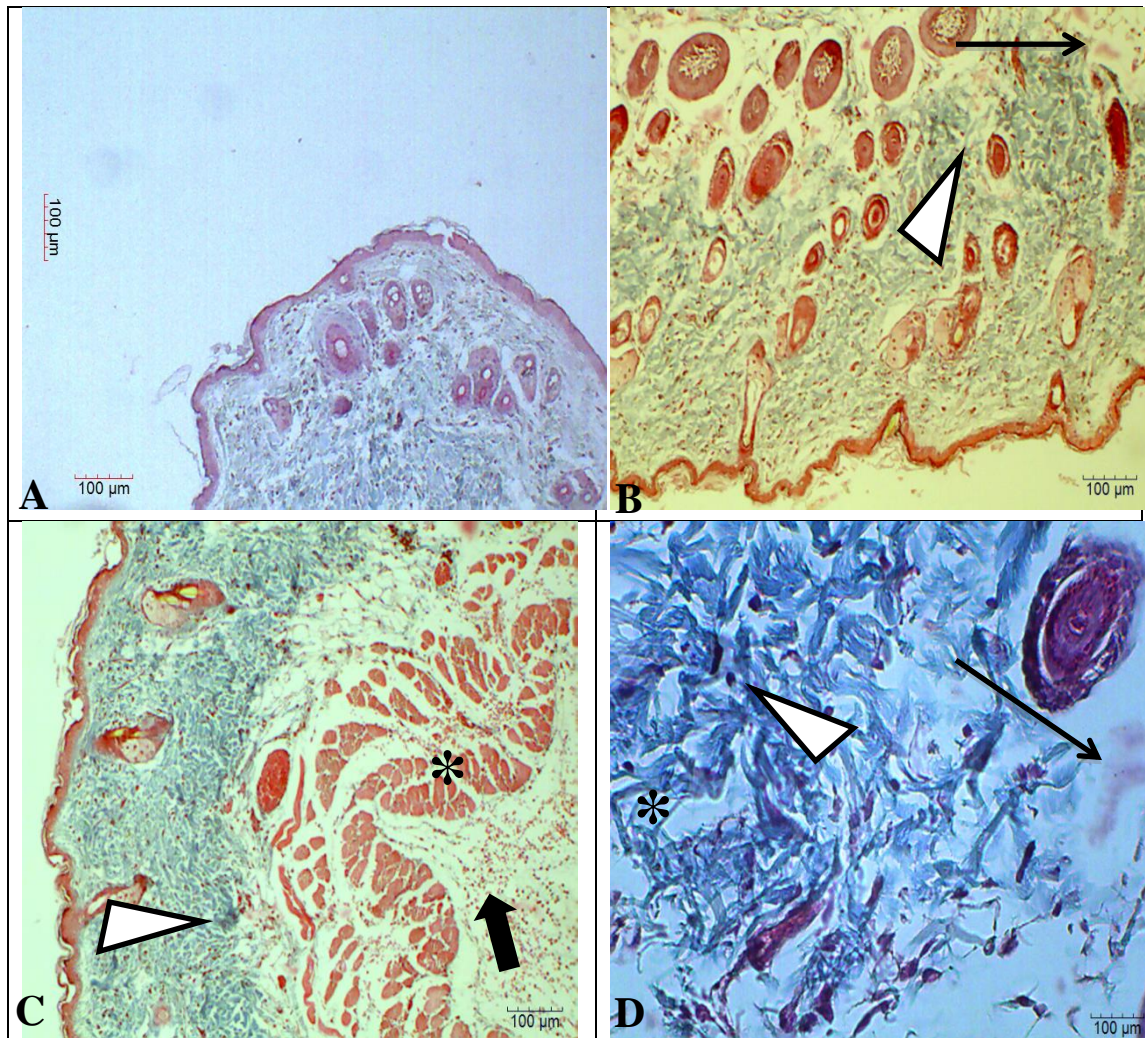


Figura 4. Fotomicrografias de cortes histológicos da região da pele (derme profunda) do dorso de camundongos exposta ao veneno total da *P. nattereri* (Tricômio de Masson). Em A– Grupo controle (100x). B- Acúmulo de fibras colágenas e presença de edema do grupo A, (100x). C - grupo B apresentando hemorragia e fibrose (100x). D-Grupo A com edema e fibrose (400x) (*) - Camada muscular subcutânea; (➡) Hemorragia (➡) edema (⬠) acúmulo de fibras colágenas. Microscópio Trinocular Motic® BA310 (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) e software Motic Image Plus 2.0.

DISCUSSÃO

P. nattereri apresenta os dentes inoculadores localizados na região posterior do maxilar, dificultando desta forma, a inoculação do veneno mais profundamente na vítima (10). Assim, a importância de se estudar as alterações morfológicas na pele como o órgão que sofrerá o maior dano quando um acidente ofídico ocasionado por esta espécie ocorre.

A literatura é vasta no que se refere ao veneno de serpentes pertencentes principalmente às famílias *Elapidae*, *Crotalidae* e *Viperidae* (12). Porém, os estudos acerca da peçonha das *Philodryas*, ainda são escassos, uma vez que a sua produção ocorre em pequena quantidade (14). Além disto, poucos são os estudos acerca do sistema tegumentar em envenenamentos por serpentes deste gênero. Não foram encontradas referências científicas sobre estudos de lesões em pele após inoculação desse veneno em modelo animal.

Estudos realizados sobre a atividade citotóxica da peçonha da *Philodryas olfersii*, demonstraram induzir várias alterações morfológicas no músculo de ratos (15). Sinais e sintomas locais provocados tanto por *P. patagoniensis*, como pela *P. olfersii*, podem ser

Vasconcelos RH, Silveira JAM, Moraes GB, Oliveira Neto J, Xavier Junior FAF, Macambira KDS, Alves NTQ, Braga RR et al. Alterações morfológicas de pele de camundongos inoculados com o veneno total da serpente *Philodryas nattereri*. Vet. e Zootec. 2017 Jun.; 24(2): 323-335.

confundidos com aqueles encontrados em acidentes botrópico (12). Logo, um conhecimento das características do envenenamento em pele por este tipo de veneno é necessário, para que a vítima receba o soro específico, evitando assim, os efeitos nocivos sobre a sua saúde no uso de um soro inapropriado (16).

Efeito intenso no local da picada, incluindo dor, edema, hemorragia e necrose são características comuns tanto em acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* como *Colubridae* (17). É sabido que, se a administração do soro antiofídico for feita de forma rápida, a neutralização dos efeitos sistêmicos é conseguida de forma eficaz (18). Porém, uma neutralização do dano tecidual local é uma tarefa mais difícil e a falta dela resulta em sequelas permanentes com perda e alterações de tecidos (19).

O edema é produzido como uma consequência da lesão vascular e da descontinuidade endotelial, bem como por liberação de substâncias vasoativas, como histamina, prostaglandina, endotelina, óxido nítrico, etc (18,19). Estudos do efeito local de envenenamento com *Bothrops* demonstraram ser complexo, apresentando edema e hemorragia em poucos minutos (18), efeitos semelhantes foram observados no presente trabalho. Macroscopicamente, foi observada a formação de uma crosta nos animais de todos os grupos experimentais.

Na literatura há relatos de que o veneno de *P. patagoniensis* demonstrou ser mais ativo que o da *P. olfersii*, porém ambos apresentaram respostas hiperalgênicas importantes (20). A atividade hemorrágica dos venenos de colubrídeos é atribuída à atuação de metaloproteínases, enzimas proteolíticas com atividade dependente do íon zinco (21,15). Assim como nos viperídeos, as hemorraginas presentes no veneno podem ter um papel semelhante com relação aos processos digestivos das serpentes e a presença de atividade hemorrágica tem sido largamente indicada em várias espécies de colubrídeos (22).

Estudos relatam que venenos de *P. patagoniensis* e *P. olfersii* apresentaram Dose Mínima Hemorrágica (DMH) e 26,9µg/rato e 24,1µg/rato, respectivamente, com a ação mais rápida nos tempos de 2 e 4 horas (20). Também há descrição das alterações promovidas pela ação tóxica do veneno da *P. nattereri* em músculos de camundongos inoculados com doses de 50µg nos tempos de 2h, 4h, 24h e 48h. Em tal trabalho, observou-se hemorragias nas duas primeiras horas. Após 04 horas de inoculação, a hemorragia permaneceu até às 8 horas seguintes (23). Nossos estudos corroboraram com estes resultados anteriores, pois os grupos com concentrações de 20µg/mL e 40µg/mL que foram eutanasiados com duas horas após a inoculação apresentaram atividade hemorrágica moderada.

Após inoculação de 40µg/mL do veneno da *P. patagoniensis* no dorso de camundongos, observou-se macroscopicamente hemorragia ao redor do local da inoculação (12). Em nossos resultados, também foi observada hemorragia de forma macroscópica em todos os grupos experimentais que receberam a peçonha.

Para a atividade necrosante, a Dose Mínima Necrosante DMN foi igual a 180µg/rato em determinado estudo com *P. patagoniensis* (12). Há na literatura outro relato de lesão necrótica com veneno de *P. patagoniensis* e *P. olfersii* nas doses de 50, 60,70,80 e 90µg (20). No presente estudo, as concentrações utilizadas foram de 20 e 40µg/mL e apenas a de maior dose apresentou necrose de intensidade leve.

Relatos acerca de efeitos biológicos de venenos em peles de animais, envolvendo outras espécies de serpentes, também são descritos, visto a importância da reação da peçonha no tegumento. Em um estudo acerca do efeito necrótico de venenos em pele, observou-se que a crotalina, uma toxina presente no veneno crotálico, em concentrações de 40µg/mL, induziu a formação de extensas áreas de necrose, na camada muscular subcutânea. Bem como tal, nossos estudos apresentaram atividade necrótica em um grupo, também localizada nas regiões mais profundas da derme, caracterizando, assim uma ação de dermonecrose. Tal ação também foi observada em análises histopatológicas em cães envenenados por *Crotalus* (24).

Entretanto, no presente estudo, não foi possível observar macroscopicamente, diferentemente de estudos anteriores.

Na literatura é descrito a evolução de edema em pata de ratos inoculados com veneno de *P. nattereri*, onde sua ação se deu de forma rápida, sendo bem pronunciado, atingindo seu efeito máximo nas duas primeiras horas após inoculação nas concentrações de 3 e 10 µg/mL (24). A sua regressão foi de forma gradativa até as 24 horas seguintes (24). Este estudo confirma os nossos resultados, no que se refere a uma atividade edematogênica nas duas primeiras horas. Porém, diverge no que diz respeito às horas seguintes, uma vez que o edema foi observado em nossos resultados até 72 horas após inoculação. Isto pode estar ligado à quantidade inoculada, uma vez que nossas concentrações foram de 2 até 4 vezes maior (20 e 40 µg/mL).

Estudos preliminares demonstraram que a atividade edematogênica causada pelo veneno de *Philodryas patagoniensis* foi de 0,26 mg (Dose Mínima de Edema- DME) (12), sendo muito superior àquela causada pelo veneno de espécies de *Bothrops* da Argentina, tais como: *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedii* e *B. alternatu*, que apresentam valores de DME de 0,85; 1,5; 2,05 e 4,00 mg, respectivamente (25).

O processo inflamatório com infiltrado de células como plasmócitos e mastócitos descrito neste trabalho corrobora com estudos anteriores, que descreveram um processo inflamatório moderado, composto por leucócitos polimorfonucleares em pele de ratos inoculados com veneno de *P. patagoniensis* (12). Tal inflamação é sugestiva de ser uma agressão tecidual direta provocada pelo veneno da *P. nattereri*. Isso se deve pela perda da estrutura endotelial e por liberação de substâncias vasoativas (18,19). Em estudos utilizando o mesmo veneno (24), porém em concentrações menores, confirmaram-se os achados no nosso trabalho, pois apresentaram moderado exsudato inflamatório persistindo até 8 horas após inoculação, que passou a ser discreta nas 24 e 48 horas seguintes (24).

Estudos com venenos de serpentes vêm ganhando importância na área morfofisiopatológica, uma vez que são substâncias ricas em proteínas e toxinas. Desta forma, elucidar o mecanismo de ação de uma peçonha em órgãos e seus efeitos biológicos, é o passo inicial para um maior entendimento da composição e fisiopatologia do mesmo. Os acidentes ofídicos ocorrem com a inoculação do veneno na vítima através da pele, sendo este órgão, portanto, o primeiro contato do veneno com o organismo vitimado.

CONCLUSÃO

O veneno de *Philodryas nattereri* provocou alterações histopatológicas significativas nos tecidos da pele, porém este estudo não permitiu esclarecer seu mecanismo exato de ação. Estudos mais específicos sobre o veneno de *Philodryas nattereri* se fazem necessários, a fim de se estabelecer quais os componentes do veneno provocam os efeitos biológicos locais, bem como, quais os fatores desencadeantes causadores de uma inflamação local, ou se há uma ação direta e/ou indireta dos fatores tóxicos do veneno sobre a pele.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, sob número 2669326/2014.

REFERÊNCIAS

1. Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V. Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p.310- 23.

2. Albuquerque PLMM, Jacinto CN, Junior GBS, Lima JB, Veras MSB, Daher EF. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2013;55(5):295-301.
3. Ministério da Saúde (BR). Portal da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014 [cited 2014 Mar 27]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-07---INCIDENCIA-CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>.
4. Ministério da Saúde (BR). Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Epidemio [Internet]. Brasília: SINAN; 2012 [cited 2014 Mar 28]. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.
5. Nery MDA. Efeitos biológicos e caracterização inicial da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* Steindacher 1870 [tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2012.
6. Santos-Costa MC, Outeiral AB, D'Agostini F, Cappeliari L. Frequência de acidentes ofídicos na região da grande Porto Alegre e cidades próximas, RGS, Brasil. *Comun Mus Cienc Tecnol PUCRS, Ser Zool*. 2001;14(1):89-93.
7. Salomão MG, Albolea ABP, Almeida-Santos SM. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. *Herpetol Rev*. 2003;34(3):307-12.
8. Pinho FMO, Oliveira ES, Faleiros F. Acidente ofídico no estado de Goiás. *Rev Assoc Med Bras*. 2004;50(1):93-6.
9. Araújo ME, Santos ACMCA. Casos de envenenamento humano causado por *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(6).
10. Vitt LJ. Ecological observations on sympatric *Philodryas* (Colubridae) in northeastern Brazil. *Pap Avulsos de Zool*. 1980;34:87-98.
11. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 8a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
12. Peichoto ME, Acosta O, Leiva L, Teibler P, Maruñak S, Ruíz R. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. *Toxicon*. 2004;44(6):589-96.
13. Esmeraldino LE, Souza AM, Sampaio SV. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phytomedicine*. 2005;12(8):570-6.
14. Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Isolation and characterization of five fibrin(o-gen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). *Toxicon*. 1994;32(7):819-31.

15. Acosta O, Leiva LC, Peichoto ME, Marunak S, Teibler P, Rey L. Hemorrhagic activity of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. *Toxicon*. 2003;41(8):1007-12.
16. Nishioka AS, Silveira PVP. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1994;36(3):279-381.
17. Barraviera B, Pereira PCM. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barraviera B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Publicações Científicas; 1994. p.261-80.
18. Melo MM, Habermehl GG, Castro V, Merfort I. Topic utilization of sesquiterpene lactone from *Milleria quinqueflora* on treatment of bothropic envenomation in rabbits. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005;57(4):548-52.
19. Wen FH. Ineficácia do antiveneno na reversão do edema e necrose em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Anais do 6o Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia; 2000; Águas de São Pedro, SP. Águas de São Pedro: SBTx; 2000. p.78-81.
20. Rocha MMT, Furtado MFD. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). *Rev Bras Zool*. 2007;24(2):410-8.
21. Mandelbaum FR, Assakura MT, Reicchl AP, Serrano SMT. *Philodryas* venom metalloproteinases. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF. Handbook of proteolyticenzymes. New York: Academic Press; 1998. p.1-2.
22. Rocha MMT, Paixão-Cavalcante D, Tambourgi DV, Furtado MFD. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). *Toxicon*. 2006;47(1):95-103.
23. Nery MDA, Aquino HD, Ribeiro RTM, Nery EA, Menezes DB, Ximenes RM, et al. Edematogenic and myotoxic activities induced by snake venom of *Philodryas nattereri* from the Northeast of Brazil. *Fundam Toxicol Sci*. 2014;1:7-13.
24. Koscinczuk P, Acosta Pérez O, Teibler P, Maruñak S, Rosciani AS. American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) bite accidents in dogs in Argentina. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000;52:125-9.
25. Acosta Pérez OC, Koscinczuk P, Teibler P, Sánchez Negrette M, Ruíz R, Maruñak S, et al. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los gêneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon*. 1998;36(8):1165-72.

Recebido em: 06/06/2015

Accito em: 20/12/2016