



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

EFEITOS BIOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DA
PEÇONHA DA SERPENTE *PHILODRYAS NATTERERI*
STEINDACHNER 1870

Marinetes Dantas de Aquino Nery

Fortaleza
2012

MARINETES DANTAS DE AQUINO NERY

**EFEITOS BIOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DA PEÇONHA DA
SERPENTE *PHILODRYAS NATTERERI* STEINDACHNER 1870**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Fortaleza
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde

N369e Nery, Marinetes Dantas de Aquino.

Efeitos biológicos e caracterização inicial da peçonha da serpente *Philodryas nattereri*
Steindacher 1870 / Marinetes Dantas de Aquino Nery. – 2012.

195 f. : il. color., enc.; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Fisiologia e Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. Insuficiência Renal. 2. Biologia Molecular. 3. Venenos. I.Título.

CDD 615.942

MARINETES DANTAS DE AQUINO NERY

**EFEITOS BIOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DA PEÇONHA DA
SERPENTE *PHILODRYAS NATTERERI* STEINDACHNER 1870**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Jairo Diniz Filho
Universidade Federal do Ceará - UFC

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

Profa. Dra. Sandra Maria Nunes Monteiro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará - UFC

“Devo ensinar-lhe no que consiste o conhecimento? Quando souber algo reconhecer aquilo que sabe, e, quando não souber, reconhecer que não sabe.

Isso é conhecimento”

Confúcio

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria e João “in memoriam”, irmãs, irmãos, esposo, e aos meus queridos e amados filhos, Erik, Hebert, Herson, luz que ilumina todos os meus momentos e impulsiona-me a buscar vida nova a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida por estar sempre à frente dos meus planos, permitindo que minha caminhada seja desfrutada sempre da melhor forma possível.

Não há palavras que possam descrever meu profundo agradecimento, aos meus pais, que merecem este título que agora obtenho, pelo esforço e dedicação incansáveis em auxiliar minha formação profissional e ensinar sempre bons valores.

À minha família, Cleito esposo, meus filhos Erik, Hebert e Herson importantes, e imprescindíveis em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro, que me orientou e estimulou, com quem aprendi algo muito importante perseverança.

À Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins, que muito me auxiliou na liberação de seu laboratório (LCC) para a realização de muitos desses experimentos.

Ao Prof. Dr. Pedro Magalhães com quem tive a satisfação de realizar alguns experimentos deste trabalho, adquirindo de forma valiosa conhecimentos e uma boa amizade.

Ao Prof. Dr. Dalgimar B. Menezes pela análise histológica e atenção com que me tratou.

À Prof^a. Dr^a. Renata Souza Alves pela disponibilidade e valiosa colaboração em momentos difíceis, ensinamentos que levarei por toda a vida.

À Prof^a. e grande amiga, de toda vida, Maria Aparecida O. Alves pela forma valiosa de torcida e dedicação em experimentos desse trabalho, obrigada.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira por todas as contribuições e pelo fracionamento em RMN da peçonha *Philodryas nattereri*.

Ao Prof. Dr. Gandhi Radis Baptista, pela construção da biblioteca de cDNA.

À Prof^a. Dr^a. Inez Liberato Evangelista pela serenidade e paciência na orientação dos experimento de PA.

À Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly P. Nogueira pela confiança ao disponibilizar o Laboratório de Microbiologia (LABMICRO) para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, pelo auxílio prestado nos experimentos de liofilização da peçonha.

À Prof^a. Dr^a. Diva Maria Nojosa e a Prof^a. Dr^a. Roberta Rocha pela extração da peçonha.

À Doutoranda Teresinha Brito, meu agradecimento especial, pela disponibilidade dedicação, carinho e ajuda na realização dos experimentos.

À Doutoranda Alba Fabiola Costa Torres madrinha da biblioteca cDNA, pela dedicação na realização dos experimentos. Minha eterna gratidão.

Ao aluno de Iniciação Científica Hermano Damasceno de Aquino pelo carinho e ajuda nos experimentos de contorção abdominal.

À Prof^a. Dr^a. Isolda Fonseca Monguba pela amizade e incentivo profissional em toda vida.

À Prof^a. Dr^a. Isabel Galão pela ajuda quando ministrou minhas aulas, obrigada.

Ao doutorando Rafael Matos Ximenes pela atenção e grande auxílio nos experimentos de edema e miotóxica.

Ao Prof. Dr. Odorico Morais pelo imenso apoio, estímulo e amizade.

Às secretárias, Aurea Rhanes e Márcia Borges, pela presteza e dedicação com que sempre me atenderam na Coordenação do Programa de Pós-Graduação.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas, em especial Daneil Freire, Rafael Jorge, Paulo César, Claudênio Diógenes, Socorro, Roberta, Aline, Natacha, Dauvane pelo convívio, colaboração e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Cultivo de Células (LCC) Thiala Josino, Kamila Soares, Alba Fabíola, Ticiano Praciano, Rodrigo Tavares, Ramon Róseo, Patrícia Magalhães, Gdaylon Cavalcante e Marcus Felipe, pela ajuda nos experimentos, e amizade.

As amigas Rute Fernandes e Rivalda pela amizade e o excelente convívio.

Ao companheiro de campo Leonardo Filho pela ajuda na captura das serpentes.

À Silva França, Teresinha França, Vanda França e Beatriz Helena pela amizade e inestimável apoio técnico.

As minhas noras; Lia Bechior, Erika Mendes, e Carol Frota pela amizade, dedicação, carinho e força.

À Karine pela paciência, dedicação em organizar essa tese.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelos ensinamentos transmitidos.

Aos Colegas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, com os quais vivi momentos agradáveis e prazerosos durante o curso.

Ao meu neto João Mendes Bezerra Nery que veio tornar nossas vidas mais feliz.

À minha irmã Marisete Dantas de Aquino pela insistência e dedicação continua na elaboração deste trabalho.

A todos da família, profissionais, e amigos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Saibam que todos foram muito importantes. Muito obrigada.

A Nossa Senhora por ser intercessora junto ao Pai.

RESUMO

A peçonha da serpente *Philodryas nattereri* é uma mistura de proteínas e peptídeos tóxicos com diversas ações locais e sistêmicas importantes, similares às que ocorrem nos acidentes botrópicos. Os mecanismos envolvidos nas ações locais e sistêmicas desta peçonha são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos renais, cardiovasculares, citotóxicos e a identificação molecular da peçonha bruta. O teor proteico total da peçonha foi de 85-90% de proteínas. Foram utilizados ratos Wistar nos experimentos de perfusão de rim isolado, em que o órgão foi perfundido com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* em diversas concentrações para se determinar as possíveis alterações em parâmetros funcionais, além de alterações vasculares em anel de aorta e pressão arterial. A peçonha foi utilizada em células epiteliais de túbulos renais de cachorro (MDCK) e macrófago peritoneal de rato (RAW) e mensurada por pletismografia. O edema de pata, as contorções abdominais e a injeção intramuscular foram realizados em camundongos Swiss. A peçonha foi testada em cepas de bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis subsp*, *Staphylococcus aureus* e as culturas foram diluídas 100x. Para a determinação do número de cromossomos da serpente *Philodryas nattereri* e *Philodryas olfersii*, utilizou-se uma cultura temporária de leucócitos. Da glândula de Duvernoy construiu-se uma Biblioteca de cDNA com o objetivo de identificar seus genes. A peçonha bruta foi submetida a RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Os resultados encontrados demonstraram que a peçonha da *Philodryas nattereri* promoveu alterações em todos os parâmetros renais estudados, principalmente na diminuição da pressão renal (PP) e da resistência vascular renal (RVR), assim como um aumento do fluxo urinário (FU) e do ritmo de filtração glomerular (RFG). O resultado mais relevante é que essa peçonha é altamente lesiva aos túbulos renais, sendo tal fato comprovado com a redução do percentual de transporte dos eletrólitos de sódio (Na⁺), (K⁺) e cloreto (Cl⁻) nas concentrações estudadas, independente da redução da PP. O clearance osmótico e as alterações nos glomérulos e túbulos com material proteico e hemorrágico. As lesões foram observadas por análise histológica, mediante indícios de apoptose/necrose e verificadas na cultura das células MDCK. A redução da pressão arterial e da frequência cardíaca parecem estar relacionadas ao relaxamento de vasos renais, cujos efeitos vasodilatadores foram comprovados nos protocolos de anel de aorta. A peçonha da *Philodryas nattereri* parece comprometer os túbulos renais, independentemente das ações vasculares. O edema de pata causado pela peçonha atingiu o máximo 2 horas após a inoculação e foi inibido pelo dexametasona e o soro anti-bothrops já a indometacina não foi capaz de interferir significativamente no edema. A injeção intramuscular de 50µg da peçonha produziu efeitos de desorganização das fibrilas musculares, hemorragia interfibrilar, edema infiltrado inflamatório e mionecrose dos tipos coagulativa e miolítica. Verificou-se que estas alterações diminuíram com o passar do tempo. As contorções abdominais causadas pela peçonha parecem ser tão agressivas quanto o ácido acético quando comparado ao controle salino. A atividade da peçonha em cultura de bactérias foi significativa para as culturas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Salmomela* entretanto não apresentou significância para *E. Coli*. As serpentes *Philodryas nattereri* e *Philodryas olfersii* possuem um número de cromossomos 2n = 36. Da extração do RNAtotal da glândula da peçonha, junto com a enzima transcriptase reversa *in vitro* produziu-se RNAm transcrito a partir de vários genes diferentes. Assim, os DNAC clonados constituem uma **biblioteca de cDNA** com uma coleção de genes. Os resultados espectrofotométrico de RMN da peçonha bruta da serpente *Philodryas nattereri* revelaram na identificação da presença de acoplamentos ¹³C, ¹H por comprimento de onda de rádio.

Palavras-chave: *Philodryas nattereri*. Dano renal. Estudo molecular da peçonha.

ABSTRACT

The snake venom of the *Philodryas nattereri* is a mixture of toxic proteins and peptides with different important systemic and local actions, which are similar to those occurring in Bothrop accidents. The mechanisms involved in local and systemic actions of this venom are not well known. The aim of this work was to study the renal, cardiovascular and cytotoxic effects as well as the molecular identification of the crude venom. The total protein content of the venom was 85 - 90% protein. To evaluate renal changes, Wistar rats were used for perfusion experiments of isolated kidney, in which the organ was perfused with venom to determine possible changes in parameters, beyond the vascular ring of aorta and blood pressure promoted by total snake venom of the *Philodryas nattereri*. The venom was used in the epithelial cells of dog renal tubules (MDCK) and mouse peritoneal macrophages (RAW). The paw edema was performed in Swiss mice, as measured by plethysmography reaching the maximum edema of 2 hours after inoculation. Also an intramuscular injection of 50µg of venom produced disruptive effects of muscle fibrils. The venom was tested in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* subsp and *Staphylococcus aureus* bacterial strains; the cultures were diluted 100x. To determine the number of chromosomes of the snake *Philodryas nattereri* *Philodryas offersii*, it was used temporary leukocyte culture. Out of the Duvernoy's gland, it was constructed a cDNA library in order to identify their genes. The crude venom was subjected to NMR (nuclear magnetic resonance). The results showed that the venom of *Philodryas nattereri* promoted changes in all renal parameters studied, mainly in decreased renal pressure (RP) and renal vascular resistance (RVR), as well as an increase in urine flow (UF) and glomerular filtration rate (GFR). The most relevant is that this venom is highly detrimental to the renal tubules, and this fact is proven by reducing the percentage of transport of the electrolytes sodium (Na⁺), (K⁺) and chloride (Cl⁻) at the concentrations studied, regardless of the reduction of PP. The osmotic clearance and changes in glomeruli and tubules with hemorrhagic and proteinaceous material. The lesions were observed by histologic analysis, by evidence of apoptosis / necrosis and verified in the culture of MDCK cells. The reduction in blood pressure and cardiac frequency seems to be related to the relaxation of renal vessels, whose vasodilatory effects have been validated in aortic ring protocols. The *Philodryas nattereri*'s venom seems to impair the renal tubules, regardless of vascular actions. The paw edema caused by venoms was inhibited by dexamethasone and serum anti-bothrops. The indomethacin was not able to significantly interfere in edema. Intramuscular injection of 50µg of venom produced disruptive effects of muscle fibrils, interfibrillar hemorrhage, edema, inflammatory infiltration and myonecrosis of the miolitic and coagulative types, which decrease all this change over time. The abdominal contortions caused by poison seem to be as aggressive as the acetic acid compared to the saline controls. This snake has a number of chromosome 2n = 36 *Philodryas offersii* 2n = 36 chromosomes. The activity of the venom in cultured bacteria was significantly associated with the *S. aureus* cultures. *P. aeruginosa*, and *Salmomela* showed no significance with *E. Coli*. From the total RNA extraction of venom gland, along with the reverse transcriptase enzyme *in vitro* was produced mRNA transcribed from many different genes. Thus, the cloned cDNA constitute a cDNA library with a collection of genes. It was evaluated the NMR spectrophotometric register of the snake *Philodryas nattereri* crude venom in the identification of the presence of ¹³C, ¹H couplings, by radio wavelength.

Keywords: *Philodryas nattereri*; Renal perfusion; Library construction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Principais componentes da peçonha de serpentes	06
Figura 2	– Características biológicas das principais serpentes brasileiras	09
Figura 3	– Aspecto morfológico do crânio de serpentes conforme as séries de dentição	11
Figura 4	– Glândula de Duvernoy de <i>Philodryas nattereri</i> (gD); dente opistóglifo (do); ligamento quadrato-maxilar (lqm)	12
Figura 5	– Dentição opistóglifa	12
Figura 6	– Estrutura de Proteínas Proteolíticas da Peçonha	13
Figura 7	– Inflamação aguda	14
Figura 8	– (A) Hemácias; (B) Hemorragia	16
Figura 9	– Alvos das toxinas em 3D	17
Figura 10	– Edema leve induzido pela peçonha	18
Figura 11	– (A) Sistema cardiovascular; (B) Efeito da pressão do coração (PP)	19
Figura 12	– (A) Filtração glomerular; (B) Alterações renais	20
Figura 13	– Tratamento de Acidentes Ofídicos	22
Figura 14	– Acidentes causados por serpentes <i>Philodryas nattereri</i>	24
Figura 15	– <i>Philodryas nattereri</i>	25
Figura 16	– Fazenda Aroeira - Upanema/RN, habitat onde foram capturadas as espécies <i>Philodryas nattereri</i>	35
Figura 17	– <i>Philodryas nattereri</i> , ratos e camundongos utilizados neste trabalho	35
Figura 18	– Sequência da extração da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> ..	36
Figura 19	– Fotografia do sistema que consiste na perfusão de rim isolado	40
Figura 20	– Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado	40
Figura 21	– Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6)	41
Figura 22	– Valores de fluxo de solução no sistema registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6)	42
Figura 23	– Valores registrados de volume urinário (mL/min) coletados durante a calibração do sistema (n=6)	42
Figura 24	– Administração de manitol (300mg/3mL - independente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado	44
Figura 25	– Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas	44
Figura 26	– Identificação (A) e Canulação (B) do Ureter	45

Figura 27 – Visualização da artéria mesentérica (A), artéria renal (B) e artéria aorta (C).....	46
Figura 28 – Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica	46
Figura 29 – Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão	47
Figura 30 – Visualização do segmento torácico da aorta	52
Figura 31 – Segmento da aorta torácica isolado e devidamente dissecado	52
Figura 32 – Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares.....	53
Figura 33 – Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada	53
Figura 34 – Fotografia representativa do sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato	54
Figura 35 – Sistema utilizado nos experimentos de Contratilidade <i>in vitro</i> em aorta de rato.....	55
Figura 36 – Animal canulado para registro da pressão arterial sistêmica	56
Figura 37 – Modelo esquemático da medida do edema de pata em camundongos	57
Figura 38 – Esquema simplificado das etapas de cultivo e tratamento das células MDCK.....	64
Figura 39 – Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).....	65
Figura 40 – Técnica de Determinação de cromossomos.....	67
Figura 41 – Ensaio de Microdiluição em Caldo	68
Figura 42 – Glândula de Duvernoy de <i>Philodryas nattereri</i>	69
Figura 43 – Isolamento de mRNA poli(A)	71
Figura 44 – Síntese de cDNA.....	72
Figura 45 – Purificação de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	74
Figura 46 – Etapas básicas de clonagem de DNA em um plasmídeo	76
Figura 47 – Análise de colônias azuis/brancas para reconhecer vetores que contêm insertos.....	78
Figura 48 – Sequenciador automático de DNA 3100 Avant (Applied Biosystems, USA)	79
Figura 49 – Pico mostrado em 1 e 2 dimensões	81
Figura 50 – A RNM em 1D a um pulso e 2D a dois ou mais pulsos.	82
Figura 51 – Espectro de Correlação para uma Molécula Orgânica	83
Figura 52 – SDS-PAGE de peçonhas em gel de poliacrilamida (7,5-17,5%) de acordo com o método de LAEMMLI et al., 1970. 1).....	87
Figura 53 – Percentagem de viabilidade celular em relação à peçonha de <i>Philodryas nattereri</i>	88

Figura 54 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> sobre a viabilidade de células de macrófago peritoneal de rato (RAW – 264.7), com MTT	89
Figura 55 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (ph N) na pressão de perfusão renal (PP).....	90
Figura 56 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) na resistência vascular renal (RVR)	91
Figura 57 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) no fluxo urinário (FU).....	93
Figura 58 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) no ritmo de filtração glomerular (RFG)	94
Figura 59 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) no percentual de sódio (%TNa ⁺).....	95
Figura 60 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) no percentual de transporte de potássio (%TK ⁺)	96
Figura 61 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) no percentual de transporte de cloreto (%TCl ⁻)	97
Figura 62 – Efeitos da peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) no clearance osmótico (Cosm).....	98
Figura 63 – (A) Fotomicrografia do rim esquerdo demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n = 6, coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).....	100
Figura 64 – (B) Fotomicrografia na concentração de 1µg da peçonha (congestão, dilatação dos vasos), interstícios normais, glomérulos e túbulos com material proteináceo, nos túbulos em maior quantidade e de modo difuso	100
Figura 65 – (C) Fotomicrografia na concentração de 3µg da peçonha	101
Figura 66 – Efeito da peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> na tensão basal de aorta isolada de rato em solução de K ⁺ 60mM	102
Figura 67 – Efeito da peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> na contração induzida por K ⁺ (60 mM). Concentrações crescentes de peçonha <i>Philodryas nattereri</i> inibiram parcialmente a contração induzida por K ⁺ 60 mM	103
Figura 68 – Efeito da peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> na contração induzida por fenilefrina	104

Figura 69	– Recuperação de anéis de aorta de rato com K ⁺ (60 mM) após exposição à peçonha de <i>Philodryas nattereri</i>	105
Figura 70	– Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado	105
Figura 71	– Efeitos da peçonha da <i>Philodryas nattereri</i> na pressão arterial média (PAM) em ratos anestesiados (n=6)	106
Figura 72	– Efeitos da peçonha da PhN na frequência cardíaca (FC).....	107
Figura 73	– Frequência respiratória (FR), nas doses da 100µg/mL e 300µg/mL, reduziu significativamente a FR em função do Controle (Controle = ±100mL/min, n= 6)	108
Figura 74	– Cinética do edema de pata induzido por <i>Philodryas nattereri</i>	109
Figura 75	– Representação gráfica da modulação farmacológica do edema induzido pela Peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	110
Figura 76	– Fotomicrografia do edema de pata em solução salina, as lâminas analisadas através de um microscópio ótico (n = 6 – coloração de hematoxilina-eosina-aumento de 100X).....	111
Figura 77	– Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha <i>Philodryas nattereri</i> na concentração de 10µg atingindo o pico máximo em 2 horas com bastante edema e infiltrado inflamatório	111
Figura 78	– Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha <i>Philodryas nattereri</i> na concentração de 10µg inibido com indometacina.....	112
Figura 79	– Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha <i>Philodryas nattereri</i> na concentração de 10µg pré-tratado com dexametasona	112
Figura 80	– Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha <i>Philodryas nattereri</i> na concentração de 10µg prétratado por soro antibothrópico.....	112
Figura 81	– Lâminas com edema de 2 horas, visualizando no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 10x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.....	114
Figura 82	– Lâminas com edema de 4 horas, visualizando no microscópio óptico com (A) Ocular de 10x e objetiva de 10x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.....	114
Figura 83	– Lâminas com hemorragia de 8 horas, visualizadas no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 40x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.....	115

Figura 84 – Lâminas em regeneração de 24 horas, visualizadas no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 40x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.....	115
Figura 85 – Lâminas em regeneração de 48 horas, visualizadas no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 40x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.....	116
Figura 86 – Dosagem da proteína quinase inoculada pela injeção da <i>Philodryas nattereri</i>	117
Figura 87 – Efeito da peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> (100mg/kg) sobre as contorções abdominais em camundongos <i>swiss</i>	118
Figura 88 – Metáfase de células da fêmea de <i>Philodryas nattereri</i>	120
Figura 89 – Metáfase de células sanguíneas do macho de <i>Philodryas nattereri</i> com $2n = 36$ cromossomos.....	121
Figura 90 – Metáfase mitótica de células sanguíneas do macho de <i>Philodryas offersii</i> com $2n = 36$ com a constrição secundária no quinto par de macrocromossomos metacêntrico.....	122
Figura 91 – Metáfase mitótica de células sanguíneas da fêmea de <i>Philodryas offersii</i> com $2n = 36$ com a constrição secundária no quinto par de macrocromossomos metacêntrico.....	123
Figura 92 – Perfil de inibição do crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> com a peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	125
Figura 93 – Perfil de inibição do crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> com a peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	126
Figura 94 – Perfil de inibição do crescimento da bactéria <i>E. coli</i> com a peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	126
Figura 95 – Perfil de inibição do crescimento da bactéria <i>Salmonella</i> com a peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	127
Figura 96 – Eletroforese em gel de agarose (TAE/Formamida) do RNA total da glândula de peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> (<i>Ph</i>).....	129
Figura 97 – Eletroforese em gel de agarose do DNA obtido a partir do RNA total da glândula de peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> (<i>Ph</i>).....	130
Figura 98 – Fracionamento do DNA de acordo com o padrão de distribuição de peso molecular dos fragmentos.....	130
Figura 99 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de pcr de clones isolados da biblioteca de cDNA da glandula de peconha de <i>Philodryas nattereri</i>	131

Figura 100 – Espectrofotrómetro de RMN da peçonha da <i>philodryas nattereri</i> (1d E 2d)	134
Figura 101 – Espectrofotrómetro de RMN da peçonha da <i>philodryas nattereri</i> (1d E 2d) (Cont.)	135
Figura 102 – Espectrofotrómetro de RMN da peçonha da <i>philodryas nattereri</i> (1d E 2d) (Cont.)	135

LISTA DE TABELA

Tabela 1	– Solução de Tyrode (pH = 7,4)	37
Tabela 2	– Solução de Krebs-Henseleit (pH = 7,4)	37
Tabela 3	– Determinação dos parâmetros da função renal.....	49
Tabela 4	– Teor proteico total dos Peçonhas de <i>Philodryas nattereri</i> e <i>Bothrops Jararaca</i>	86
Tabela 5	– O Percentual de Viabilidade Celular das Celular das Células MDCK Expostas a Peçonha da Serpente <i>Philodryas Nattereri</i> (ph N)	88
Tabela 6	– Valores de percentual de viabilidade celular das células de Macrófago (RAW – 264.7) expostas ao Peçonha da serpente <i>philodryas nattereri</i> (PhN)	89
Tabela 7	– Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com o Peçonha a serpente <i>philodryas nattereri</i> (PhN)	91
Tabela 8	– Valores da resistência vascular renal (RVR) dos experimentos realizados com o Peçonha da serpente <i>philodryas nattereri</i> (PhN)	92
Tabela 9	– Valores do fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com o Peçonha da serpente <i>philodryas nattereri</i> (PhN)	93
Tabela 10	– Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com a peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN) ..	94
Tabela 11	– Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa ⁺) nos experimentos realizados com o Peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN).....	96
Tabela 12	– Valores de percentual de transporte de potássio (%TK ⁺) nos experimentos realizados com a peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN).....	97
Tabela 13	– Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl ⁻) nos experimentos realizados com a peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN).....	98
Tabela 14	– Valores de clearance osmótico (Cosm) nos experimentos realizados com a peçonha da serpente <i>Philodryas nattereri</i> (PhN)	99
Tabela 15	– Caracterização farmacológica das atividades edematogênica da peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	110
Tabela 16	– Dosagem de proteína quinase dos músculos inoculados com 50µg da peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	116

LISTA DE SIGLAS

BSA	Bovina Sérica.
cDNA	Biblioteca de DNA.
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa.
CK	Proteína-quinase.
DNA	Ácido Dexoribonucleico
FAD	Flavina Adenina de Nucleotídeo
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde.
IRA	Insuficiência Renal Aguda.
IRA	Insuficiência Renal Aguda
LAO	L-aminoácido oxidase
LABMICRO	Laboratório de Microbiologia.
LABOMAR	Laboratório de Ciências do Mar.
LAFARMULI	Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.
LFAVET	Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas.
LCC	Laboratórios de Cultivo Celular.
MDCK	Célula do Rim de Cachorro
NUROF	Núcleo Regional de Ofiologia.
PAF	Fator de Ativação Plaquetária.
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.
RAW	Macrófagos Peritoneais de Rato.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear.
UFC	Universidade Federal do Ceará.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	A Importância de Estudos de Peçonha e Toxinas	5
2.2	As Serpentes Brasileiras	8
2.3	Atividade das Peçonhas	13
2.3.1	Atividade Proteolítica	13
2.3.2	Atividade Inflamatória Aguda	14
2.3.3	Atividade sobre Plaquetas e Coagulação	15
2.3.4	Atividade Hemorrágica	16
2.3.5	Atividade Neurotóxica	16
2.3.6	Atividade Miotóxica	17
2.3.7	Atividade Cardiovascular	18
2.3.8	Atividade Nefrotóxica	19
2.4	Epidemiologia	20
2.5	O Gênero <i>Philodryas</i>	23
2.5.1	<i>Philodryas nattereri</i>	24
2.5.2	A Peçonha de <i>Philodryas nattereri</i>	26
2.5.3	Estudo de Ressonância Magnética	28
2.5.4	Proteína do Veneno	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivos Gerais	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Aspectos Éticos	34
4.2	Animais	34
4.3	Extração da Peçonha	36
4.3.1	Peçonha, Fármacos, Reagentes e Sais utilizados	36
4.3.1.1	Soluções Fisiológicas Usadas neste Estudo	37
4.3.2	Quantificação de Proteínas da Peçonha pelo Método de Bradford	37
4.3.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo (PAGE-SDS)	38
4.4	Sistema de Perfusão Renal	39

4.4.1 Sistema de Perfusão de Rim Isolado	39
4.4.2 Calibração do Sistema de Perfusão Renal	41
4.4.2.1 Calibração do Sistema.....	41
4.4.3 Solução Perfusora	42
4.4.4 Técnica Cirúrgica	43
4.4.5 Protocolo Experimental	47
4.4.6 Análises Bioquímicas	48
4.4.7 Cálculos dos Parâmetros Renais Avaliados	48
4.4.8 Estudo Histológico Renal	50
4.5 Contratilidade em Anéis de Aorta	51
4.5.1 Técnica Cirúrgica.....	51
4.5.2 Protocolos Experimentais.....	54
4.6 Avaliação da Toxicidade no Sistema Cardiovascular	55
4.6.1 Pressão Arterial.....	55
4.7 Avaliação do Veneno em Processo Inflamatório	57
4.7.1 Edema de Pata Induzido pela Peçonha.....	57
4.7.2 Edema Pré-tratado com Indometacina (Indo + Peçonha)	58
4.7.3 Edema de Pata Pré-tratamento com Dexametasona (Dexa + Peçonha)	59
4.7.4 Edema de Pata Pré-incubado com SAB (Soro Antiothrops).....	59
4.7.5 Análise Histológica.....	59
4.7.6 Análise Estatística	60
4.8 Atividade Miotóxica Avaliada por Histologia	60
4.8.1 Atividade Miotóxica por Dosagem de Proteína-Kinase (CK).....	60
4.8.2 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético e o Veneno de <i>Philodryas nattereri</i>	61
4.9 Ensaio com Cultura de Células	61
4.9.1 Cultivo das Células MDCK (<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>)	61
4.9.2 Cultivo das Células de Macrófago Peritonal de Camundongo (RAW-264.7).....	62
4.9.3 Estudo da Atividade Citotóxica <i>In Vitro</i>	62
4.9.3.1 Ensaio com MTT	62
4.9.3.2 Ensaio Colorimétrico com sal de Tetrazolium (MTT)	63
4.9.4 Análise Estatística.....	66
4.9.5 Análise de Dados.....	66
4.9.6 Determinação do Número Cromossomo <i>Serpente</i> <i>Philodryas nattereri</i>	66

4.9.7	Células Bacterianas	67
4.9.8	Determinação do Potencial Antimicrobiano	68
4.9.9	Análise de Dados	69
4.10	Biblioteca de cDNA da Glândula da Peçonha da <i>Philodryas nattereri</i> ...	69
4.10.1	Extração da Glândula da Peçonha	69
4.10.2	Síntese de Biblioteca de cDNA	70
4.10.2.1	Isolamento do RNA Total do Gene que Codifica a Peçonha	70
4.10.3	Síntese de cDNA	72
4.10.4	Amplificação por PCR	73
4.10.5	Purificação e Fracionamento do cDNA	73
4.10.6	Adição do cDNA ao Vetor	75
4.10.7	Transformação de Plasmídeo Recombinante em <i>E. Coli</i>	77
4.10.8	Análise dos Clones Obtidos	77
4.10.9	Sequenciamento de Clones Aleatórios	79
4.11	Ressonância Magnética Nuclear	79
4.12	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional – 2D	81
5	RESULTADOS	86
5.1	Caracterização Bioquímica	86
5.1.1	Dosagem Proteica	86
5.1.2	Perfil Proteico da Peçonha Bruta	86
5.2	Caracterização Biológica	87
5.2.1	Avaliação do Efeito da Peçonha da Serpente <i>Philodryas nattereri</i> sobre Células MDCK	87
5.2.1.1	Ensaio de Viabilidade Celular	87
5.3	Células de Macrófagos - RAW - 264.7	89
5.3.1	Viabilidade Celular e Citotoxicidade com Sal de Tetrazolium (MTT) ...	89
5.4	Perfusão Renal	90
5.4.1	Rim Isolado	90
5.5	Histologia dos Rins Perfundidos	99
5.5.1	Anel de Aorta	101
5.5.1.1	Efeito da Peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> da Tensão Basal de Aorta de Rato	101
5.5.1.2	Efeito da Peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> na Contração Induzida por Potássio	102

5.5.1.3 Efeito da Peçonha de <i>Philodryas nattereri</i> na Contração Induzida por Fenilefrina	103
5.5.2 Recuperação do Tecido após Exposição à Peçonha de <i>Philodryas nattereri</i>	104
5.6 Histologia do Anel de Aorta	105
5.7 Avaliação da Toxicidade Cardiovascular	106
5.7.1 Efeito da Peçonha da <i>Philodryas nattereri</i> na Pressão Arterial Média, Frequência Cardíaca e Respiratória	106
5.7.1.1 Pressão Arterial Média	106
5.7.1.2 Frequência Cardíaca (FC) e Frequência Respiratória (FR).....	107
5.8 Edema de Pata	108
5.9 Modulação Farmacológica no Edema de Pata	109
5.10 Histologia do Edema	110
5.11 Atividade Miotóxica	113
5.11.1 Investigação da Participação de Proteína-Kinase na Miotoxidade	116
5.12 Contorção Abdominais Causadas pela Peçonha da <i>Philodryas nattereri</i>	117
6 DETERMINAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DA <i>PHILODRYAS NATTARERI</i>	120
7 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PEÇONHA DA SERPENTE <i>PHILODRYAS NATTARERI</i>	125
8 BIBLIOTECA DE cDNA	129
8.1 Resultados da Biblioteca de cDNA	129
8.2 Resultados clones da Biblioteca de cDNA	131
8.3 Sequenciamento Automático de DNA e Análise de Bioinformática	132
9 ESPECTROFOTÔMETRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	134
10 DISCUSSÃO	137
11 CONCLUSÃO	152
REFERÊNCIAS	156
ANEXOS	169

1 INTRODUÇÃO

No Egito antigo, as cobras foram adoradas e sua réplica foi usada para decorar as coroas dos imperadores romanos. Na Grécia antiga, os deuses da Medicina foram retratados com um cajado entrelaçado por uma serpente. Este é o símbolo usado para representar também a Medicina Veterinária, Farmácia e vários outros cursos da área de saúde (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Atualmente há duas proposições sobre o provável habitat ocupado pela serpente ancestral: (1) as serpentes surgiram de ancestrais mossaurídeos, portanto eram aquáticas e ocupavam ambientes marinhos (LEE, 1997, 1998; LEE; CALDWELL, 1998; SCANLON *et al.*, 2010; LEE; SCANLON, 2002); (2) As serpentes ancestrais eram criptozoicas que caçavam em tocas, galerias do solo ou folhiços de chão ou mata (ZAHER, 1998; RIEPPEL; ZAHER, 2000; TCHERNOV *et al.*, 2000; RIEPPEL; ZAHER, 2001). A segunda hipótese é mais aceita, porém, hipóteses que defendem que as serpentes derivaram dos mosassaurídeos ou anfisbenídeos ainda não foram descartadas (ESTES *et al.*, 1988; RIEPPEL, 1988 b).

Embora existam ainda divergências no que diz respeito ao relacionamento das serpentes com os demais Squamatas, a subordem Serpentes tornou-se muito diversificada e inclui cerca de 2.900 espécies no mundo (GREENE, 1997), distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, temos representantes de 10 famílias, 75 gêneros e 321 espécies, portanto, 10% do total de espécies (FRANCO, 2003).

Os acidentes provocados por serpentes não peçonhentas representam percentual significativo de casos atendidos em unidades de urgência, por isto, a identificação correta da serpente é importante.

Estudos ecológicos e filogenéticos sobre esses animais são de importância fundamental para compreensão dos processos naturais de sua classificação.

Apesar dos avanços para uma classificação mais apropriada dos grandes grupos de serpentes, muitos conflitos e discordâncias ainda surgem, tanto em análises morfológicas quanto moleculares (GRAZZIOTIN, 2007) e sugere-se que análises feitas com base em caracteres tanto morfológicos quanto moleculares, sejam realizadas (LEE *et al.*, 2007; ZAHER *et al.*, 2009).

Para se ter uma dimensão da importância dos estudos e dos problemas de sistemática e classificação das serpentes, até pouco tempo, a família Colubridae, hoje Dipsadidae, era considerada a mais numerosa, contando mais de 1.800 espécies e aproximadamente 300 gêneros.

A espécie *Philodryas nattereri*, Steindachner, 1870, incluída na família Dipsadidae (ZAHER *et al.*, 2009) e subfamília Xenodontinae (FERRAREZZI, 1994b; UETZ, 2009) é distribuída ao longo dos biomas do cerrado, caatinga e pantanal do Brasil, além de regiões semiáridas do Paraguai e da Colômbia (UETZ, 2009). A subfamília Xenodontinae ainda não possui uma hipótese filogenética muito clara e, apesar de ser um dos grupos mais amplamente estudados atualmente, os estudos ainda apontam muitas discordâncias sobre a irradiação deste grupo (ZAHER, 1999; VIDAL *et al.*, 2000) e esta situação persiste, apesar dos recentes avanços (MESQUITA, 2010). *Philodryas nattereri* pertence ao gênero-tipo da tribo philodryadini (ZAHER *et al.*, 2009; FERRAREZZI, 1994b), caracterizada morfológicamente por possuir denticção opistóglifa, pupilas redondas, anal dividida, hemipeniano longo e sulco espermático centro linear.

Em relação à ecologia, a tribo philodryadini é caracterizada por espécies semi-arborícolas ou arborícolas. A espécie *Philodryas nattereri* é caracterizada como semi-arborícola e construtora, mas poucos trabalhos sobre esta espécie a classificam como terrícola (VITT, 1980; VANGILDER, 1983; COSTA, 2006). Observa-se sobre a atividade sazonal das espécies *Philodryas nattereri* que apresenta picos de atividade anual durante os meses mais quentes e chuvosos, quando há maior disponibilidade de presas. No bioma caatinga, existe uma marcante sazonalidade em termos de índice pluviométrico e apenas uma pequena variação de temperatura relacionada à reprodução das serpentes de qualquer espécie.

As atividades de reprodução podem ocorrer um pouco antes destes meses chuvosos, mesmo havendo o risco de maior exposição aos predadores, mas facilitando a viabilização do nascimento dos filhotes durante o período chuvoso, quando há maior disponibilidade de recursos e, conseqüentemente, maior probabilidade de sucesso reprodutivo (MESQUITA, 2010).

Philodryas nattereri Steindachner, 1870 popularmente chamada de cobra de cipó ou corre-campo, apresenta coloração verde-oliva com a porção final do corpo de cor castanho. Possui em média 1,20 cm a 1,60cm de

comprimento, olhos grandes com pupila redonda, muito veloz e com atividade diária muito intensa (VITT, 1994). O habitat está relacionado à estrutura física do ambiente, disponibilidade de alimento, à presença de predadores e à própria fisiologia destas serpentes, que são diurnas, arborícolas e semi arborícolas. Alimentam-se de pequenos mamíferos, aves e lagartos (FUNASA, 2001). São ovíparas, põem de seis a 20 ovos. Sua dentição é opistóglifa.

Philodryas nattereri, machos e fêmeas, exibem hábitos diurnos com picos de atividade nos horários mais quentes do dia, devendo se recolher nos horários de menor temperatura. Além disso, pode-se sugerir que esses dados sejam importantes para fatores filogenéticos desta espécie, uma vez que *Philodryas patagoniensis* e *Philodryas olfersi*, que são da mesma família, também registram picos nos horários mais quentes do dia (FOWLER; SALOMÃO, 1994; MESQUITA, 2010).

Encontra-se distribuída em regiões áridas e semiáridas da América do Sul, sendo mais comum na região Nordeste do Brasil (Ceará e Rio Grande do Norte) como mostra a figura abaixo. Informações sobre a reprodução desta espécie são raras e consistem basicamente de tamanho das ninhadas e em algumas ovos no ovidutos, dimorfismo sexual e ciclo reprodutivo feminino. As fêmeas são maiores do que os machos. Provavelmente os machos produzem esperma continuamente ao longo do ano e as fêmeas ficam férteis durante nove meses, de fevereiro a outubro (MESQUITA, 2010).



Fonte: <http://www.google.com.br/imagens/mapas>. NUROF-UFC.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

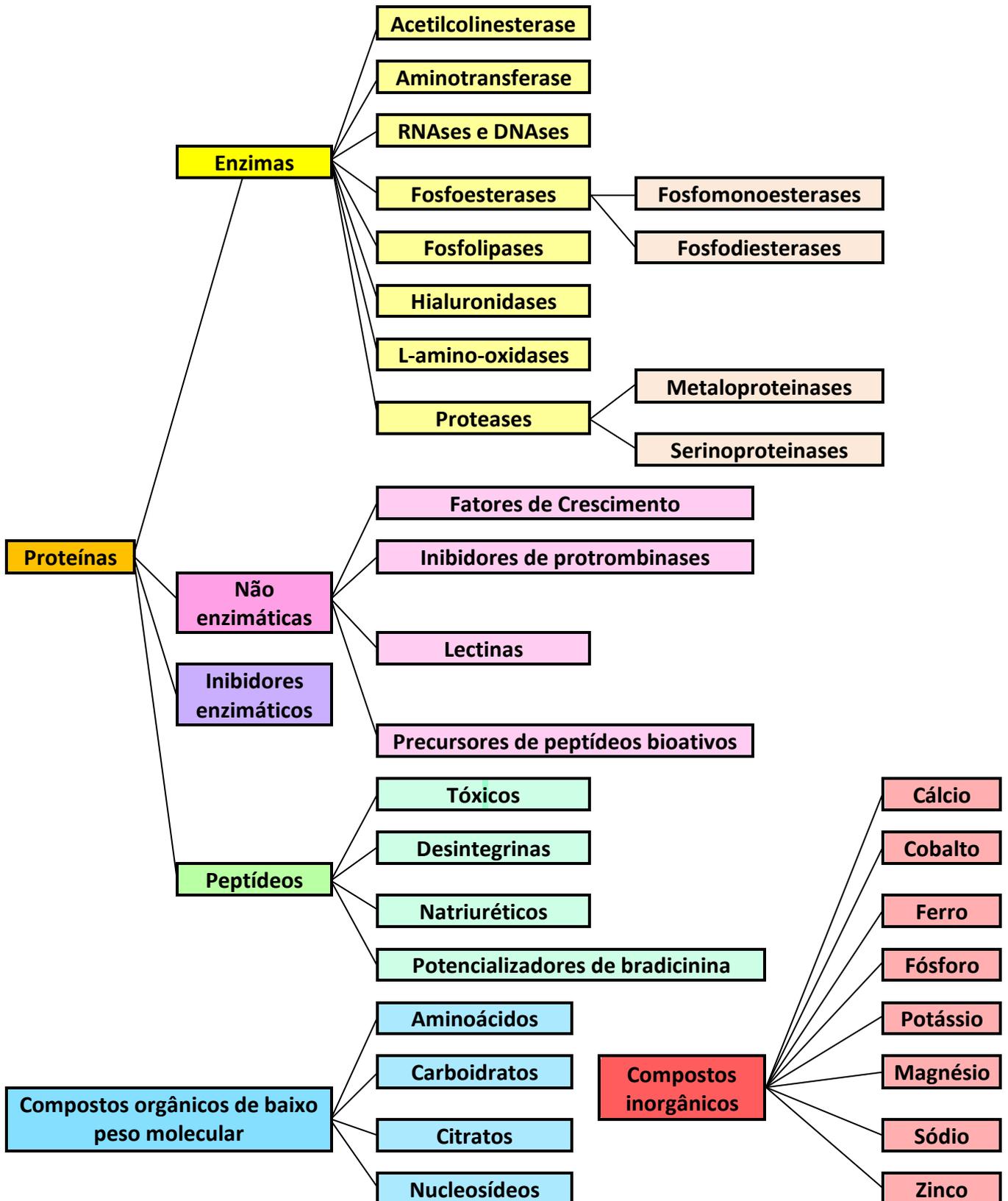
2.1 A Importância de Estudos de Peçonhas e Toxinas

Durante a evolução, as serpentes se especializaram em afetar as funções vitais de suas presas, por via de suas peçonhas. As serpentes dos gêneros *Bothrops* ou *Crotalus* liberam um elevado número de toxinas (enzimas, proteínas e peptídeos) que desestabilizam os níveis fisiológicos dos hormônios, alteram atividade das enzimas, receptores, ou canais iônicos promovem o desequilíbrio do sistema cardiovascular e nervoso de suas presas. As toxinas das serpentes são cada vez mais usadas como ferramentas farmacológicas e como protótipos para o desenvolvimento de drogas (PAIOLI, 2011).

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

A peçonha de serpentes contém componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que cerca de 90% são proteínas enzimáticas ou não enzimáticas, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (GUTIERREZ, 2002). Enquanto isso os componentes inorgânicos mais comuns são Ca^{++} , Cu^+ , Fe^{++} , K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Na^+ , P^+ , Co^{++} , e Zn^{++} , sendo que alguns exercem função de mantenedores de estabilidade estrutural de certas proteínas, como as metaloproteinases, que são fatores hemorrágicos e outros funcionam como catalisadores em funções enzimáticas específicas (FRIEDERICH; TU, 1971; BJARNASON; FOX, 1988/89), como mostra na Figura 1 a seguir.

Figura 1 – Principais componentes da peçonha de serpentes.



Fonte: RAMOS; ARAÚJO, S., 2006.

Atualmente há um grande número de toxinas purificadas e caracterizadas a partir de peçonhas de serpentes, sobretudo de várias espécies Bothrops (THEAKSTON; KAMIGUTI, 2002); dentre essas, o complexo enzimático das fosfolipases (PLAs), formação de araquidonato, desestruturação de membrana, interferência em processos de agregação plaquetária, miotoxicidade e neurotoxicidade, entre outras ações (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995). Em contraste com a vasta literatura existente sobre as peçonhas de serpentes proteróglifas e solenóglifas, observa-se pouca investigação quanto à peçonha de serpentes opistóglifas. Portanto, a composição das secreções orais tóxicas de colubrídeos e dipsadídeos são pouco conhecidas, apesar da grande diversidade de espécies de serpentes onde essas glândulas são descritas (ZINGALI *et al.*, 2011).

Os fatores segundo os quais a maioria das espécies produz pouca quantidade de peçonha e a ineficácia dos métodos de extração sustentam as dificuldades de pesquisa nesta área.

É importante ressaltar, também, que a intensidade dos sintomas após envenenamento está relacionada com a quantidade de peçonha inoculada, que por sua vez, depende do tamanho, da idade da serpente, como também do tempo em que foi alimentada.

O conhecimento dos mecanismos de ação das toxinas e antitoxinas animais e vegetais faz-se necessário para a busca de técnicas de diagnóstico, tratamentos alternativos ao envenenamento e/ou para o desenvolvimento de novos fármacos (SOARES, 2005).

Essas toxinas estão, normalmente, envolvidas em mecanismos de defesa, além de possuírem características de letalidade, uma vez que são utilizadas para captura, abate e digestão de possíveis inimigos ou presas. Para tal, elas devem ser biologicamente ativas, havendo possíveis aplicabilidades terapêuticas para elas. Essa atividade estimula estudos que podem contribuir para o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas ou a compreensão de mecanismos de ação, proporcionando a melhoria nos protocolos de tratamento de pacientes envolvidos em acidentes com esses seres vivos (LEWIS; GARCIA, 2003). Como exemplos de aplicações dessas toxinas na terapêutica, temos a toxina botulínica, derivada de micro-organismos, que é amplamente utilizada na Medicina estética e em pacientes

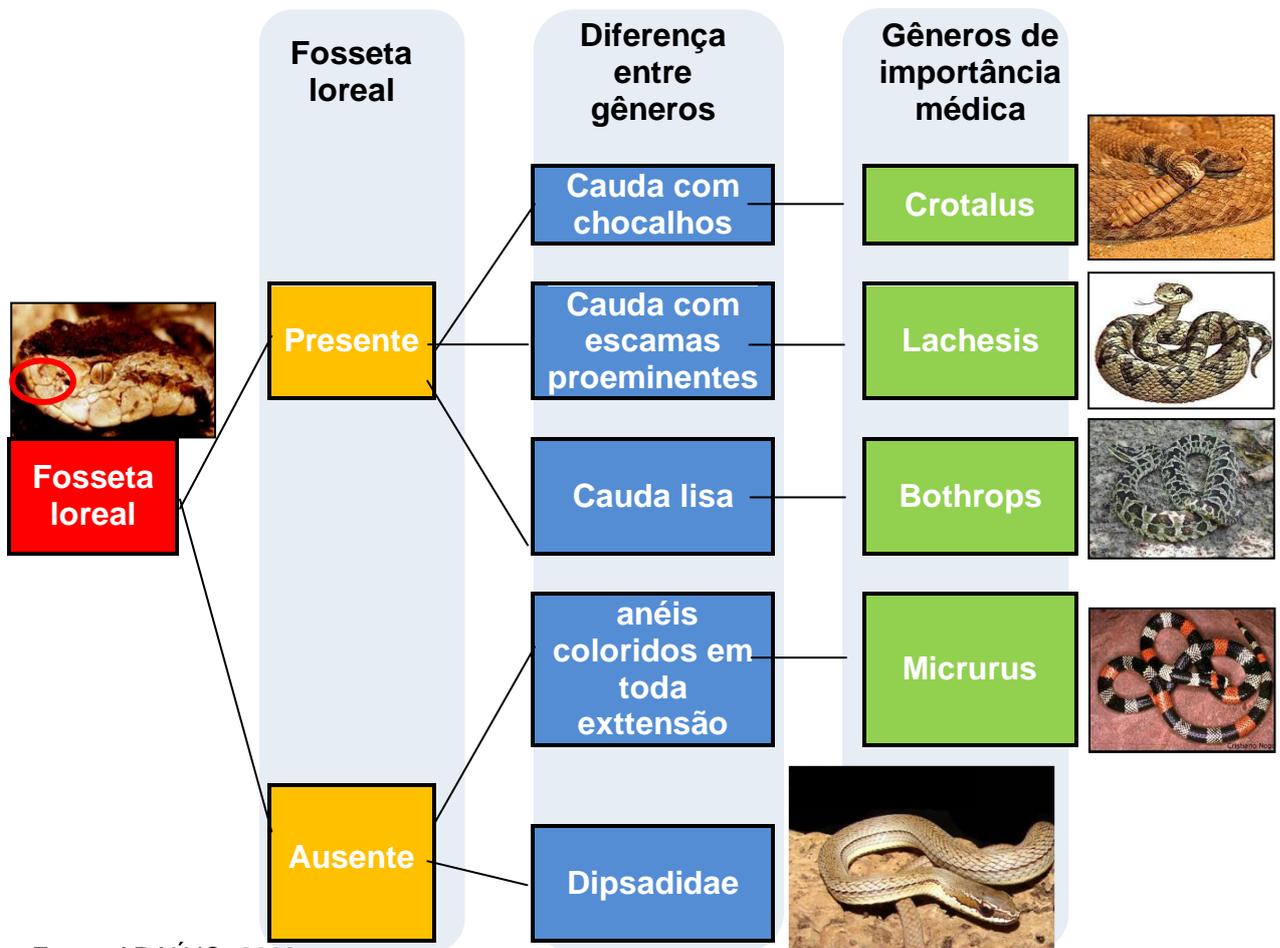
com patologias motoras, e o *curare*, alcaloide letal que é um bloqueador neuromuscular introduzido na prática da anestesiologia em procedimentos cirúrgicos. Esse alcaloide serviu de protótipo para o desenvolvimento do relaxante muscular conhecido como atracúrio (HARVEY *et al.*, 1998). Outro exemplo clássico da literatura científica foi a utilização do peptídeo oriundo da peçonha de uma serpente (*Bothrops jararaca*), utilizada como protótipo para o tratamento de doenças cardiovasculares com ampla aplicabilidade clínica. Esse agente terapêutico é o captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina, cujos estudos de sua atividade foram iniciados por ROCHA; SILVA *et al.* (1949), culminando com as pesquisas de Ferreira (1965) e concluindo com a estrutura da molécula por Cushman e Odentti (LEWIS; GARCIA, 2003).

2.2 As Serpentes Brasileiras

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), Dipsadidae (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. O perfil epidemiológico do ofidismo demonstra que as principais vítimas são indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária entre 15 e 49 anos e registrando uma letalidade geral de 0,45% (Fonte: (http://www.cobrasbrasileiras.com.br/serpentes_classificacao.html)).

As principais características e representantes de serpentes brasileiras estão representadas na Figura 2.

Figura 2 – Características Biológicas das Principais Serpentes Brasileiras.



Fonte: ARAÚJO, 2003.

As serpentes peçonhentas no Brasil pertencem a duas famílias: Viperidae (acidentes botrónico, crotálico e laquético) e Elapidae (acidente elapídico). As taxas de letalidade revelam que 90% são acidentes botrónicos (letalidade de 0,31%), seguidos de crotálicos (7,7%, com 1,87% de letalidade), laquéticos 1,4% (0,95% de letalidade) e elapídicos 0,4% (0,52 % de letalidade). A classificação das serpentes é essencial para o reconhecimento das espécies de importância médica, na formulação do antipeçonha no tratamento dos pacientes (BERNARDE, 2000).

As mudanças taxonômicas ocorreram dentro das famílias Elapidae e Viperidae; espécies novas foram sinonimizadas e outras revalidadas ou elevadas da categoria de subespécie para espécie (NÚNEZ *et al.*, 2009).

As serpentes do gênero *Bothrops* estão atualmente distribuídas em cinco gêneros: (1) *Bothriopsis* com duas espécies de ocorrência na Amazônia,

Mata Atlântica e no Nordeste (BA, SE, AL, PE, PB, e CE); (2) *Bothrocophias hyoprora* é a única representante desse gênero no Brasil Paraná e Rondônia; no gênero (3) *Bothropoides*, foram alocadas 11 espécies anteriormente incluídas em *Bothrops*, de ocorrência nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro Oeste do Brasil; uma espécie de (4) jararaca-pintada, na região norte do País nas áreas de cerrado, Amazonas e sul de Rondônia destaca-se como do gênero (5) *B. Jararaca*.

Nessa nova classificação proposta (FENWICK *et al.*, 2009), permaneceram no gênero *Bothrops* com oito espécies presentes em todas regiões do Brasil. Nesse gênero, encontram-se a *Bothrops moojeni* e *B. jararacussu*. Quatro espécies anteriormente pertencentes a *Bothrops* estão agora no gênero *Rhinocerophis*, ocorrendo nas regiões Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, com a espécie *R. Alternattus*.

As serpentes cascavéis (*Caudisona durissa*), anteriormente pertencentes ao gênero *Crotalus* foram recentemente alocadas no gênero *Caudisona* (HOSE; 2009). O acidente com essas serpentes é denominado crotálico e elas são facilmente reconhecidas pela presença do guizo ou chocalho na parte final da cauda. Ocorrem nos cerrados do Brasil central, nas regiões áridas e semiáridas do Nordeste, nos campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte (SILVA *et al.*, 2008).

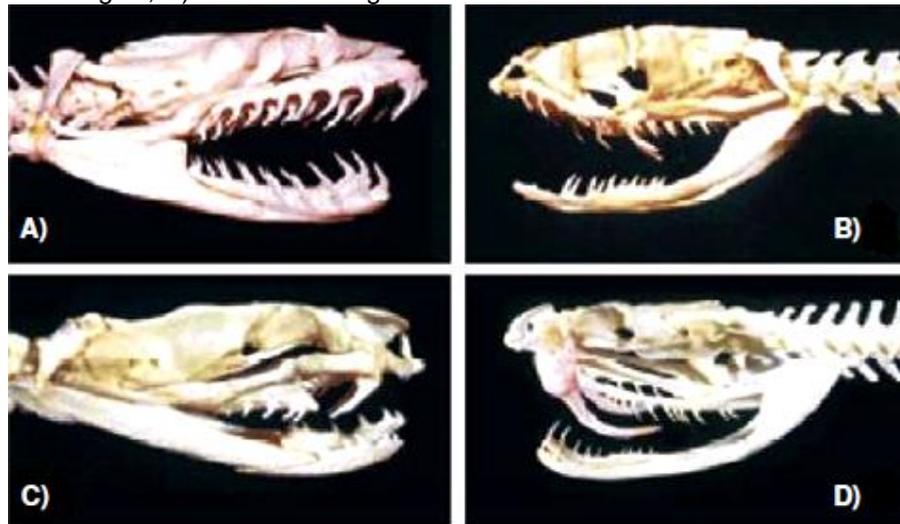
As serpentes do gênero *Lachesis* a maior espécie peçonhenta também conhecida como a surucucu-pico-de-jaca (*Lachesis muta*), e os acidentes com essas serpentes são denominado de laquético. E duas subespécies eram reconhecidas, *L. m. muta da* Amazônia e *L. m. Rhombeata* da Mata Atlântica, é uma espécies monotípica (sem subespécies) (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Os Elapidae compreendem as corais-verdadeiras. Espécies dessa família diferem dos viperídeos por não apresentarem fosseta loreal e possuírem dentição proteróglifa, cabeça arredondada com olhos pequenos e pupilas redondas, além de escamas cefálicas grandes (PASSOS, 2012). Essa família apresenta dois gêneros: *Leptomicrurus*, com três espécies, de ocorrência na Amazônia e *Micrurus* em todo o Brasil. O nome popular das *Micrurus* se deve ao padrão coralino com anéis coloridos ao longo do corpo (SILVA; SITES, 1999).

A importância e necessidade dessas mudanças na classificação estão no fato de apresentarem as relações de parentesco entre as espécies e isso implica as similaridades e diferenças entre a complexa variação da peçonha.

Apesar de tradicionalmente serem chamadas de peçonhentas apenas as espécies de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae, alguns casos de envenenamento em humanos foram ocasionados por espécies de colubrídeos com dentições o opistóglifas (dentes inoculadores localizados na região posterior da maxilar superior) e áglifas (sem dentes especializados na inoculação de peçonha (NICKERSON; et al, 1976; PUORTO; et al, 2003) (Figura 3).

Figura 3 – Aspecto morfológico do crânio de serpente conforme as séries de dentição. A) Serie Aglifa B) Série Opistóglifa; C) Série Proteróglifa; D) Série Solenóglifa.

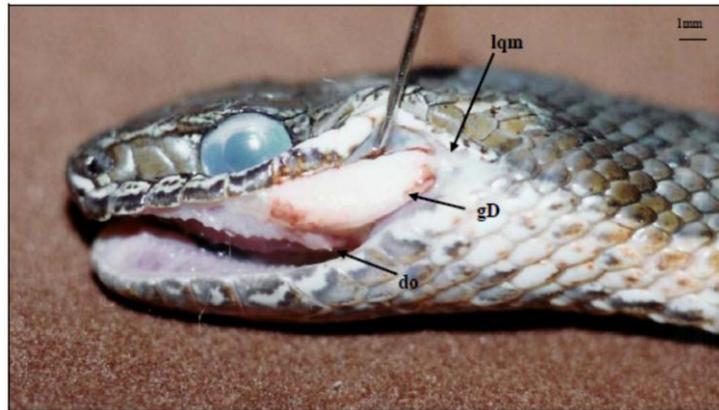


Fonte: LOPES, P.H, 2008 .

Alguns Colubridae apresentam glândulas tubulares complexas denominadas glândulas de Duvernoy (TAUB, 1966). São glândulas localizadas na região temporal, supralabial, atrás dos olhos, compostas principalmente de células serosas dispostas em lóbulos que se abrem em um duto lobular. Esta estrutura mostra ampla gama de variações, com transições desde a ausência da glândula até a presença de somente células serosas em glândulas totalmente diferenciadas (TAUB, 1966).

A glândula de Duvernoy é homóloga às verdadeiras glândulas de peçonha das proteróglifas e solenóglifas (KOCHVA, 1963; GYGAX, 1971; OVADIA, 1984). Ambos os tipos de glândulas fazem parte do sistema alimentar das serpentes, estando envolvidos primariamente com o comportamento predatório (KARDONG, 2002). A função biológica das secreções orais em serpentes contribui decididamente para o sucesso da captura da presa (alimento), deglutição e digestão, sendo muitas vezes utilizadas em situações de defesa (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Glândula de Duvernoy de *Philodryas nattereri* (gD); dente opistóglifo (do); ligamento quadrato-maxilar (lqm).



Fonte: Serapicos, E. O.

O crânio das serpentes deste gênero mostra um maxilar com uma redução ao comprimento, e um alongamento do osso quadrado na região superior, ligado ao osso esquamosal, que se apresenta reduzido (BARBARINI, 1998).

Figura 5 - Dentição opsitóglifa.



Fonte: PUORTO, G.

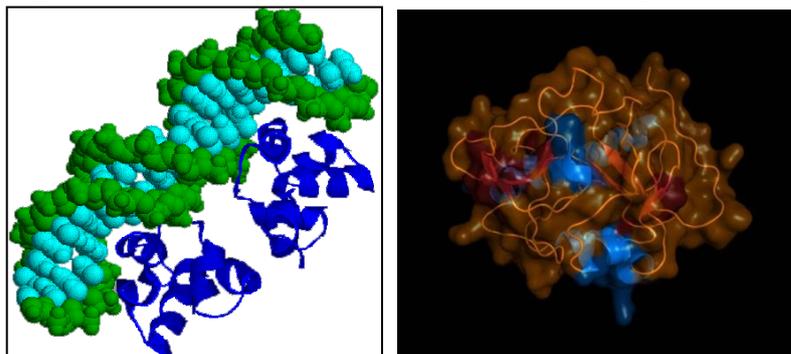
Estudos filogenéticos dividiram os colubrídeos em duas famílias: Colubridae e Dipsadidae (ZAER; *et al*, 2009). Os gêneros de serpentes áglifas e opistóglifas que ocorrem no Brasil e que tiveram casos registrados de envenenamento são: *Apostolepis*, *Boiruma*, *Clelia*, *Erythrolamprus*, *Hydrodynastes*, *Liophis*, *Oxyrhopus*, *Phalotris*, *Philodryas*, *Sibynomorphus*, *Thamnodynastes* e *Tomodon* (ARAÚJO; *et al* 2003; DIAZ; *et al*, 2004).

2.3 Atividade das Peçonhas

2.3.1 Atividade Proteolítica

Esta atividade é atribuída à complexa mistura de enzimas proteolíticas conhecidas por produzirem também os efeitos locais da peçonha (Figura 6). Os fatores da peçonha responsáveis por esta atividade incluem fosfolipases, proteases e toxinas polipeptídicas, que destroem membranas e células. O modo de ação pode ser direto por destruição celular ou secundário pela ativação de mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos, prostaglandinas e outras substâncias (VARGAFTIG *et al.*, 1974). Edema e necrose são os mais importantes sintomas locais observados em envenenamentos humanos. Além desses efeitos locais, peçonhas proteolíticas podem produzir efeitos sistêmicos importantes, tais como choque, alterações na cascata de coagulação sanguínea, agregação plaquetária e liberação de autacoídes endógenos como histamina, serotonina e bradicinina (BRAZIL, 1982).

Figura 6 – Estrutura de Proteínas Proteolíticas da Peçonha.

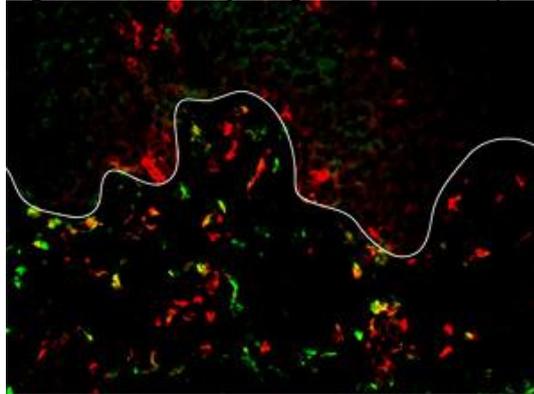


Fonte: [http://www.google.com.br/imagens/proteínas proteolíticas.](http://www.google.com.br/imagens/proteinas%20proteolitic)

2.3.2 Atividade Inflamatória

Aminas biogênicas pré-formadas do tipo histamina, peptídeos ou proteínas como fosfolipase A₂, esterases, proteases, enzimas liberadas de cininas (calicreínas, cininogenases) e lectinas são responsáveis pelos fenômenos locais (Figura 7).

Figura 7 – Inflamação aguda Imunohistoquímica.



Fonte: <http://www.google.com.br/imagens/inflamaçãoaguda>.

As frações da peçonha frequentemente possuem atividade indireta, induzindo ou liberando potentes substâncias autacoides, como a bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, que atuam de maneira complexa e inter-relacionada. Muitas vezes, uma só fração da peçonha pode liberar várias substâncias com atividade inflamatória (LOPES, 2008). A inflamação é uma reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local, podendo ser aguda ou crônica, dependendo do tipo e persistência do agente lesivo. Na resposta inflamatória, são característicos: 1) o aumento de fluxo sanguíneo com vasoconstrição transitória e vasodilatação das arteríola; 2) aumento da permeabilidade vascular – com exudação de proteínas plasmáticas para fora da circulação, o que resulta na formação do edema e 3) o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão – leucócitos, principalmente neutrófilos que migram da circulação, passando entre as células endoteliais, para os tecidos extracelulares. Estes eventos ocorrem principalmente em decorrência da liberação de mediadores inflamatórios no tecido em virtude da lesão local (SAADI *et al.*, 2002).

Vários são os mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo, dentre eles os metabólitos lipídicos e seus derivados, como as prostaglandinas, os leucotrienos as lipoxinas, originados fosfolipídios de membrana, as aminas vasoativas, citosinas entre outros, que atuam como importantes moduladores da resposta inflamatória. Estes mediadores inflamatórios, são produzidos, entre outras, por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos, em resposta a uma variedade de estímulos que podem ser exógenos ou endógenos (CABRAL, 2005).

Os mediadores lipídicos são produzidos pela ação da enzima PLA₂ sobre os fosfolipídios de membrana, principalmente o ácido araquidônico e seus derivados, os eicosanoides, que são mediadores de diversas condições patológicas, especialmente nos processos inflamatórios (CABRAL, 2005). É importante ressaltar que, no desenvolvimento do quadro local agudo, pode haver a participação da atividade coagulante, desencadeando a formação de trombos na microvasculatura, em conseqüente hipóxia, agravamento do edema e necrose tecidual, e atividade hemorrágica, determinada pelas toxinas do quadro inflamatório, mediante sua atividade sobre o fator de necrose tecidual (TNF) pré-formado, liberando citosina ativa, que tem potente atividade inflamatória (MOURA-DA-SILVA, *et al.*, 1996).

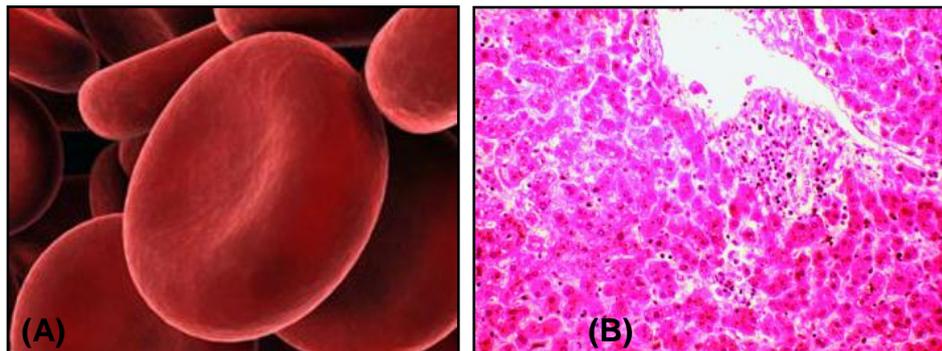
2.3.3 Atividade sobre Plaquetas e Coagulação

A peçonha das serpentes *Bothrops* possui a capacidade de ativar fatores da coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo, frequentemente, incoagulabilidade sanguínea e podendo levar à fibrinogenemia (KAMIGUTI; CARDOSO, 1989; KAMIGUTI; SANO-MARTINS, 1995). A maioria dessas peçonhas possui substâncias que são isolada ou simultaneamente capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fator X. São também descritos fatores com atividade sobre a agregação plaquetária. Trombocitopenia pode ocorrer nas primeiras horas e, eventualmente, durar dias. Os fatores ativadores da cascata de coagulação presentes nas peçonhas das viboras sul-americanas agem em três diferentes pontos: Fator I (atividade *thrombin-like*), Fator II Protrombina e Fator X (atividade pró-coagulante) (NAHAS, *et al*, 1979).

2.3.4 Atividade Hemorrágica

Essa atividade é atribuída a componentes específicos denominados hemorrágicos, metaloproteinases que contêm zinco. Estas moléculas podem romper a integridade do endotélio vascular. Degradam vários componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo IV, fibronectina e laminina. Além disso, são potentes inibidores da agregação plaquetária (LOMONTE, 1994), como mostra a figura 8. Tem como possíveis mecanismos de ação a digestão enzimática da lâmina basal da microvasculatura e a ruptura completa das células endoteliais ou formação de *gaps*. As clivagens específicas em pontos-chave desencadeiam mecanismos endógenos, sendo que, atualmente, há clara evidência de ataque proteolítico à lâmina basal vascular (GOULD, *et al.*, 1990; BJARNADSON; FOX, 1994; KAMIGUTI, *et al.*, 1992 e 1994).

Figura 8 – (A) Hemácias; (B) Hemorragia no tecido renal.

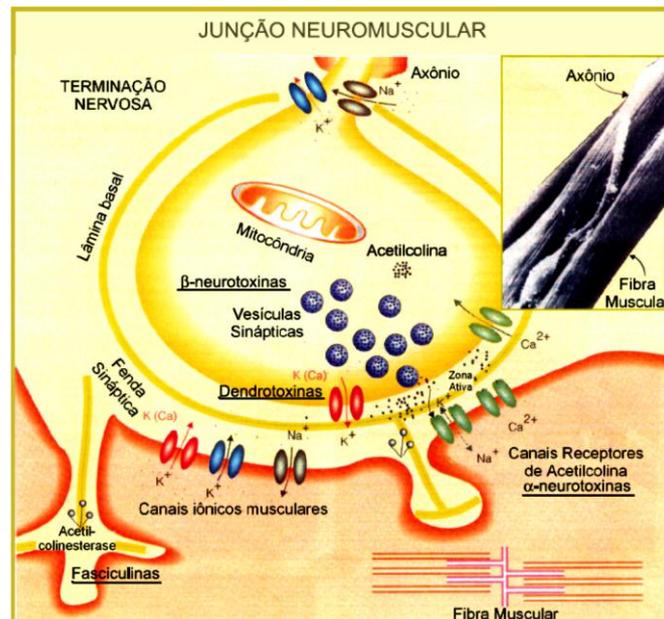


<http://www.google.com.br/imagens/hemácias/hemorragia>.

2.3.5 Atividade Neurotóxica

A atividade neurotóxica é causada por neurotoxinas pré-sinápticas que atuam em terminações nervosas motoras, inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos. Essa inibição é a principal responsável pelo bloqueio neuromuscular e, portanto, pelas paralisias respiratórias e motoras observadas nos animais. Na peçonha de *Crotalus*, foi identificada a crotóxina como sendo uma neurotoxina de ação pré-sináptica, além de outras como a crotamina, giroxina e a convulxina, cujos efeitos caracterizados experimentalmente não são identificados nas manifestações do envenenamento humano (VITAL BRAZIL, 1972, 1980).

Figura 9 – Mecanismo de Envenenamento Laquético.



Fonte: Damico, 2006.

Esse tipo de mecanismo de ação pode também ativar o sistema nervoso autônomo parassimpático e levar a diversos sintomas ditos neurológicos, como ocorre no envenenamento laquético, como mostra na Figura 9.

2.3.6 Atividade Miotóxica

O envenenamento *por Crotalus* causa necrose muscular atribuída à crotalina, composta pela crotapotina (sem atividade enzimática) e fosfolipase A₂. A Figura 10 mostra edema em humanos envenenados por *Crotalus*. Foi descrita pela primeira vez em 1985 (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985). Modificação por necrose degenerativa e sinais de regeneração em fibras dos tipos I e IIa de músculo estriado tem sido observados (CUPO *et al.*, 1992). Na mionecrose, as modificações morfológicas estão associadas ao acréscimo nos níveis plasmáticos de creatinoquinase, uma enzima intramuscular frequentemente utilizada como marcador de lesão muscular (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989). Experimentalmente, muitas espécies de serpentes induzem miotoxicidade (GUTIÉRREZ *et al.*, 1992) e a correlação destes achados com o aspecto clínico dos envenenamentos ainda não está totalmente clara.

Figura 10 – Edema leve induzido pela peçonha.

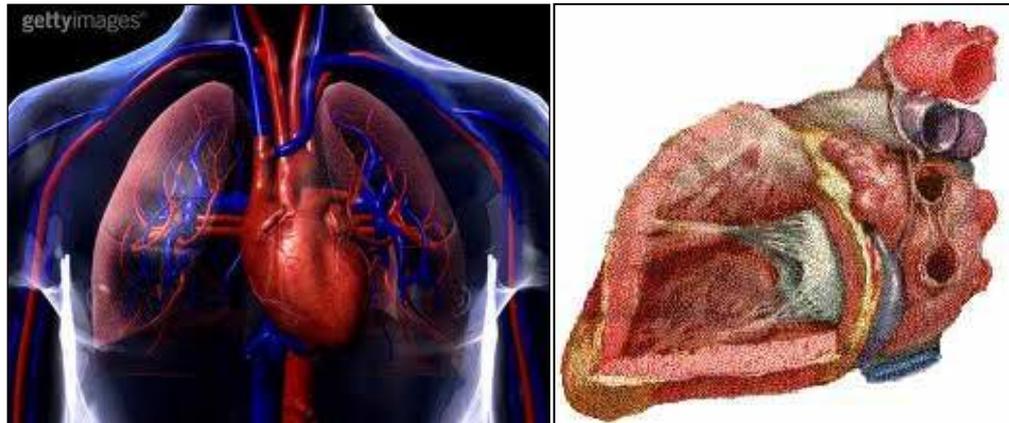


Fonte: <http://www.google.com.br/imagens/edemaleve>.

2.3.7 Atividade Cardiovascular

A atividade cardiovascular é causada pela liberação de substâncias farmacologicamente ativas (bradicinina, histamina, 5-hidroxitriptamina e prostaglandinas) dos tecidos, pela ação das peçonhas e estas podem contribuir para o choque circulatório produzido por peçonha de viperídeos e elapídeos. Vale ressaltar que algumas peçonhas contêm enzimas coagulantes ou pró-coagulantes, as quais podem produzir coagulação intravascular e contribuir para as modificações cardiovasculares observadas (LEE; LEE, 1979). O maior efeito hemodinâmico produzido por peçonha que detém esta atividade em geral é uma imediata e profunda queda da pressão sanguínea sistêmica, seguida pelo choque secundário. Efeitos hipotensivos já foram descritos para algumas peçonhas de *Micrurus* (RAMSEY *et al.*, 1972; FRANCIS *et al.*, 1993) Figura 11.

Figura 11 – (A) Sistema cardiovascular; (B) Efeito da pressão do coração (PP).



Fonte: <http://www.google.com.br/imagens/sistemacardiovascular>.

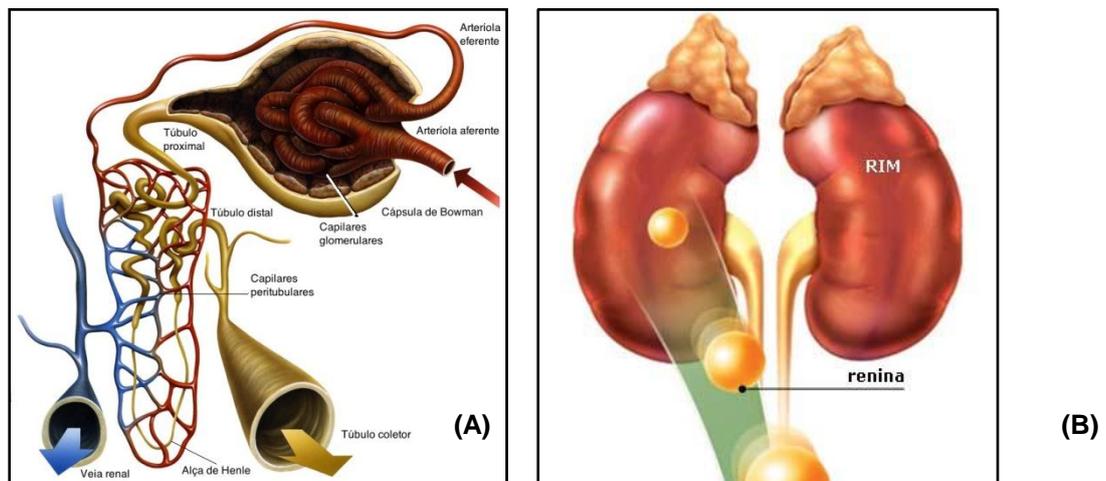
A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* produz efeitos cardiovasculares, como coagulopatias, sangramentos sistêmicos, hipotensão arterial e insuficiência renal. Os mecanismos envolvidos na hipotensão causada por peçonha de botrópicos não tem sido estudados sistematicamente, apesar do envolvimento da bradicinina ser conhecido há mais de 50 anos (ROCHA E SILVA, *et al.*, 1949).

2.3.8 Atividade Nefrotóxica

A insuficiência renal aguda (IRA) e diversas alterações renais são descritas após o envenenamento ofídico, dentre as quais glomerulonefrite, glomerulite, nefrite intersticial, artrite, necrose tubular, necrose cortical e insuficiência renal (SITPRIJA, 2006). A IRA é a alteração mais grave, seguida na incidência de necrose tubular aguda, ocasionalmente, glomerulonefrite (COLARES-BUZATO *et al.*, 2002). Muitos fatores são implicados na patogênese da IRA induzida pelo envenenamento botrópico, como vasoconstrição renal e consequente isquemia renal, hemólise, deposição de fibrina glomerular, lesão vascular, liberação de substâncias vasoativas, deposição de complexos imunes e ação nefrotóxica direta pela atividade proteolítica da peçonha (SITPRIJA, 2006). Alterações hemodinâmicas desempenham um papel importante na patogênese da IRA induzida pelo acidente botrópico. Histamina, cininas, eicosanoides, fator de ativação plaquetária (PAF), catecolaminas e endotelina, são alguns dos mediadores

envolvidos (MORAIS, 2011) dentre as alterações cardiovascular e renais, foi verificada liberação de substâncias vasoativas após acidente por víbora de Russell e aumento de concentrações plasmáticas de norepinefrina, epinefrina, dopamina, tromboxano e endotelina, como mostra a seguir nas Figuras 12A e 12B. O envenenamento por *Bothrops* induziu elevações significativas de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e NO (SITPRIJA, 2006). Contém uma variedade de fosfolipases, miotóxicas básicas que exercem diversos efeitos biológicos em diferentes tipos celulares (GUTIERREZ e OWNBY, 2003). A atividade fosfolipásica pode produzir diversas prostaglandinas, vasodilatadoras renais responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e consequente diurese, natriurese e caliurese ou por outro lado liberação de PGF $_2\alpha$ que tem ação vasoconstrictora. Por meio da cicloxigenase e PLA $_2$ pode ativar o tromboxano A $_2$, que também tem ação vasoconstrictora, promovendo redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BARBOSA, *et al.*, 2002).

Figura 12 – (A) Glomerulonefrite; (B) Alterações renais.



Fonte: <http://www.google.com.br/imagens/alteraçõesrenais>.

2.4 Epidemiologia

O perfil epidemiológico dos acidentes causados por serpentes não peçonhentas foi traçado a partir de estudos, verificando-se que o número de relatos sobre picadas causadas por serpentes não peçonhentas aumentou consideravelmente, tornando-se um problema de saúde pública (BIGELLI; *et al.*, 2012). Entre todos os acidentes registrados no País, 40% são causados por

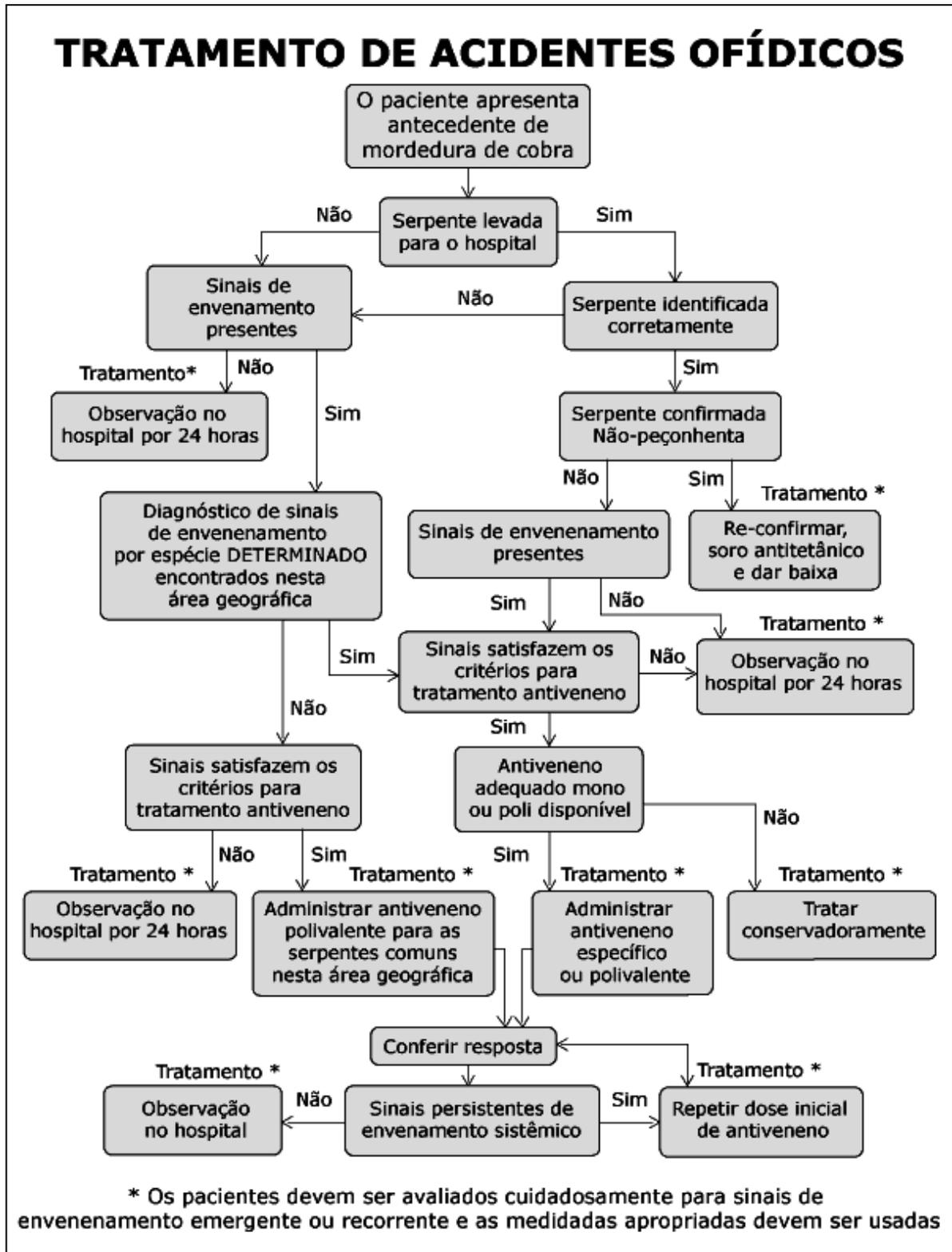
serpentes não peçonhentas. Numa tentativa de prevenir acidentes, é necessário identificar todas as espécies do ano e a hora do dia em que esses acidentes ocorrem, e as situações mais frequentes envolvendo esses acidentes ofídicos, (SINAN, 2011). Os acidentes causados pela família Dipsadidae, cujos gêneros são *Philodryas nattereri* e *Philadryas offersi*, têm manifestações clínicas semelhantes aos acidentes com Bothrops, destacando-se hemorragia local, desenvolvimento do processo inflamatório e/ou necrose, podendo apresentar ou não sintomas de ordem sistêmica (KUCH; MEBS, 2002; PUORTO; FRANÇA, 2003).

Várias ocorrências foram citadas como agentes causadores em suas vítimas, principalmente as manifestações locais, como dor, edema e bolhas. Dos sintomas sistêmicos, foram citados febre, mal-estar geral, intranquilidade e angústia (SCHENOME; REYES, 1965). A maioria das manifestações pode ser causada tanto pelo trauma mecânico da picada como pela atividade local das toxinas presentes na peçonha (ACOSTA *et al.*, 2003b; ROCHA, 2005).

Outros relatos mostram que são diversas as espécies de Dipsadidae capazes de causar acidentes humanos em várias partes do mundo.

Esquema apresentado na Figura 13 mostra os acidentes das serpentes Dipsadidae foram tratados com soro antiofídico, porém nem sempre o resultado desse tratamento é eficaz, podendo desencadear reações alérgicas e agravar o quadro clínico do paciente (BIGELLI; *et al*, 2012). Como citado anteriormente, em nosso País, duas famílias de serpentes são de interesse em saúde pública – a Elapidae e Viperidae. A família Viperidae formada por vários gêneros: *Bothrops* responsável por 90% dos acidentes no País; o gênero *Crotalus*, responsável por 7% dos acidentes; e os gêneros *Lachesis* e *Micrurus* 0,5%, e 1% das famílias Colubridae e Dipisadidae (CASTRO; 2006).

Figura 13 – Tratamento de Acidentes Ofídicos.



Fonte: <http://br.images.search.yahoo.com>.

2.5 O Gênero *Philodryas*

O gênero *philodryas* é composto por 17 espécies restritas à América do Sul e com ampla distribuição geográfica, sendo que dez destas ocorrem no Brasil: *P. Aestivus* (DUMÉRIL, 1854); *P. Arnaldoi* (AMARAL, 1933); *P. Mattogrossensis* (KOZOLOWISKI *et al.*, 1999); *P. Nattereri* (STEINDACHNER, 1870); *P. Viridissimus* (LINNAEUS, 1758); *P. Olfersii* (LICHTENSTEIN, 1823); *P. Patagoniensis* (GIRARD, 2007); *Philodryas livida* (AMARAL, 1933); *Philodryas oligolepis* (GOMES *et al.*, 2005); *Philodryas psammophidea* (GUNTHER, 1872).

No Brasil, estas espécies são encontradas em áreas das regiões Nordeste e Centro-Oeste e em toda a região Sudeste e Sul, estendendo-se até a Patagônia (HARTMANN; MARQUES, 2006).

Registros de acidentes causados por colubrídeos, hoje dipsadídeos datam do início do século XIX (ROCHA *et al.*, 2003). Embora a maioria dos registros não declare sérias consequências nos acidentes causados por serpentes opistóglifas, vários relatos ressaltam a importância de suas toxinas.

Os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Philodryas* caracterizam-se por ação local intensa, com dor, edema, hemorragia, sangramento passageiro e leve aumento de temperatura no local da picada, eritema, equimose com coagulação normal (RIBEIRO *et al.*, 1999). A maioria das manifestações pode ser causada tanto pelo trauma mecânico da picada como pela atividade local das toxinas presentes na peçonha (ACOSTA *et al.*, 2003b; ROCHA, 2005).

Um caso relatado de acidente humano com *Philodryas patagoniensis* mostra proeminente efeito local, que não aparece imediatamente. Após 15 minutos, no entanto, o paciente se queixou de uma constante sensação de prurido, provavelmente causada por uma reação alérgica à peçonha. Após poucos minutos, um inchaço local se desenvolveu e rapidamente se espalhou por todo o membro acometido, alcançando mais tarde as axilas. Este quadro perdurou por 15 dias, o paciente se queixava de intensa dor, perdendo temporariamente parte dos movimentos (ARAÚJO; SANTOS, 1997). Como citado anteriormente, os acidentes com serpentes do gênero *Philodryas* demonstraram atividades semelhantes à peçonha botrópico (Figura 14).

Figura 14 – Acidentes causados por serpentes *Philodryas nattereri*. (A) edema; (B) edema com controle, mão esquerda não picada e mão direita picada pela serpente; (C) mão após tratatamento; (D) *Philodryas nattereri*.



Fonte: <http://br.images.search.yahoo.com/search/images>.

2.5.1 *Philodryas nattereri*

Philodryas nattereri conhecida como “corre-campo” ou “tabuleiro”, é uma das mais comuns na caatinga e semiárido brasileiros, com uma cor marrom ou cinzenta, e muito veloz, possuindo hábitos terrícolas. Estudos recentes mostram que são capazes de utilizar ambientes arbóreos com muita eficiência. É uma espécie de hábitos diurnos, caçando vários tipos de presas, como pássaros, mamíferos, lagartos, anfíbios, ovos de lagartos e até outras serpentes. Ao anoitecer elas se recolhem para repousar (MESQUITA *et al.*, 2011) (Figura 15).

Figura 15 – *Philodryas nattereri*.



Fonte: foto produzida pela autora, 2012.

Philodryas nattereri são serpentes com dentição opistóglifa e com a glândula de Duvernoy bem desenvolvida, conectada a um dente sulcado, especializado para a inoculação de toxinas (MARQUES *et al.*, 2001). Estes animais camuflam-se para se confundirem com as folhagem do solo, (estratégia de defesa). São normalmente agressivos, podendo desferir botes com mordidas (MARQUES *et al.*, 2001).

Possuem uma dentição pequena, com dois dentes posteriores maiores localizados exatamente abaixo do ectopterigoide, como mostrado na figura 5. Estes dentes maiores são sulcados e o osso maxilar inferior mostra-se mais largo, próximo à articulação (BARBARINI, 1998).

A glândula de Duvernoy está localizada na região pós-orbital inferior, aderida à musculatura de coloração rósea. Essa glândula apresenta forma ovulada, com superfície granular e coloração esbranquiçada, com a consistência firme à compressão. É constituída por túbulos secretores e dutos excretores envolvidos por tecido conjuntivo denso, vasos sanguíneos e nervos. Os túbulos são caracterizados por apresentar em células prismáticas, com citoplasma acidófilo e núcleos cilíndricos de cromatina densa, localizados em sua maioria na porção basal das células secretoras.

Observa-se a presença de algumas células mucosas, constituindo os túbulos secretores, nos quais a luz mostra muito pouco ou nenhum conteúdo (BARBARINI, 1998).

2.5.2 A Peçonha de *Philodryas nattereri*

A peçonha da *Philodryas nattereri* parece ser bastante ativa tanto quanto a da *Philodryas olfersii*, se julgarmos pelos efeitos locais (SAZIMA; HADAD, 1992), no entanto, nos casos já relatados em experimentos executados *in vitro* e *in vivo* (LOPES, 2008). Os sinais locais e sintomas causados por *P. olfersii* e *P. patagoniensis* exibem alguns efeitos semelhantes aos citados com as serpentes, *P. nattereri* que mostram efeitos locais, como dermonecrose, mionecrose e atividade edematogênica, além de alta atividade hemorrágica, contendo enzimas (metaloproteases hemorrágicas) que causam danos ao endotélio vascular pela perfuração da membrana basal das paredes dos vasos (PEICHOTO *et al.*, 2005), atividade proteolítica, fibrinogenolítica e proeminente processo inflamatório. Demonstra, também, algumas alterações na homeostase, como a atividade de enzimas que hidrolisam componentes plasmáticos. Estas atividades em conjunto com aquelas que agem sobre a parede dos vasos sanguíneos, levam a uma atividade hemorrágica, e podem resultar em sequelas permanentes ou até causar a morte de vítimas mordidas por estas serpentes (PEICHOTO *et al.*, 2005).

Dentre as alterações locais encontradas em envenenamentos por serpentes *P. nattereri* são comuns às mesmas desse gênero – dor, edema, hemorragia local e dermonecrose, podendo ocorrer também a degranulação de mastócitos, lesões musculares decorrentes da ação direta ou indireta de toxinas presentes na peçonha, além de alterações microcirculatórias, promovendo o início da resposta inflamatória e consequente infiltrado leucocitário para o local da inflamação (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003).

O recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação é um processo que contém vários mecanismos de ação, envolvendo os leucócitos circulantes e as células endoteliais. Tal processo é regulado por moléculas de adesão, como as citosinas TNF, IL-1, quimiocinas e selectinas endoteliais (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O reconhecimento da importância do dano tecidual local e sistêmico por envenenamentos com serpentes do gênero *Philodryas* motiva um crescente número de estudos sobre sua patogênese, o que pode resultar em novas modalidades na terapêutica desses acidentes, assim como o conhecimento de mecanismos de injúria de células e tecidos que podem ser comuns a outras condições patológicas, além de proporcionar esforços para isolar toxinas específicas responsáveis por tal atividade. Essa linha de pesquisa resulta na descoberta de inúmeras proteínas, algumas das quais, são extensivamente caracterizadas em níveis estruturais e bioquímicos (LOPES, 2008).

Como o quadro fisiopatológico local é muito semelhante ao registrado por pacientes acometidos por picadas de serpentes do gênero *Bothrops*, o tratamento com antipeçonha específica pode ser desnecessário, podendo levar o paciente a um choque anafilático e posterior óbito (SILVEIRA; NISHIOKA, 1992). Os antipeçonhas contra toxinas de serpentes peçonhentas não garantem “proteção” contra as secreções tóxicas de colubrídeos e Dipsadidae (THEAKSTON *et al.*, 1979).

Toxinas expressas em baixa quantidade são identificadas mais facilmente pela construção de uma biblioteca de cDNA (DNA complementar) (WAGSTAFF *et al.*, 2010) da glândula de Duvernoy da serpente *Philodryas nattereri*. O cDNA pode ser obtido a partir de RNA mensageiro (RNAm) isolado de um determinado tecido.

Como o RNAm representa um conjunto de genes que estão sendo expressos por aquele tecido num dado momento, o cDNA obtido representa o DNA codificante, isto é, sequências que podem ser traduzidas. O conjunto de cDNAs obtidos pode ser inserido em vetores e multiplicado em células hospedeiras, dando origem a bibliotecas de cDNA (DA SILVA, 2003). A leitura e interpretação comparativa das sequências obtidas com sequências conhecidas de diversos tipos de toxinas fornecem um direcionamento sobre a diversidade proteica destas, permitindo, deste modo, a inferência sobre a composição total da peçonha produzida e, adicionalmente, a identificação de novas moléculas (WATSON *et al.*, 2009).

Em Química, a espectroscopia de RMN é frequentemente usada no estudo da estrutura dos compostos usando técnicas uni ou bidimensionais simples, substituindo, deste modo, as técnicas de cristalografia por raios X.

2.5.3 Estudo de Ressonância Magnética

O estudo de ressonância magnética nuclear (RMN) baseia-se no estudo das propriedades físicas e químicas da matéria, interpretando como um ramo da espectroscopia que explora as propriedades magnéticas de núcleos atômicos. Trata-se de uma técnica não destrutiva que permite a análise de compostos orgânicos e alguns inorgânicos. A técnica de RMN depende das variações de energia quantificáveis que podem ser induzidas em moléculas quando estas são irradiadas via radiação electromagnética. Os requisitos energéticos da RMN (10^{-6} KJ/mol) são relativamente pequenos quando comparados com outras técnicas espectrofotométricas (a radiação de infravermelho situa-se nos 10^{-4} KJ/mol; ultravioleta no intervalo 160-1300KJ/mol). Este tipo de espectroscopia está relacionado com as transições induzidas pelas radiofrequências (rf) entre estados quantificados de energia dos núcleos orientados num campo magnético. Os núcleos de certos elementos e isótopos comportam-se como se fossem imãs girando em torno de um eixo. Quando se coloca um composto contendo átomos de ^1H ou de ^{13}C num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia electromagnética, os núcleos podem absorver energia num processo denominado ressonância magnética. A técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), revolucionou a metodologia de identificação e caracterização das moléculas, fornecendo um grande volume de informações sobre as toxinas e peçonhas de serpentes como ferramentas farmacológicas (CORREIA *et al.*, 2001).

2.5.4 Proteína do Veneno

Cerca de 90 a 95% do peso seco das peçonhas ofídicas têm propriedade proteica, e são essas proteínas as responsáveis por quase a totalidade dos efeitos biológicos encontrados (BON, 1997). Algumas dessas proteínas exibem atividades enzimáticas, como já citado. Estas enzimas incluem fosfolipase A_2 (PLA_2), proteinase, nucleotidase, fosfodiesterase e L-aminoácido oxidase (LAAO) (BAILEY, 2001; KINI *et al.*, 2003). As L-aminoácido oxidases (LAAO), substâncias presentes em peçonha de serpentes, são

flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um α -cetoácido correspondente, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia (DU; CLEMETSON, 2002). São oxidases FAD-dependentes e sua toxicidade pode envolver a geração de peróxido de hidrogênio como resultado da reoxidação do cofator flavina por oxigênio molecular (BRAGA *et al.*, 2008). Embora a função biológica exata das LAEO isoladas de peçonha de serpentes não esteja totalmente esclarecida, elas parecem estar envolvidas na resposta alérgica inflamatória e, especificamente, associadas a danos em células endoteliais de mamíferos (IZIDORO, 2006). Expressam também ação bactericida, leishmanicida e citotóxica contra células tumorais, efeitos na agregação plaquetária, edema e indução de apoptose (STABELI *et al.*, 2004; IZIDORO *et al.*, 2006).

Os peptídeos antimicrobianos são armas evolutivamente antigas. Sua ampla distribuição em todo o reino animal sugere que tenham papel fundamental na evolução de complexos organismos multicelulares (ZASLOFF, 2002); eles diferem amplamente quanto à sequência e à estrutura, mas se assemelham na maneira que causam a morte de bactérias, isto é, causam quebra e destruição da membrana (HANCOCK; SCOTT, 2000). Estes componentes são isolados de uma variedade de fontes naturais, incluindo peçonha de serpentes. Com efeito, a pesquisa do potencial antimicrobiano de peçonha torna-se uma importante ferramenta de *screening* para a identificação de novas substâncias capazes de inibir o crescimento de microorganismos patogênicos (SCOUBAS; KING, 2009).

Procurando contribuir para o conhecimento da peçonha da espécie *Philodryas nattereri*, este estudo investigou, mediante experimentos bioquímicos, fisiológicos e moleculares, os mecanismos envolvidos na modulação farmacológica e mecanismo de ação local e sistêmico da peçonha e espera-se que concorra para o correto diagnóstico e tratamento em acidentes por esta espécie de serpente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar as alterações renais, vasculares, locais, morfológicas, citotóxicas e antimicrobianas da peçonha da *Philodryas nattereri*, contribuindo para a melhoria de possíveis protocolos terapêuticos, além da identificação genética e bioquímica da peçonha com a perspectiva de inserir novas ferramentas farmacológicas.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar as proteínas totais da peçonha de *Philodryas nattereri* comparando com a *Bothrops jararaca*.
- Avaliar os efeitos renais da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* em um sistema de perfusão de rim isolado de rato utilizando diferentes concentrações da peçonha;
- Caracterizar possíveis alterações histológicas promovidas pela peçonha em rins isolados de ratos.
- Estudar as alterações induzidas pela peçonha da *Philodryas nattereri* em cultura de células de epitélio de túbulos renais de cão (MDCK) e (RAW) macrófagos peritoneais de rato.
- Estudar possíveis alterações vasculares em anel de aorta de rato, utilizando diferentes concentrações da peçonha de *Philodryas nattereri*.
- Verificar possíveis alterações histológicas em anéis de aorta expostos a peçonha de *Philodryas nattereri*.

- Avaliar a toxicidade cardiovascular da peçonha de *Philodryas nattereri*, verificando influência na pressão arterial, na frequência cardíaca e na frequência respiratória de ratos.
- Identificar a atividade edematogênica e inflamatória das contorções abdominais por meio da peçonha da *Philodryas nattereri*.
- Avaliar alterações na musculatura, mediante análise por histológica em função da aplicação intramuscular da peçonha da *Philodryas nattereri*.
- Caracterizar o infiltrado inflamatório e os níveis proteína-quinase (CK) induzido pela peçonha em músculo gastrocnêmico de camundongos.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da peçonha *Philodryas nattereri* sobre CEPAS em *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella choleraesuis subsp.* (ATCC 10708) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
- Determinar o número de cromossomos da *Philodryas nattereri* e *Olfersii*.
- Construir uma Biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Philodryas nattereri* e sequenciar os clones.
- Sequenciar os clones da Biblioteca de cDNA da glândula de *Philodryas nattereri*.
- Estudar o espectro da peçonha bruta da *Philodryas nattereri* através de ressonância magnética nuclear.
- Identificar a estrutura molecular da peçonha por RMN.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LFAVET); Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Laboratórios de Cultivo Celular (LCC) e Microbiologia (LABMICRO) da Faculdade de Farmácia; Laboratório de Citogenética, do Departamento de Biologia, Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF), da Universidade Federal do Ceará (UFC), e Laboratório de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC.

O cDNA se encontra no laboratório de Ciências do Mar (LABOMAR) sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gandhi Rdis Baptista, para futuros estudos de investigações.

4.1 Aspectos Éticos

Esse trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará. Processo Nº 68/08 do Comitê de Ética.

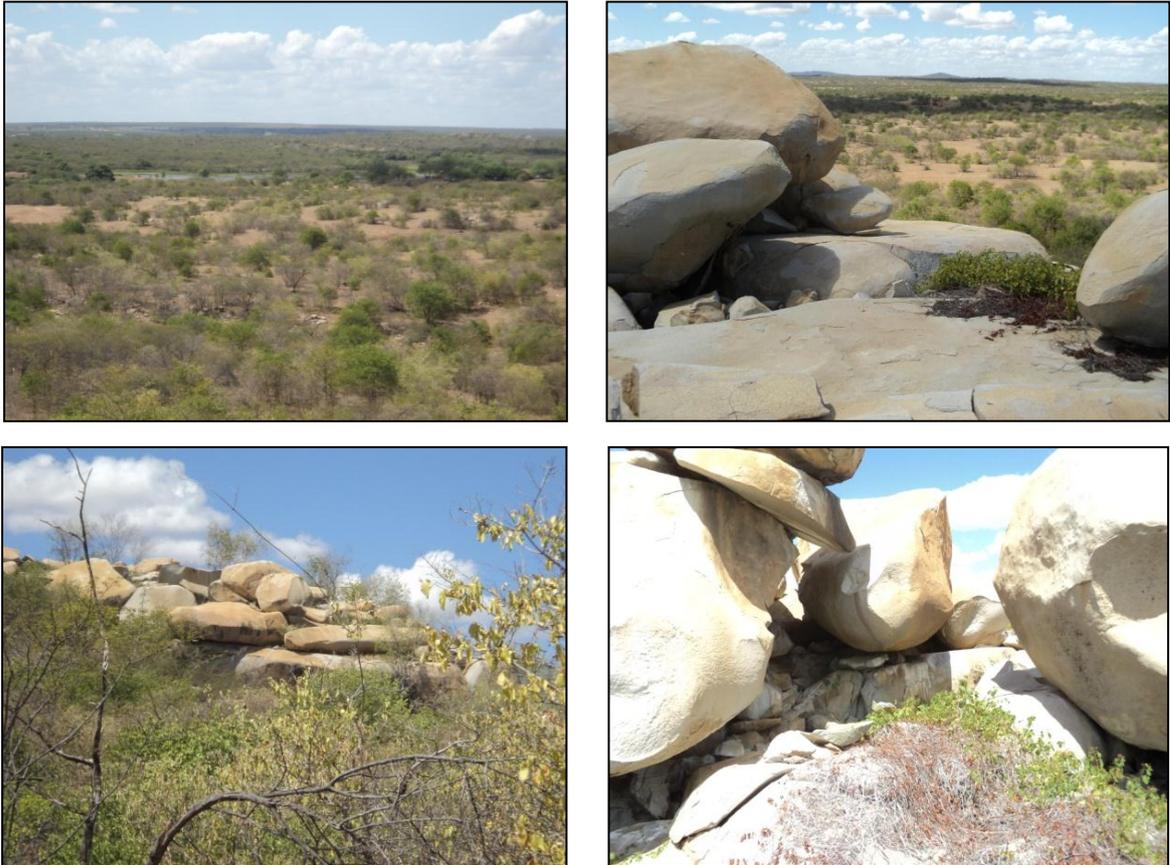
4.2 Animais

As serpentes (Figura 17A), na sua maioria, foram capturadas na Fazenda Aroeiras, no Município de Upanema, Estado do Rio Grande do Norte (Figura 16), transportadas para o Núcleo Regional de Ofiologia da Universidade Federal do Ceará (NUROF-UFC). Foram mantidas em gaiolas individuais, recebendo água à vontade e alimentação constituída de camundongos de aproximadamente 15 g, a cada 30 dias, para obtenção da peçonha.

Ratos Wistar adultos (Figura 17B), machos pesando 250 e 300g, e camundongos pesando entre 25 e 30g (Figura 17C), foram utilizados para a realização dos experimentos e eram provenientes do Biotério Central da UFC, mas mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina. Os animais foram acondicionados em caixas de

polipropileno, climatizados entre 22 a 26°C, com um ciclo dia/noite padrão (12h claro /12h escuro) com acesso a ração padrão (Biotec^R) e água *ad libitum*. Antes dos experimentos, foram submetidos a jejum de oito a 12 horas com água “*ad libitum*”.

Figura 16 – Fazenda Aroeira – Upanema/RN, habitat onde foram capturadas as espécies *Philodryas nattereri*.



Fonte: Foto produzida pela autora, 2012.

Figura 17 - *Philodryas nattereri*, ratos e camundongos utilizados neste trabalho.



Fonte: <http://br.images.search.yahoo.com/images>.

4.3 Extração da Peçonha

A peçonha da serpente *Philodryas nattereri* foi coletada diretamente da glândula de peçonha em tubos capilares para não haver contaminação com a saliva. Após o escoamento da peçonha pelo tubo capilar, a peçonha foi congelada e liofilizada. A coleta está demonstrada na figura 18.

Figura 18 – Sequência da extração da peçonha da serpente *Philodryas Nattereri*. (A) Imobilização do animal e visualização do dente; (B) Acoplamento ou posicionamento do capilar; (C) Coleta da peçonha; (D) Veneno coletado no capilar.



Fonte: foto produzida pela autora, 2012.

(*) Ausência da luva – para aumentar a sensibilidade.

4.3.1 Peçonha, Fármacos, Reagentes e Sais utilizados

A peçonha da *Philodryas nattereri* foi coletada juntamente com a Professora Dra. Diva Maria Borges Nojosa e Dra. Roberta Rocha, do Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Nesse local, as serpentes são identificadas e catalogadas. Os fármacos, reagentes e sais utilizados para a realização dos experimentos foram obtidos da empresa Sigma® (Saint Louis MO - EUA).

As soluções foram preparadas no momento do uso e agitadas em aparelho Vortex imediatamente antes do uso. Para os procedimentos cirúrgicos, as substâncias sólidas (cristálias) e uretana foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). Albumina bovina (6g%), ureia (0,075g) e inulina (0,075 g) foram adicionadas à solução fisiológica para perfazerem um volume final de 100 ml (pH 7,4), apenas nos experimentos de perfusão renal.

4.3.1.1 Soluções Fisiológicas Usadas Neste Estudo

Tabela 1 – Solução de Tyrode (pH = 7,4)

Composição	Quantidade (mmol/L)
NaCl	136,00
KCl	5,00
NaH ₂ PO ₄	0,36
MgCl ₂	0,98
MgSO ₄	1,18
CaCl ₂	2,00
NaHCO ₃	11,9
Glicose	5,50
Água destilada q.s.p.	1,00L

Fonte: LFAVET.

Tabela 2 – Solução de Krebs-Henseleit (pH = 7,4)

Composição	Quantidade (mmol/L)
NaCl	118,00
KCl	4,70
NaH ₂ PO ₄	1,20
MgSO ₄	1,20
CaCl ₂	2,50
NaHCO ₃	25,00
Glicose	10,00
Água destilada q.s.p.	1,00L

Fonte: LFAVET.

4.3.2 Quantificação de Proteínas da Peçonha pelo Método de Bradford

Com a finalidade de verificar a quantidade de proteína por peso seco de peçonha, uma vez que a peçonha da *Philodryas nattereri* ainda não foi caracterizada, procedeu-se ao método de Bradford (1976). Este método

espectrofotométrico baseia-se na incorporação proporcional do corante *coomassie* às proteínas.

A análise foi realizada por meio de um reagente já preparado e pronto para o uso – Bradford-Dye®, Bio-Rad® (Berkeley, CA – EUA), seguindo a metodologia de acordo com as indicações do fabricante – 1mg da peçonha liofilizada foi ressuspendido em 1mL de solução salina fisiológica 0,9%. Uma alíquota de 100µL desta solução foi adicionada a 2,5mL de reagente de Bradford (em triplicata).

A mistura foi agitada e, após dez minutos, foram feitas as leituras das absorvâncias – 595nm em espectrofotômetro (Genesys 10, Spectronic Unicam, New York, EEUU), utilizando uma curva de calibração concentração x absorvância, (construída com albumina bovina sérica (BSA), em NaCl 0,9%), para o cálculo da quantidade de proteína na amostra.

4.3.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo (PAGE-SDS)

O perfil proteico da peçonha foi observado por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). A peçonha bruta liofilizada foi ressuspendida em tampão de amostras (Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8 com SDS 2% glicerol, azul de bromofenol e b-mercaptoetanol) de forma que encerrassem a concentração de 1mg/mL.

A amostra foi aquecida à 100°C, durante dez minutos, e centrifugada a 10.000xg, durante cinco minutos, a 4°C. Em seguida, 20µL da amostra foram aplicadas em poço feito em um gel vertical de 2mm de espessura, composto por géis de concentração e separação que encerravam 5% e 12,5% de acrilamida, respectivamente.

A corrida foi conduzida a uma corrente elétrica constante de 20mA por placa, durante 1,5 hora. As bandas proteicas foram coradas com solução de “*Coomassie Brilliant Blue*” R-250 a 0,05%. A descoloração foi feita com solução de metanol ácido acético glacial e água (1: 3,5 : 8, v / v / v). Também foi realizada revelação dos géis por nitrato de prata, seguindo metodologia de Blum *et al.* (1987). Como padrão de massa molecular, foram usadas miosina (212kDa), β-galactosidase (116kDa), fosforilase B (97,4kDa), albumina sérica bovina (66,2kDa), albumina do ovo (45,0kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa),

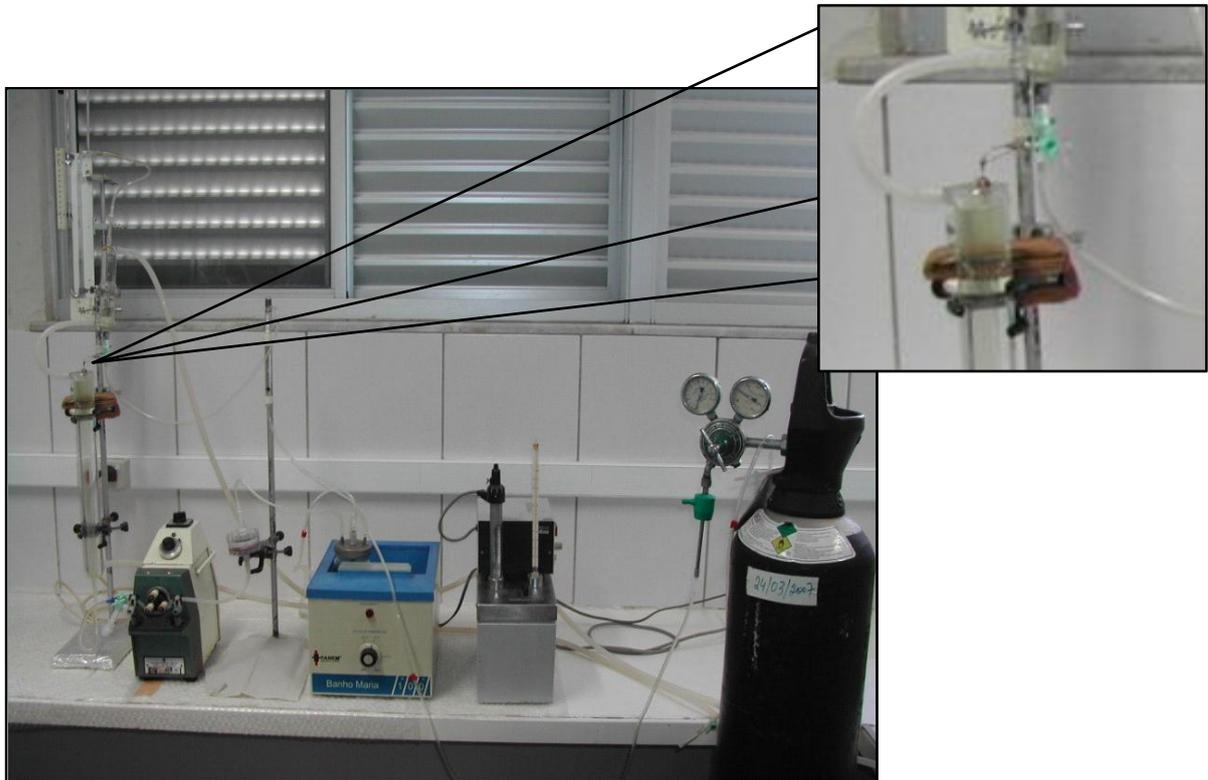
inibidor de tripsina da soja (21,4/19,7 kDa) e lisozima (14,2 kDa) (AMRESCO Inc., Ohio, EEUU).

4.4 Sistema de Perfusão Renal

4.4.1 Sistema de Perfusão de Rim Isolado

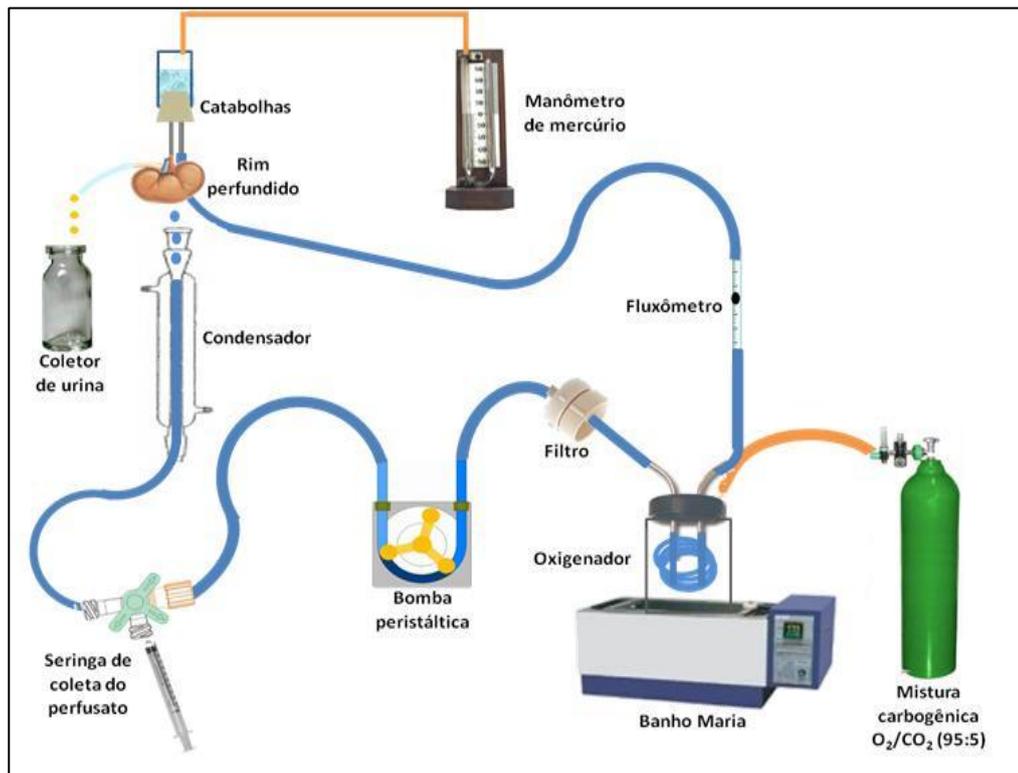
A técnica de perfusão de rim isolado permite estudar mecanismos que controlam a função renal com a vantagem de não receber influências sistêmicas (NIZET, 1975). A utilização do modelo experimental de perfusão de rim isolado com a peçonha bruta da serpente *Philodryas nattereri* foi baseada no trabalho de Fonteles, *et al.* (1983). Esse sistema consiste na perfusão de rim isolado com recirculação e é composto por dois subsistemas, um *in situ* e outro *in vitro* em circuito fechado, para realização da perfusão. Ambos foram mantidos à mesma temperatura – 37°C. A vantagem desse modelo experimental é permitir a manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina (baixa quantidade) na solução perfusora, mantendo constantes as substâncias dialisáveis, além de possuir uma oxigenação adaptada ao próprio sistema. O sistema está demonstrado nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 – Fotografia do sistema que consiste na perfusão de rim isolado.



Fonte: LFAVET.

Figura 20 – Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.



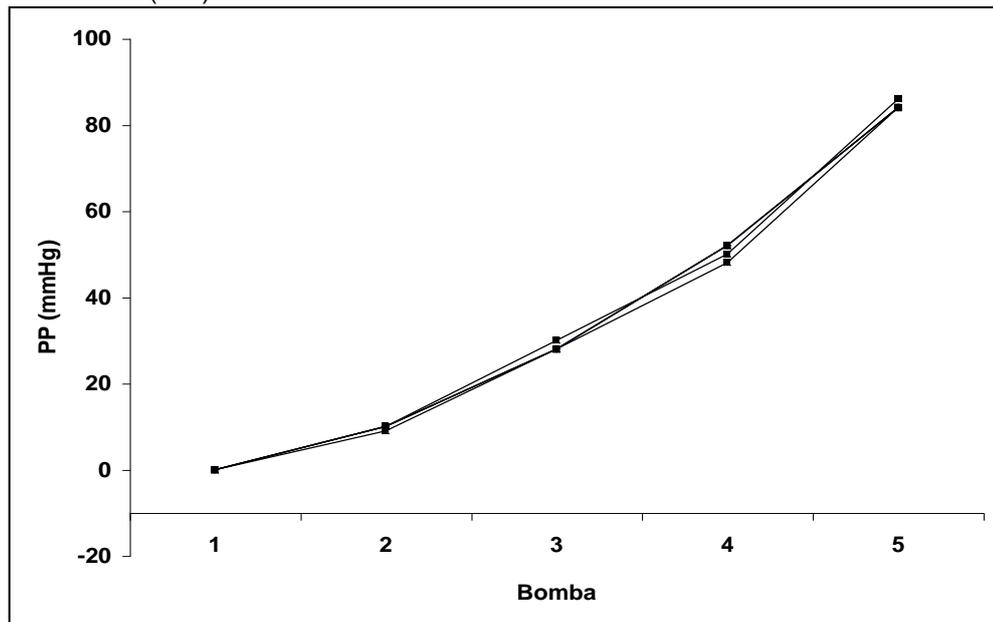
Fonte: LFAVET.

4.4.2 Calibração do Sistema de Perfusão Renal

4.4.2.1 Calibração do Sistema

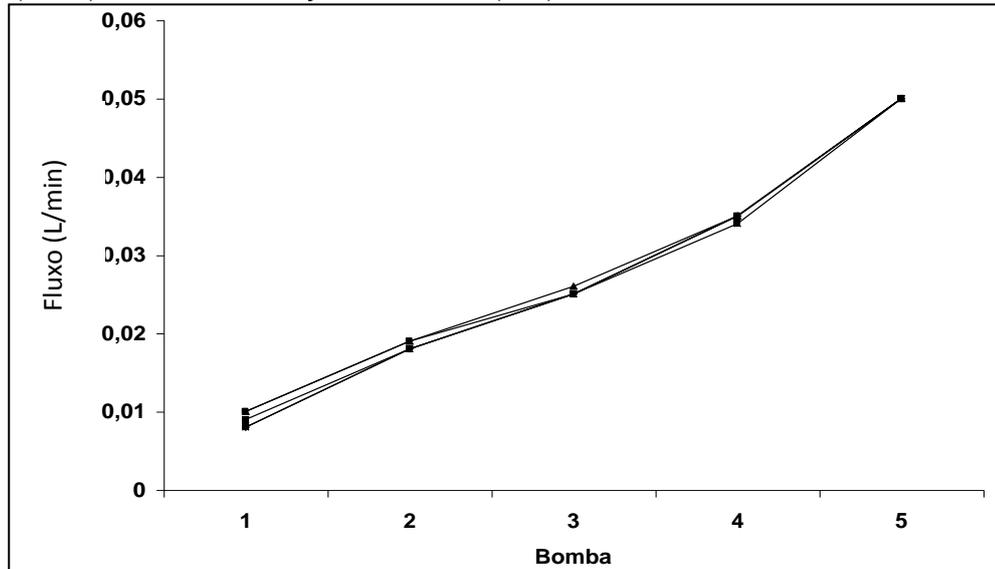
O sistema foi calibrado antes do início de cada experimento com solução de NaCl 0,9% mantida a 37°C. Para cada unidade da bomba peristáltica (Haake, Alemanha) (1, 2, 3, 4, e 5), foram observados os seguintes parâmetros: pressão perfusão (mmHg), fluxo da solução no sistema (L/min) e o volume de solução coletado em um minuto (mL/min), respeitando um intervalo de dois minutos entre as medidas. As figuras 21, 22 e 23, que representam os registros de calibração da bomba perfusora, demonstram que o sistema manteve seus parâmetros constantes.

Figura 21 – Valores de pressão de perfusão (PP) registrados durante a calibração do sistema (n=6).



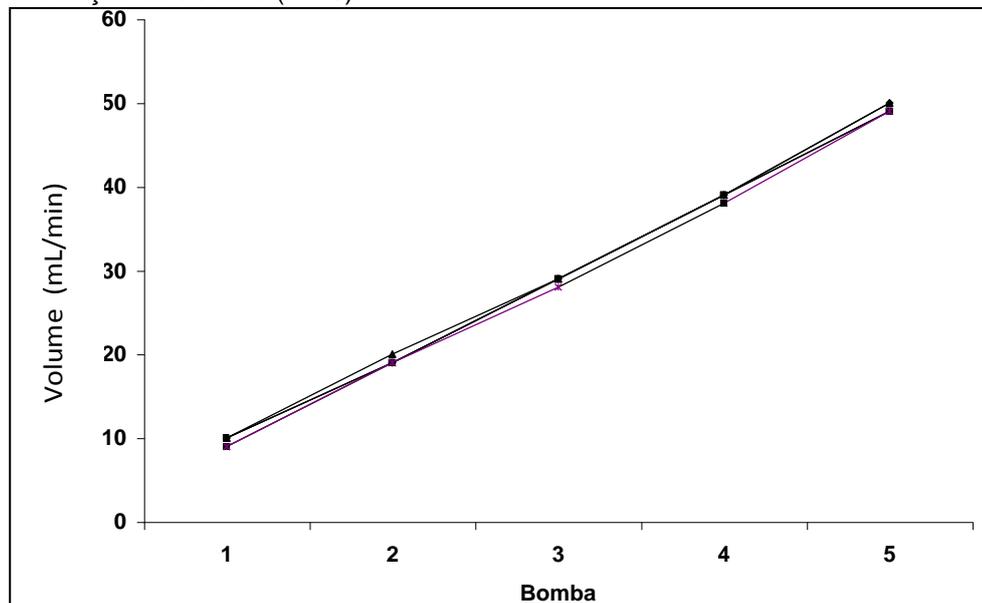
Fonte: LFAVET.

Figura 22 – Valores de fluxo de solução no sistema registrados pelo fluxômetro (L/min) durante a calibração do sistema (n=6).



Fonte: LAFAVET.

Figura 23 – Valores registrados de volume urinário (mL/min) coletados durante a calibração do sistema (n = 6).



Fonte: LAFAVET.

4.4.3 Solução Perfusora

A solução perfusora utilizada foi a de Krebs-Henseleit modificada, contendo albumina 6% (p/v). A solução continha NaCl = 138g; KCl = 7g; NaH₂PO₄.H₂O = 3,2g; MgSO₄.7H₂O = 5,8g e Ureia = 10g. Quarenta e oito horas

antes dos experimentos, 100mL desta solução foram separados e acrescidos de $\text{NaHCO}_3 = 4,2\text{g}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 0,74\text{g}$; glicose = 2g e penicilina G potássica cristalina = 0,05g. Em seguida, o volume foi completado para 2000mL com água bidestilada. Foram retirados 300mL desta solução, volume ao qual adicionou-se albumina bovina (6g%). Esta solução final foi dializada com a albumina, auxiliada por um homogeneizador. A diálise teve como objetivo retirar substâncias contaminantes, como piruvatos, citratos e lactatos (COHEN, KOOK, LITTLE, 1977; ROSS, 1978). A solução para diálise foi trocada após as primeiras 24 horas, sendo acrescidas à solução perfusora 0,15g de inulina ajustando o pH para 7,3 a 7,4, (HANSON; BALLARD, 1968).

4.4.4 Técnica Cirúrgica

Os animais usados para os experimentos foram mantidos em jejum de 12h antes do procedimento cirúrgico, com água *ad libitum*.

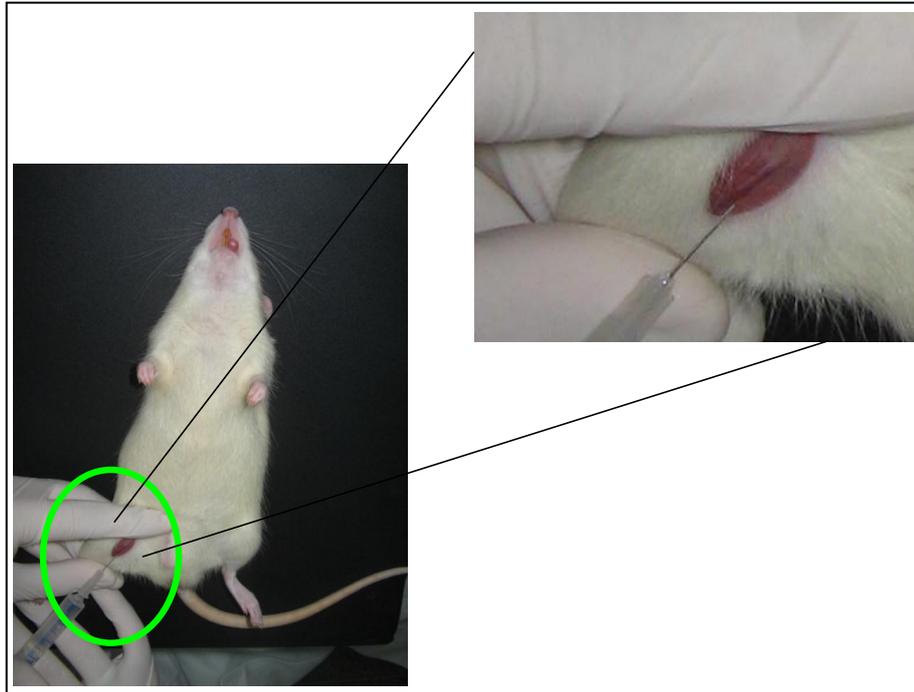
A técnica cirúrgica utilizada para obtenção de rim isolado foi realizada segundo Bowman (1970) e modificado por Fonteles *et al.*, (1983). Os animais ($n = 6$) foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50mg/Kg de peso corporal.

Inicialmente, a veia femoral foi isolada e injetados 3 mL solução de manitol (3mL de solução 100mg/mL – independentemente do peso) (Figura 24), a fim de facilitar a visualização e a fixação da cânula ao ureter. Após assepsia da parede abdominal, procedeu-se à incisão, penetrando a cavidade peritoneal, sendo feito o deslocamento cuidadoso das alças intestinais, para melhor visualização do rim direito e estruturas adjacentes (figura 25).

O ureter direito foi identificado, dissecado e canulado com tubo de polietileno PE-30 (Figura 26), bem como a artéria mesentérica superior, artéria renal (Figura 27) e a glândula suprarenal identificados.

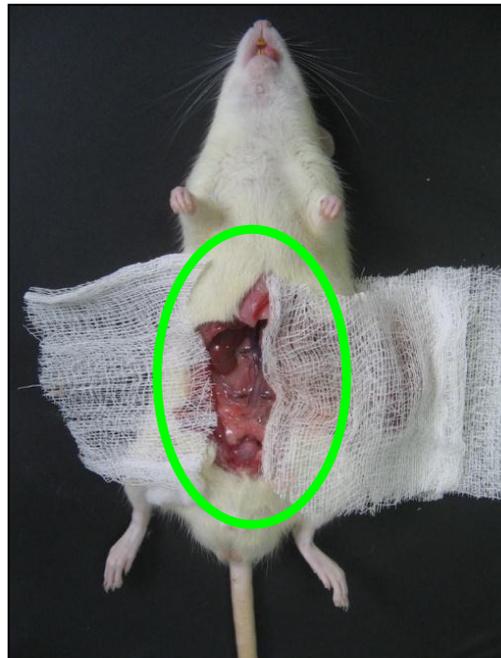
A cápsula renal do rim direito foi cuidadosamente retirada e a artéria renal foi canulada via artéria mesentérica superior. Com cânula metálica foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi realizada a fixação da cânula (Figura 28), iniciando a perfusão do órgão.

Figura 24 – Administração de manitol (300mg/3mL – independentemente do peso) pela veia femoral no animal anestesiado.



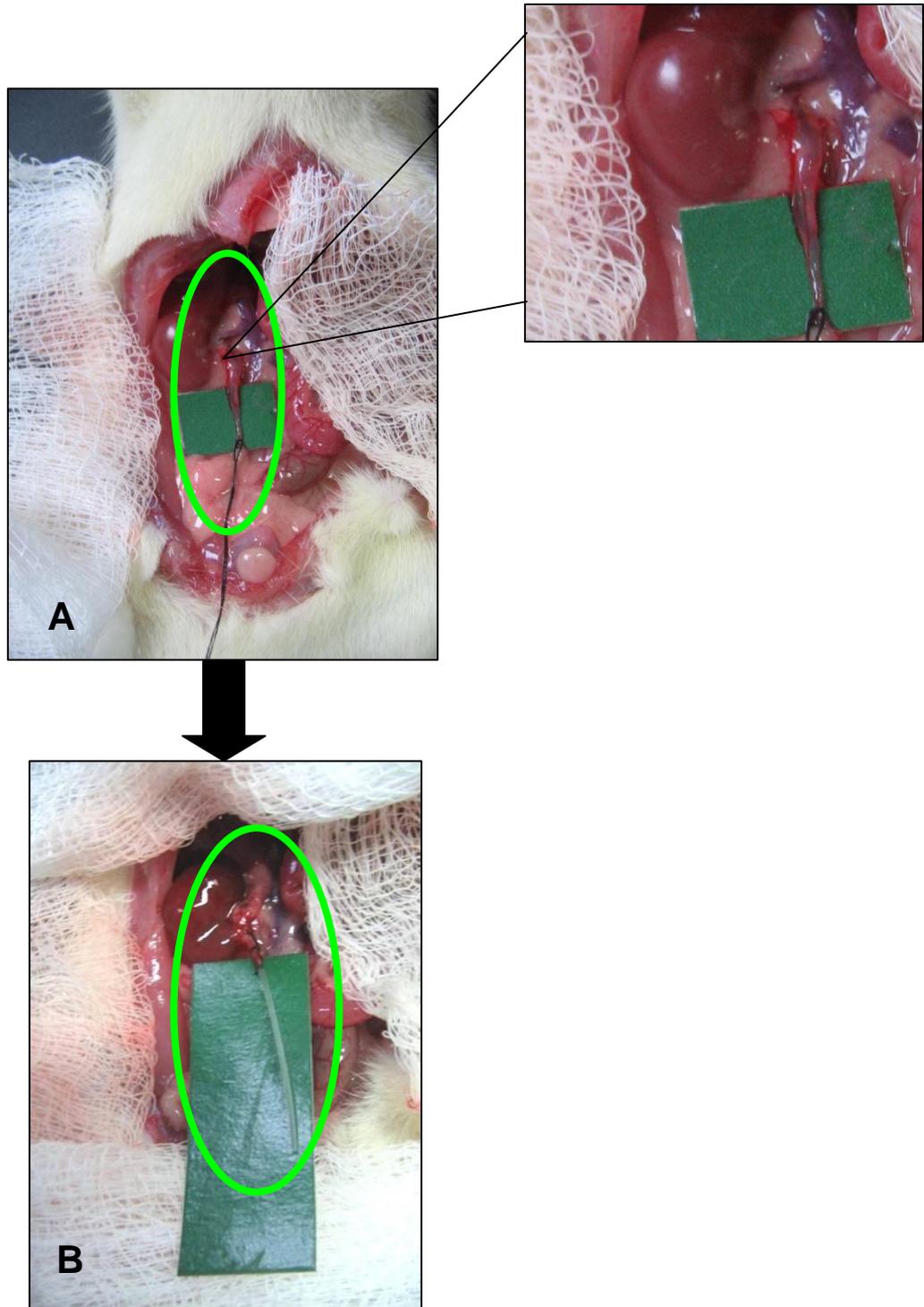
Fonte: LFAVET.

Figura 25 – Visualização do rim direito e estruturas circunvizinhas.



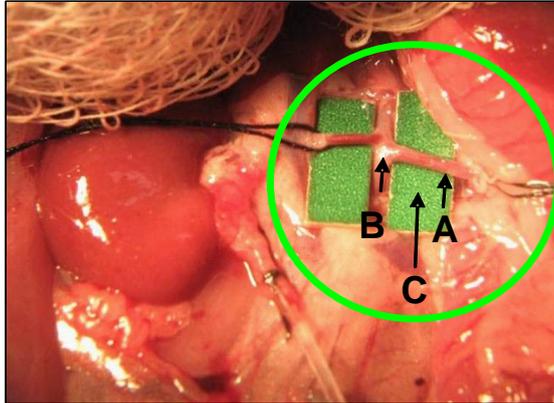
Fonte: LFAVET.

Figura 26 – Identificação (A) e Canulação (B) do Ureter.



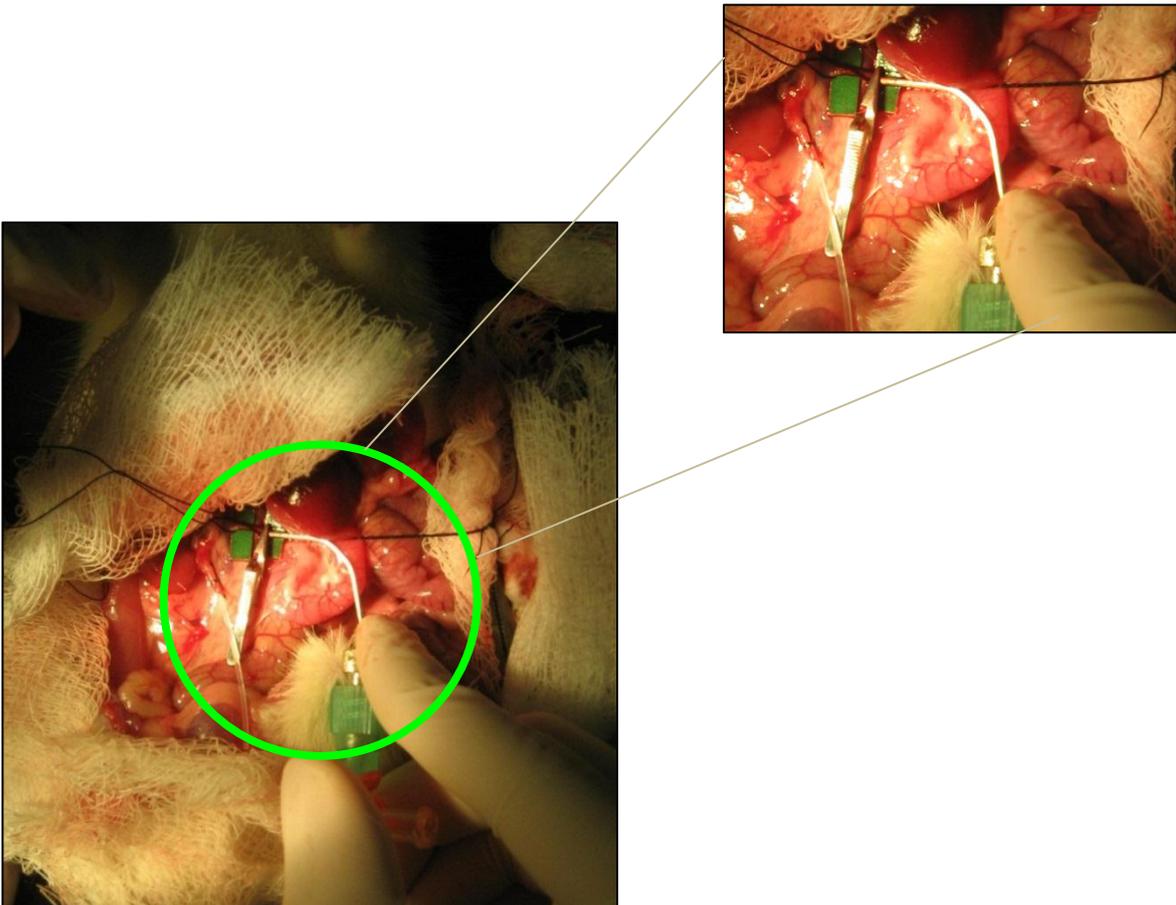
Fonte: LFAVET.

Figura 27 – Visualização da artéria mesentérica (A) e da artéria renal (B), na qual também se identifica a artéria aorta (C).



Fonte: LFAVET.

Figura 28 – Canulação da artéria renal pela artéria mesentérica.



Fonte: LFAVET.

Durante o procedimento cirúrgico, uma parte da solução já oxigenada (40mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, para perfundir o rim ainda *in loco*, evitando qualquer isquemia ao órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem a interrupção do fluxo (Figura 29).

Figura 29 – Fotografia do rim isolado do rato no sistema de perfusão.



Fonte: LAFAVET.

4.4.5 Protocolo Experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Ao final dos 30min iniciais (utilizados como controle interno) foi adicionada a peçonha de *Philodryas nattereri* em duas diferentes concentrações (1µg/mL, e 3,0µg/mL). A cada cinco minutos, foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120min. Amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada dez minutos, alternadamente. Depois, as amostras foram congeladas a -20°C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, fundamentais para os cálculos dos parâmetros da função renal (FONTELES *et al.*, 1983).

4.4.6 Análises Bioquímicas

Nas amostras de urina e perfusato, foram realizadas determinações de sódio, potássio e cloreto pelo método do íon eletrodo seletivo (RapidChem 744 - Bayer[®] diagnóstica). Esses parâmetros foram determinados no Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

A inulina do perfusato e da urina foi determinada por hidrólise direta, conforme Walser *et al.*, (1955) e Fonteles *et al.*, (1983), com modificações que utilizam menor quantidade de amostras e reagentes. A osmolaridade das amostras de urina e perfusato foi medida com o emprego de um osmômetro (WESCOR[®], modelo Vapro[®] 5520). Esses parâmetros foram determinados no Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

4.4.7 Cálculos dos Parâmetros Renais Avaliados

A Tabela 2 apresenta as fórmulas utilizadas para determinação de parâmetros funcionais renais utilizados para obtenção dos valores e dos gráficos utilizados na tese. Os cálculos demonstrados foram realizados em planilhas do *software* Microsoft Office Excel 2007[®] (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1983).

Tabela 3 – Determinação dos parâmetros da função renal.

Parâmetro Renal	Unidade	Fórmula
Fluxo Urinário (FU)	mL. g ⁻¹ . min ⁻¹	FU= (Peso do volume urinário/Peso do rim esquerdo/10 min.
Pressão Perfusão (PP)	mmHg	Leitura em manômetro
Ritmo de Filtração Glomerular(RFG)	mL. g ⁻¹ . min ⁻¹	RFG= (DOU in / DOPinxFU) DOU in=densidade ótica da inulina na urina DOP in=densidade ótica da inulina no perfusato.
Fluxo Perfusão Renal(FPR)	mL. g ⁻¹ . min	Registrado a cada 10 min/peso do rim/intervalo de tempo.
Resistência Vascular Renal(RVR)	mmHg/mL. g ⁻¹ .min	RVR=PP/FPR.
Sódio Filtrado (FNa ⁺)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	FNa⁺= RFGxPNa⁺ (PNa ⁺ = Concentração de sódio no perfusato).
Sódio Excretado(ENa ⁺)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	ENa⁺ = FUxUNa⁺ UNa ⁺ = Concentração de sódio na urina).
Sódio Transportado (TNa ⁺)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	TNa⁺ = FNa⁺ - ENa⁺
Percentual de Sódio Transportado (% TNa ⁺)		%TNa⁺ = TNa⁺ x 100/FNa⁺
Percentual de Sódio Proximal Transportado(%TpNa ⁺)		%TpNa⁺ = TpNa⁺ x 100 / FNa⁺
Potássio filtrado (FK ⁺)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	FK⁺ = RFG x PK⁺ (PK ⁺ = concentração de potássio na urina).
Potássio Excretado (EK ⁺)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	EK⁺= FU x UK⁺ (UK ⁺ = Concentração de potássio na urina).
Potássio Transportado (TK ⁺)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	TK⁺ = FK⁺ x EK⁺
Percentual de Potássio Transportado (%TK ⁺)	-	%TK⁺ = TK⁺ x 100 / FK⁺
Proximal Percentual de Potássio Transportado (%TpK ⁺)	-	%TpK⁺ = TpK⁺ x 100 / FK⁺
Cloreto Filtrado (FCl ⁻)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	FCl⁻ = RFG x PCl⁻ PCl ⁻ = Concentração de cloreto no perfusato.
Cloreto Transportado (TCl ⁻)	μEq. g ⁻¹ . min ⁻¹	TCl⁻ = FCl⁻ x ECl⁻
Percentual de Cloreto Transportado(%TCl ⁻)	-	% TCl⁻ = TCl⁻ x 100 / FCl⁻
Percentual de Cloreto Proximal Transportado (%TpCl ⁻)	-	TpCl⁻ = TpCl⁻ x 100 / FCl⁻
Clearance Osmótico (C _{osm})	mL. g ⁻¹ .min ⁻¹	C_{osm} = [U_{osm}/P_{osm}] x FU U _{osm} = Osmolaridade da urina P _{osm} = Osmolaridade do perfusato

Fonte: Martinez-Maldonado, *et al.*, 1978.

Cada um desses parâmetros permite fazer inferência a diversos efeitos. A PP indica se a substância ou a peçonha que se está testando é capaz de modificar as forças que regem a perfusão renal. Em relação à RVR, esse parâmetro possibilita investigar se as alterações na PP estão relacionadas a contração ou relaxamento dos vasos que irrigam o tecido renal. O FU permite observar se o tecido renal está produzindo um volume de urina maior ou menor. Em relação ao RFG, verifica-se se a depuração ou *clearance* aumentou, por intermédio de marcadores, como a inulina. O percentual de transporte tubular (total e proximal) permite que se possa observar possíveis alterações tubulares em relação ao crescimento ou redução da reabsorção/excreção de eletrólitos, verificando a manutenção da função tubular. O *clearance* osmótico, por sua vez, verifica como o rim está depurando substâncias osmoticamente ativas e se essas estão sendo eliminadas em maior ou menor quantidade na urina. Todos esses parâmetros da fisiologia renal, associados à análise histológica, permitem verificar possíveis mecanismos de manutenção e alteração da função renal (SOUSA, 2010).

4.4.8 Estudo Histológico Renal

Ao final de cada experimento, foi retirado um fragmento longitudinal do rim perfundido (direito) e não perfundido (esquerdo), que foram colocados em formol a 10%, por um período de 24h, para posterior análise histológica.

Os fragmentos obtidos foram submetidos a desidratação e diafanização, e, em seguida, cortados em uma espessura de 5 μ m. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas a microscopia de luz (NIKON[®]). Também foi realizado o estudo histológico nos rins perfundidos somente com solução de Krebs-Henseleit modificada (controle perfundido – controle externo). Todas as fotomicrofotografias foram realizadas em um microscópio Olympus[®] CKX 41[®] com câmera digital acoplada (Evolt E3030[®] Olympus[®]), em colaboração com o Professor Doutor Dalgimar Beserra de Menezes, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC.

4.5 Contratilidade em Anéis de Aorta

4.5.1 Técnica Cirúrgica

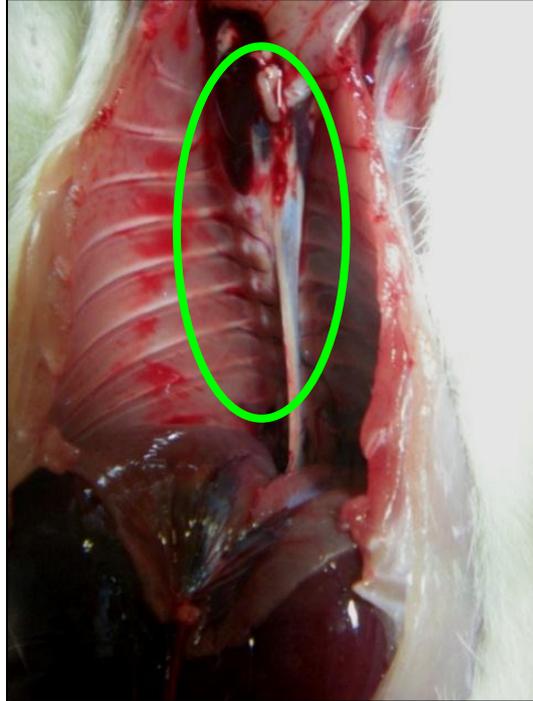
A avaliação dos efeitos vasculares da peçonha de *Philodryas nattereri* em vasos de condutância foi realizada mediante os ensaios em anel de aorta isolada de ratos Wistar machos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical imediatamente antes do início dos experimentos para obtenção dos tecidos.

Mediante uma incisão no abdômen do animal, o segmento da aorta torácica foi removido (Figura 31) e cortado transversalmente em segmentos cilíndricos como anéis (1mm x 5mm), acoplados em peças triangulares de aço inoxidável ligadas a um fio de algodão (Figura 32), com remoção cuidadosa de tecido adiposo adjacente e montadas em câmaras de 5mL para cada anel com solução modificada de Tyrod (Figura 33), com a seguinte composição em mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl₂ 0,98; CaCl₂ 2,0; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 11,9 e glicose 5,5 (pH 7,4, mantida a 37°C). Os anéis de aorta foram mantidos em uma tensão basal de 1g na cuba com a solução devidamente aerada, conforme esquematizado na figura 34. Após a preparação dos tecidos, estes eram montados em câmara de vidro de capacidade para 5mL de solução fisiológica, aerada com mistura carbogênica e com temperatura de 37°C mantida constante pela circulação de água proveniente de banho-maria com propulsão. Uma extremidade dos tecidos era fixada a um transdutor de força, conectado a um amplificador e este a um sistema de aquisição de dados para registro das alterações contráteis.

O período de estabilização dos anéis no sistema foi de 60 minutos. Após o período de estabilização, a solução do meio nutritivo foi trocada a cada 15min para prevenir a interferência de metabólitos.

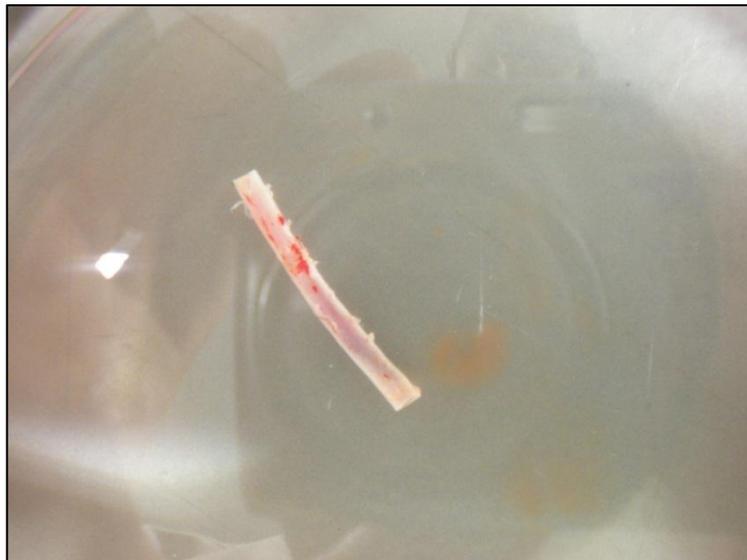
Após a estabilização, foram induzidas duas contrações similares com K⁺60mM. Na maior parte dos protocolos, essas respostas contráteis foram usadas como contrações de referência e os resultados obtidos foram expressos como percentual da média destas contrações.

Figura 30 – Visualização do Segmento Torácico da Aorta.



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.

Figura 31 – Segmento da aorta torácica isolado e devidamente dissecado.



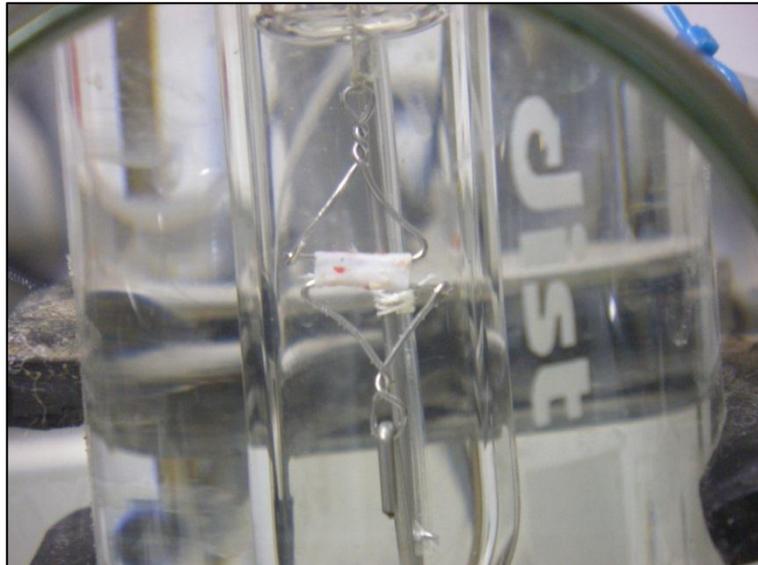
Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.

Figura 32 – Anel de aorta acoplado em peças metálicas triangulares.



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.

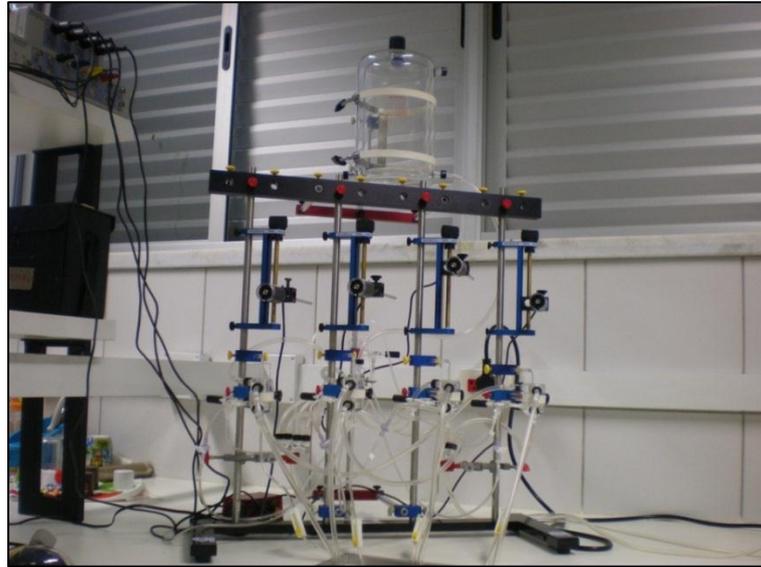
Figura 33 – Anel de aorta na cuba com solução de Tyrod devidamente aerada.



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.

A Figura 34 mostra o sistema em que foram montados os banhos de órgãos, conectados para aquisição de dados (Dataq® PM-1000, EUA).

Figura 34 – Fotografia demonstrando o sistema de aquisição de dados de anel de aorta isolado de rato.

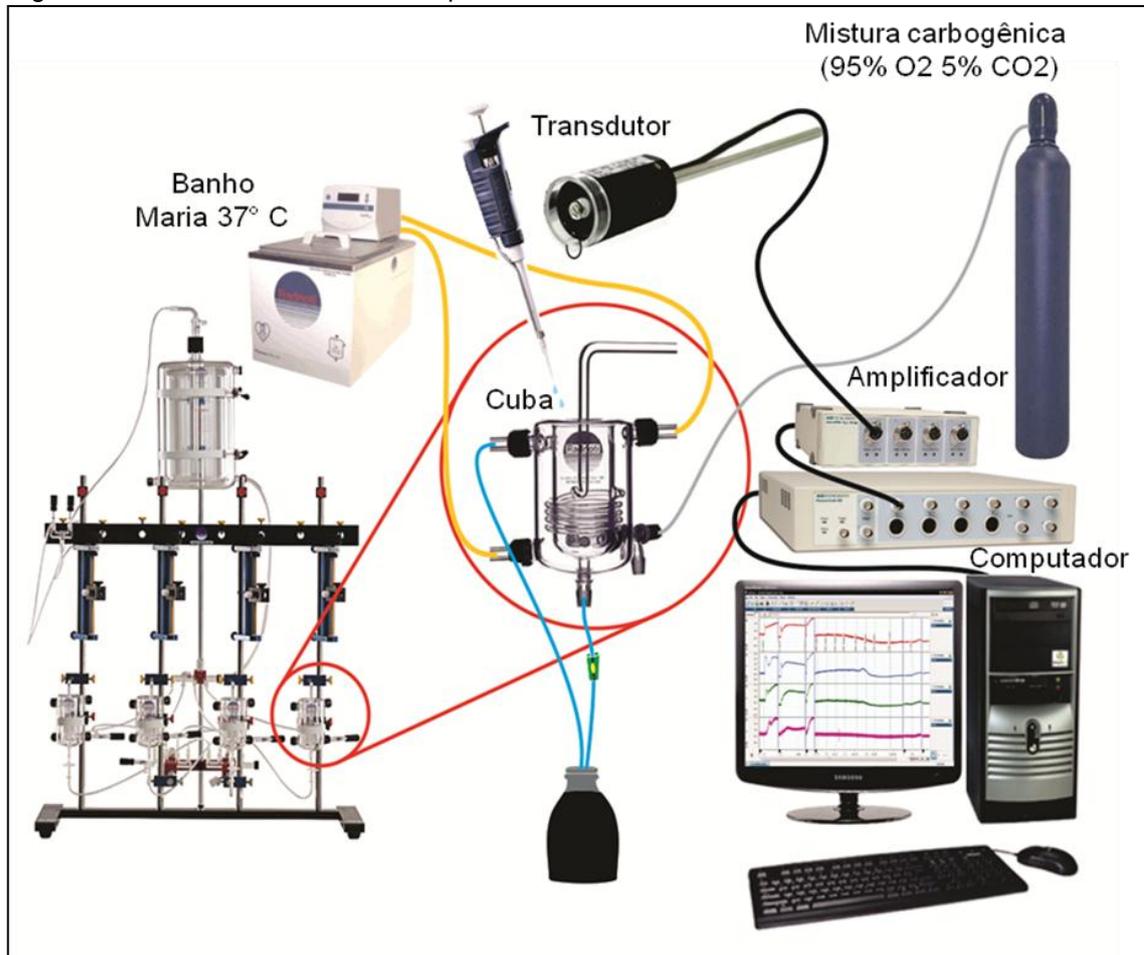


Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.

4.5.2 Protocolos Experimentais

Foram realizados protocolos experimentais nos quais a peçonha de *Philodryas nattereri*, utilizada nas concentrações de (0,1 – 200 µg/mL), foi adicionada nas preparações de aorta isolada de rato na tensão basal ou após pré-contracção do tecido com estímulo eletromecânico (K^+ 60 mM) ou farmacomecânico (fenilefrina 1 µM). Após a confecção das curvas concentração efeito para a peçonha de *Philodryas nattereri*, as preparações foram lavadas e, então, contraídas novamente com K^+ 60mM para avaliar a recuperação do tecido (Figura 35).

Figura 35 – Sistema utilizado nos experimentos de contratilidade *in vitro* em aorta de rato.



Fonte: Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso.

4.6 Avaliação da Toxicidade no Sistema Cardiovascular

4.6.1 Pressão Arterial

Para o estudo da pressão arterial F.C. e F.R, utilizou-se Ratos Wistar, machos, pesando de 250 – 300g, submetidos a jejum de 24 horas, sendo depois anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e submetidos a cirurgia. Secionou-se a linha mediana da região cervical, com isolamento das glândulas parótidas direita e esquerda, aprofundando a incisão até a traqueia. Após divulsão marginal deste órgão, foi identificado o feixe vascular 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. Manobra semelhante foi realizada a fim de canular a veia jugular externa com o propósito de injetar as substâncias-testes (peçonha) e os padrões. Os registros das experiências foram realizados com transdutores P 23 Statham (Gould, Oxnard, CA, EUA) acoplados a um polígrafo Narco BioSystems (4 – DMB, Houston, TX, EUA). Antes do início das experiências, foi procedido à calibração do instrumento utilizado como padrão, um manômetro de mercúrio numa escala 50 a 250mmHg.

A pressão arterial média foi calculada segundo a equação: $PMA = PD + (PS - PD) / 3$; onde PAM – Pressão arterial média; PD – Pressão diastólica; PS – Pressão sistólica.

A peçonha bruta de *Philodryas nattereri* foi testada nas doses de 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 e 300,0 μ g/kg e observada sua resposta pressora. Em outro grupo, para avaliar se efeitos hipotensores obtidos eram oriundos de reflexo do tipo Bezold – Jarisch por ação da peçonha 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.

Figura 36 – Animal canulado para registro da pressão arterial sistêmica.



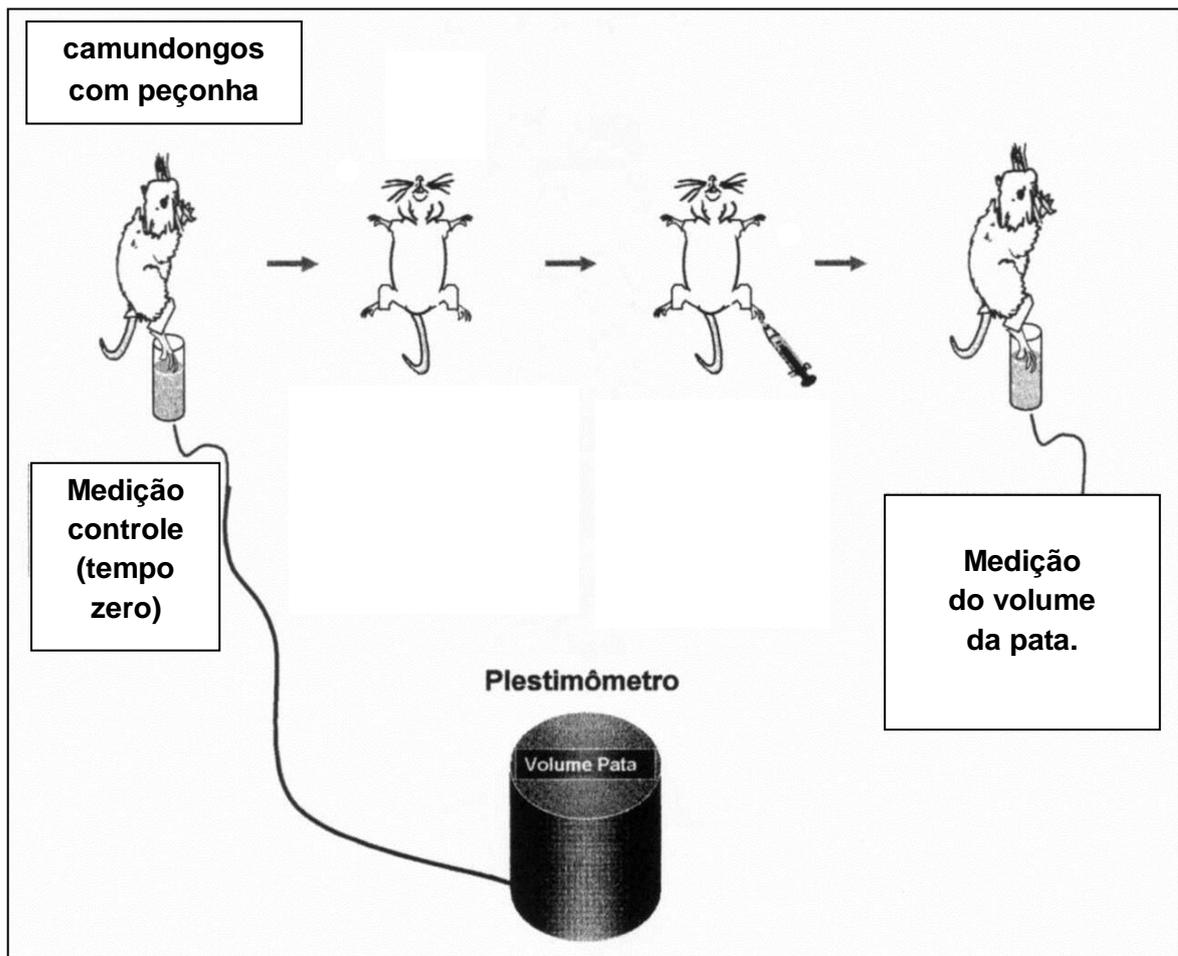
Fonte: LFAVET.

4.7 Avaliação da Peçonha em Processo Inflamatório

4.7.1 Edema de Pata Induzido pela Peçonha

Para este experimento, utilizou-se camundongos Swiss (20 – 30g) machos (grupo de seis animais cada um), divididos em grupos. Em relação ao tratamento destes grupos, os animais receberam uma injeção intraplantar de 3,0µg/50µL e 10,0µg/50µL de *Philodryas nattereri* (1,0 mg/ml) para visualização do edema na pata direita traseira. Foi registrado o volume da pata antes e nos tempos 0.5h, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h, após a administração da peçonha (WINTER *et al.*, 1962).

Figura 37 – Modelo esquemático da medida do edema de pata em camundongos.



Fonte: Adaptado pelo autor de Carlos Câmara (2009).

O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado por meio de um pletismógrafo (Ugo Basile, Itália) onde a pata posterior direita do animal foi

submergida, até a junção tibiotarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado e considerado o volume da pata (Figura 40). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção da peçonha. O edema foi expresso de acordo com a seguinte fórmula:

$$E = (\%) = \frac{(MF-MI) \times 100}{MI}$$

Onde:

MF = Medida final da pata.

MI = Medida inicial da pata (antes da injeção).

O mesmo procedimento foi utilizado na pata esquerda, como controle do experimento. Após obter os valores para cada um dos tempos e para ambas as patas de cada animal, calculou-se o edema (%) propriamente dito, de acordo com o seguinte:

$$\Delta = PD - PE$$

Onde:

PD = Média das medidas da pata direita obtidas pela fórmula;

PE = Média das medidas da pata esquerda obtidas pela fórmula.

Com os valores obtidos, montou-se um gráfico da evolução do edema em função do tempo.

4.7.2 Edema Pré-tratado com Indometacina (Indo + Peçonha)

Para avaliar o efeito da indometacina sobre a atividade do edema, uma dose de 3,0µg da peçonha foi incubada com 2mg/mL de indometacina por 30 minutos (CHAVES *et al.*, 1995). Foram utilizados três grupos de seis camundongos (n=18). O primeiro grupo recebeu no coxim plantar da pata traseira direita (experimental) 50µL da solução do peçonha. Outro grupo foi pré-tratado com indometacina mais peçonha (indo + peçonha). O terceiro grupo de

animais recebeu injeções somente de salina estéril na pata contralateral (controle). A leitura foi realizada em pleitismógrafo, após 30 minutos da injeção.

A medida foi realizada como descrito anteriormente. O volume do edema em mililitros (mL) foi registrado por intermédio de um plestimografo (Ugo Basli, Itália) onde a pata posterior direita do animal foi submergida, até a junção tíbiotarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado e considerado o volume da pata.

4.7.3 Edema Pré-tratado com Dexametasona (Dexa +Peçonha)

Para avaliar o efeito da dexametasona sobre a atividade do edema, uma dose de 3,0µg da peçonha foi pré-tratada com 1mg/kg de dexametasona por 30 minutos. Os edemas e suas leituras foram realizadas em plestimógrafo conforme descrito no item anterior.

4.7.4 Edema Pré-incubado com SAB (Soro Antibothrops)

Avalou-se o efeito do soro antibothrops (SAB) sobre a atividade do edema, com uma dose de 3,0µg da peçonha pré-incubada com o soro antibotrópico diluído de 1:5 à temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura foi realizada em plestimômetro, conforme descrito no item 4.8.2 (Figura 40).

4.7.5 Análise Histológica

Ao final de cada experimento, foi retirado um fragmento dos tecidos experimentais e controle, os quais foram fixados em formol 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos foram submetidos à desidratação e diafanização e, em seguida, cortados em uma espessura de 5µm. Coloração de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio de luz (Nikon) em colaboração com o professor Doutor Dalgimar Beserra de Menezes do Departamento de Patologia e Medicina legal da Universidade Federal do Ceará.

4.7.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa Graph Pad Prism 5.0 (USA). Os resultados foram representados pela Média \pm Erro- Padrão da Média (E. P. M.), considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), utilizando teste *post hoc* Student-Newman ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunns, conforme os dados analisados.

4.8 Atividade Miotóxica Avaliada por Histologia

Escolhida a dose final de 50 μ g, avaliou-se a cinética dos efeitos da peçonha sobre o tecido muscular nos intervalos de 2h; 4h; 8h; 12h e 24 horas, após a inoculação. Nos cinco grupos de quatro camundongos, foi injetada, via intra-muscular, no gastrocnêmio direito, a dose de 50 μ g/10 μ L de salina estéril, para o controle 10 μ L de salina estéril.

A cada duas horas após a injeção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os músculos experimentais e controles foram retirados e fixado em solução de formol 10% por 48h. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de histologia para preparação histológica de rotina, cortadas em uma espessura de 5 μ m, e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observação histológica das alterações musculares. As lâminas foram analisadas por meio de um microscópio de luz (Nikon) e sob a responsabilidade do professor Doutor Dalgimar Beserra de Menezes, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará.

4.8.1 Atividade Miotóxica por Dosagem de Proteína-quinase (CK)

Foi coletada amostra de sangue, centrifugada a 3500 r.p.m. por 15 minutos para separação do plasma. As alíquotas de plasma foram transferidas para microtubos e congeladas a -20°C até o momento das dosagens. Foram analisados parâmetros indicativos de função hepática (transaminase oxalacética e transaminase pirúvica), de função renal (creatinina, ureia e ácido úrico).

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC, sob orientação da professora Doutora Maria Goretti R. de Queiroz. Para as determinações bioquímicas, foram utilizados *Kits* comerciais, produzidos pela Lab Test.

4.8.2 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético e a Peçonha de *Philodryas nattereri*

Camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 e 30g divididos em três grupos de seis animais, foram tratados com uma injeção intraperitoneal (i. P.) de salina (0,9%), controle negativo, outro grupo com solução de ácido acético a 0,6 % (v/v) controle positivo e outro grupo a peçonha de *Philodryas nattereri* na dose de 100mg/kg diluído em salina 0,15M (0,9%) também por via intraperitoneal. Decorridos 10 minutos da administração de cada substância, o número de contorções abdominais foi determinado, para cada animal por um período de 20 minutos. Uma contorção deve ser identificada como uma extensão das patas traseiras acompanhada de constrição do abdômen (KOSTER *et al.*, 1959).

4.9 Ensaio com Cultura de Células

4.9.1 Cultivo das Células MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*)

Para investigar se a peçonha bruta da *Philodryas nattereri* estudada possui citotoxicidade em células de túbulos renais, utilizou-se culturas de células epiteliais de túbulos renais de cachorro MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) que foram cedidas pela Professora Doutora Julia Manso (Departamento de Bioquímica, Universidade São Paulo – USP). Os experimentos destas células foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular (LCC), do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da Professora Doutora Alice Maria Costa Martins Nunes.

As células MDCK foram cultivadas em frascos plásticos, com meio RPMI – 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguindo-se da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Olympus® CKX 41®) a cada 24 horas.

4.9.2 Cultivo das Células de Macrófago Peritoneal de Camundongo (RAW-264.7)

Para investigar se a peçonha estudada possui citotoxicidade em células de RAW-264.7 de macrófago de camundongo (ATCC, USA), essas células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75cm²), utilizando o meio de cultura DMEM-High-Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguindo-se da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Olympus® CKX 41®) a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992). Foram empregadas as mesmas técnicas descritas com as mesmas contrações da peçonha para as células MDCK realizadas com MTT.

4.9.3 Estudo da Atividade Citotóxica In Vitro

4.9.3.1 Ensaio com MTT

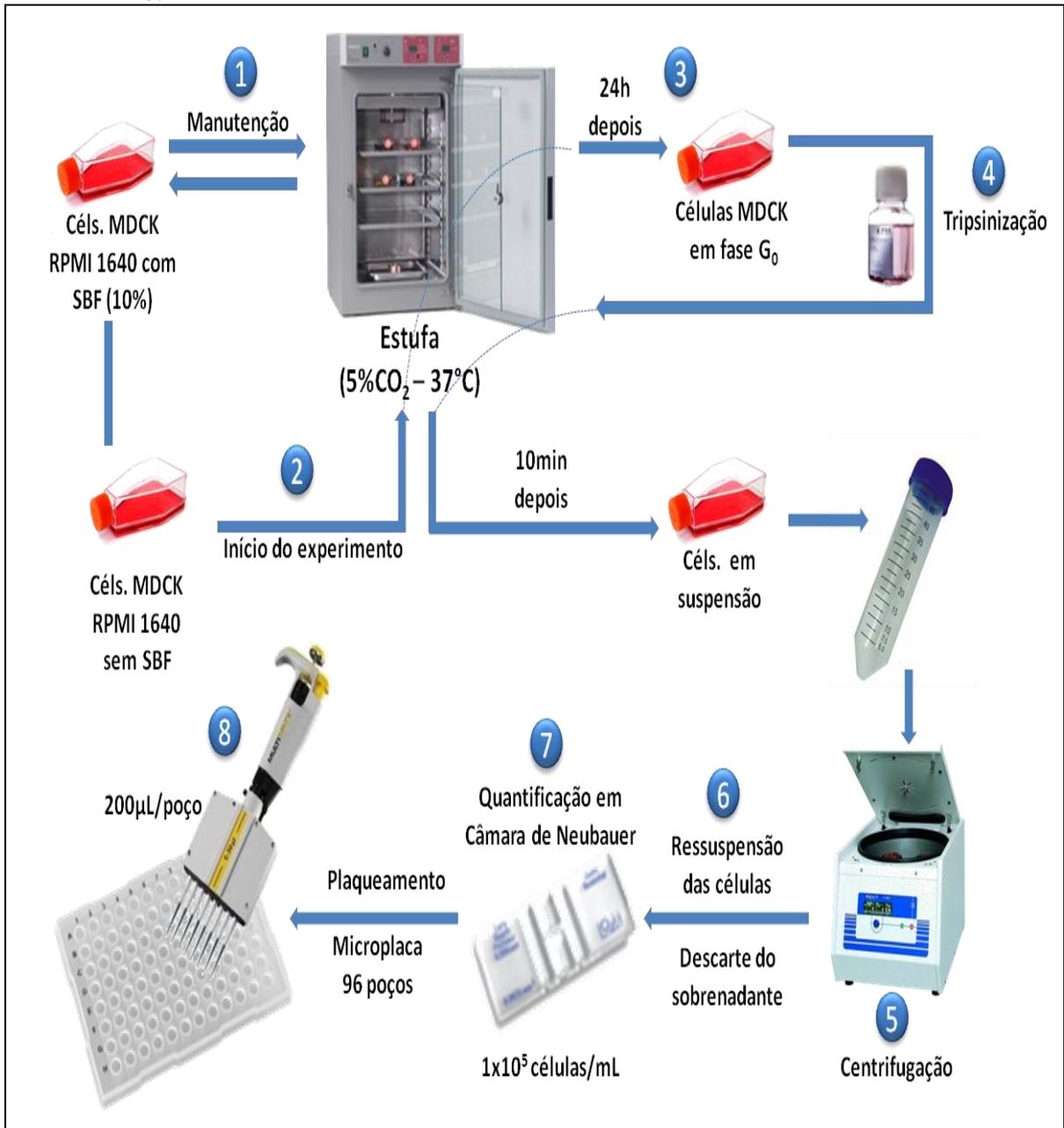
O ensaio consiste em uma análise colorimétrica que mede indiretamente a citotoxicidade (MOSMANN, 1983). O MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H brometo é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas lisossomiais. Na verdade, o MTT não interage diretamente com as desidrogenases e sim com seus subprodutos, NADH e NADPH. Os cristais de formazan são solubilizados, formando um produto colorido cuja medida da densidade óptica é feita em espectrofotômetro a 570nm de absorbância, permitindo, dessa maneira, quantificar o percentual de células vivas. A

intensidade do produto colorido formado é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra, confirmando a capacidade redutora do sistema sobre o MTT (HEINRICH *et al.*,2005).

4.9.3.2 Ensaio Colorimétrico com sal de Tetrazolium (MTT)

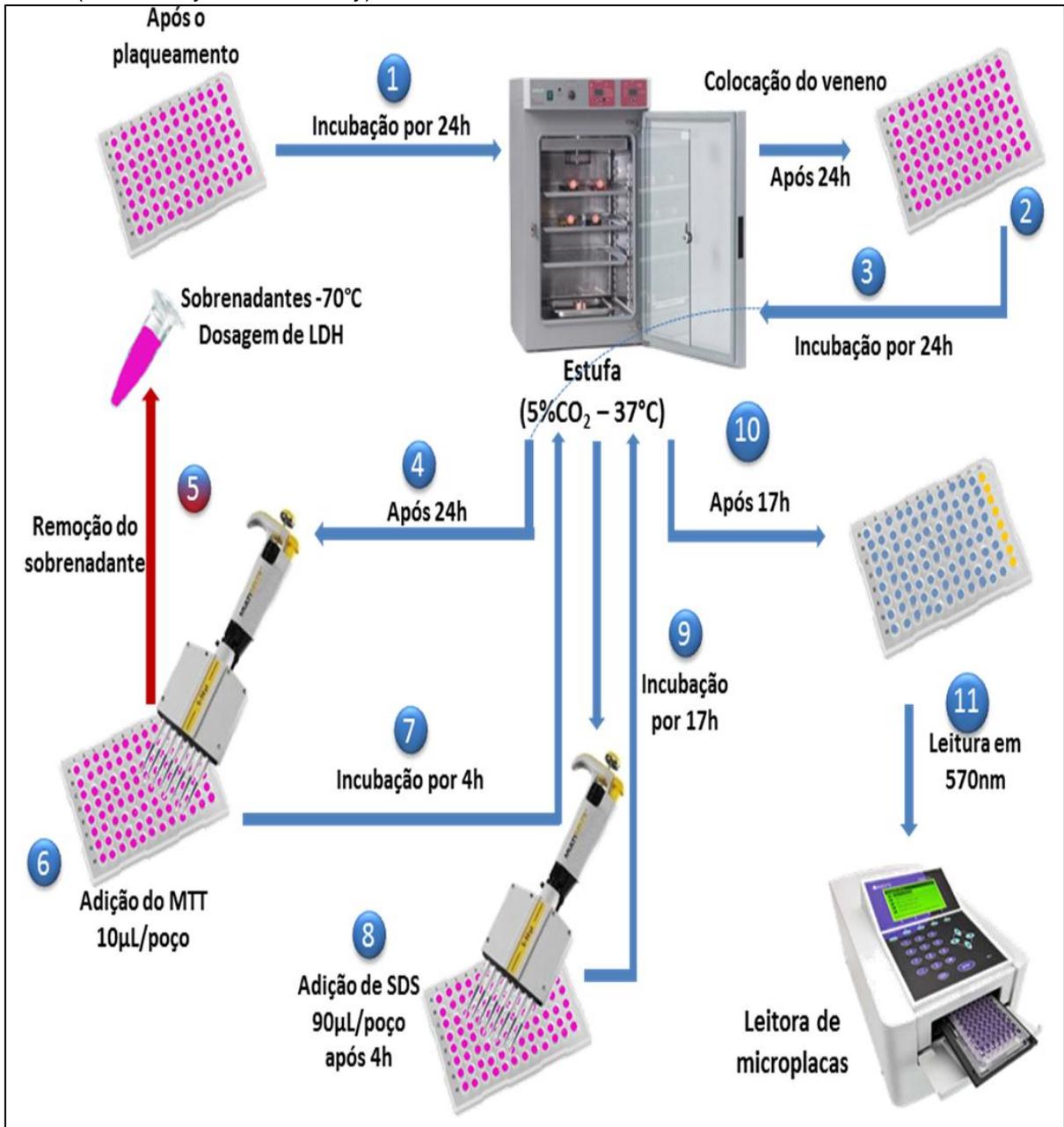
Para realização do ensaio com MTT, as células MDCK e RAW foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 sem soro bovino fetal (SBF) por 24 horas para sincronizá-las na fase G₀ do ciclo celular. Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) e ficaram em contato com esse reagente por aproximadamente 10min em estufa de CO₂ a 37°C, depois de suspensas em meio de cultura e centrifugadas por 5min a 4000 rpm, ressuspensão e quantificação em câmara de Neubauer, utilizando coloração com azul de trypan. Conhecido o número de células por mL, estas foram transferidas (200µL – 1x10⁵ células/mL) para placas de 96 poços. Passadas as 24horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionadas diferentes concentrações da peçonha de *Philodryas nattereri* – 1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; e 100,00µg/mL. Como controle negativo, foi utilizado tampão fosfato (PBS-*phosphate buffer solution*) estéril, pH 7,4. Após 24 horas de incubação com a peçonha, foram removidos 100µL do sobrenadante do meio de cultura, que foi armazenado em *freezer* a -70°C para determinação da enzima lactato-desidrogenase (LDH) (Proliferação Toxicidade), segundo indicações do fabricante (Labtest®- equipamento semiautomático Labquest®). Quando aumentada, a atividade da enzima LDH provê indícios de extravasamento e lesão da membrana celular, permitindo verificar o tipo de dano de que a célula foi alvo (dano direto e/ou apoptose). Aos 100µL do sobrenadante do meio de cultura, adicionamos 10µL da solução do sal de tetrazolium (MTT) (Viabilidade) dissolvido em PBS. Após incubação por quatro horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, somamos 90µL da solução de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS) dissolvido em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e, após 17 horas, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm (Figura 38 e 39).

Figura 38 – Esquema simplificado das etapas do cultivo e tratamento das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).



Fonte: Laboratório de Cultura de Célula.

Figura 39 – Esquema simplificado das etapas do ensaio de viabilidade e proliferação das células MDCK (Madi-Darby Canine Kidney).



Fonte: Laboratório de Cultura de Célula.

Controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células MDCK tratadas apenas com o veículo de diluição da substância-teste (PBS), e, a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais tratados com a substância teste (MOSMANN, 1983).

4.9.4 Análise Estatística

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular *versus* concentração da peçonha. Foi determinada a CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo), a partir de uma curva de regressão não linear, utilizando o programa gaphPad Prism, versão 5.01. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett.

4.9.5 Análise de Dados

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro-padrão médio (EPM). Para comparação, foram empregados o teste “t” e ANOVA (com pós-teste de Bonferroni), utilizando-se como critério de significância $p < 0,05$. Os programas utilizados para efetuar a análise estatística foram Microsoft Excel 2007® e GraphPad Prism 5.0®.

4.9.6 Determinação do Número de Cromossomos da Serpente

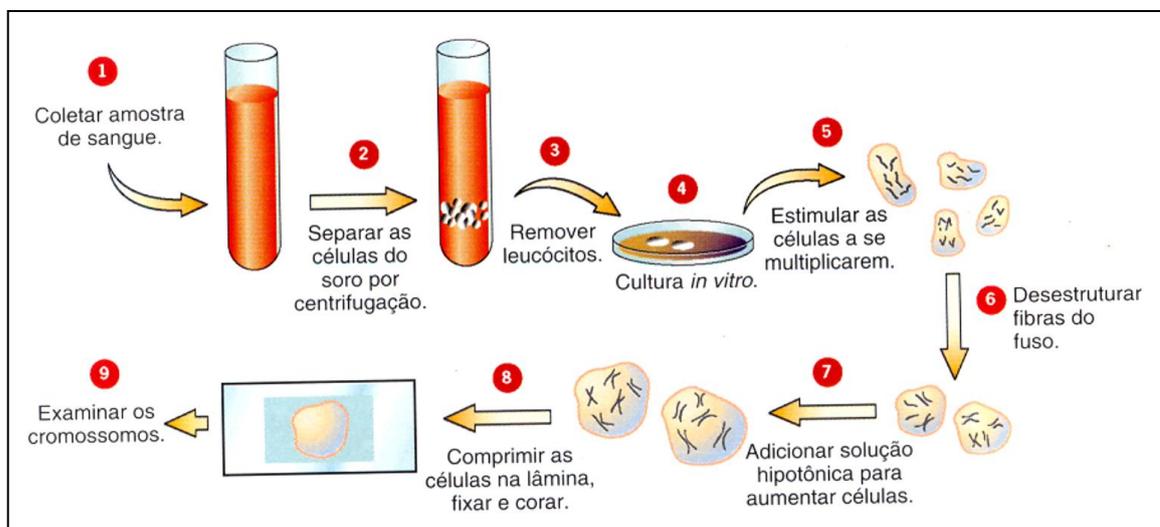
Philodryas nattereri

O método de cultura temporária de leucócitos foi descrito por Beçak *et al.*, (1966) para determinação de cariótipo humano. Essa técnica permite o estudo de cromossomo em células somáticas do sangue de serpentes e outros répteis, apresentando resultados bastante satisfatórios. A quantidade de sangue é reduzida em torno de 0,05mL a 0,25mL. O sangue é colocado em tubo Falcon, contendo uma solução de 5mL de RPMI, 1mL de soro fetal bovino e 0,1mL de fito hemaglutinina. Após 72 horas de incubação a 30°C, a colchicina é adicionada em uma concentração de $1 \times 10^{-6}M$. Depois de seis horas, a cultura é transferida para um tubo de centrifuga e submetida à centrifugação de 900 rpm por cinco minutos. O sobrenadante é descartado e ao precipitado adiciona-se a solução hipotônica de KCl a 0,075M, deixando em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente. Centrifuga-se novamente a 900 rpm, o sobrenadante é descartado e ao precipitado adiciona 5mL da solução de fixação metanol e ácido acético 3:1, que será centrifugada por cinco minutos a 900 rpm – essa por três vezes.

Pronta a suspensão, preparam-se as lâminas com uma pipeta Pasteur, deixando cair uma ou duas gotas da suspensão. A coloração é feita com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6,8) por dez minutos, fazendo um filme com o corante sobre a lâmina. Terminado o tempo, as lâminas são bem lavadas com água destilada e postas a secar em temperatura ambiente (Figura 40).

As metáfases foram identificadas em microscópio óptico Nikon AFX automático, fotografadas, e os cromossomos recortados para montagem e análise dos cariótipos, organizando-se os cromossomos segundo o tamanho e a localização do centrômero. A determinação do comprimento dos braços (maior ou menor), foi feita para determinar a relação de braços. Os cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM) e subtelocêntricos (ST) foram considerados com dois braços, enquanto os acrocêntricos (A) constituídos por um só braço (LEVAN, *et al.*, 1964).

Figura 40 – Técnica de determinação do cromossomos.



Fonte: [http://www.google.com.br/imagens/determinação do cromossomo.](http://www.google.com.br/imagens/determinação%20do%20cromossomo)

4.9.7 Células Bacterianas

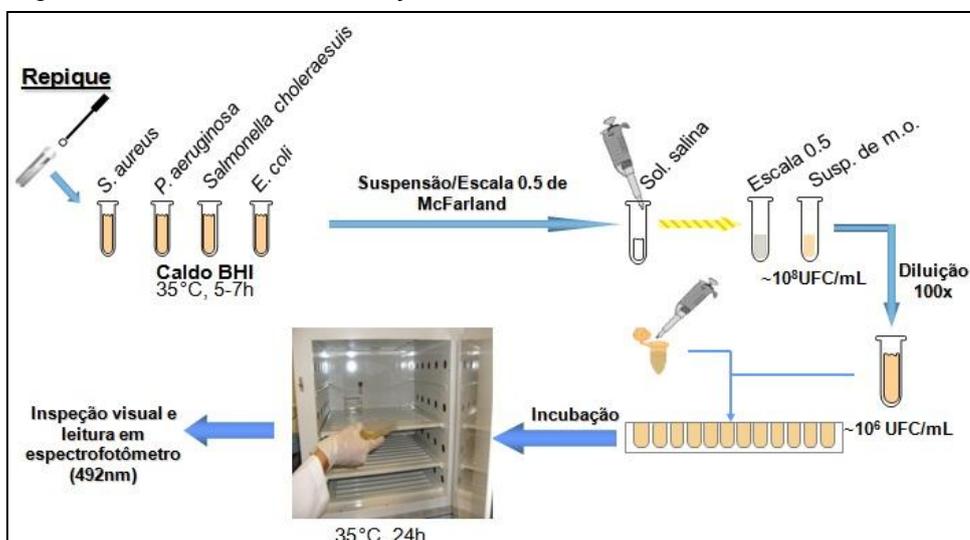
Foram utilizadas cepas de bactérias *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* subsp. *Choleraesuis* sorotipo *choleraesuis* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Estas provêm da Coleção de Microrganismos mantidas em Laboratórios

de Microbiologia do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFC, sob a coordenação da professora doutora Nádia Accyole. Estas culturas são estocadas de forma a conservarem inalteradas suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade antimicrobiano.

4.9.8 Determinação do Potencial Antimicrobiano

O potencial antimicrobiano da peçonha foi estimado pelo método da microdiluição em caldo de cultura (NCCLS, 2003). As bactérias em estudo foram subcultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI), e seu crescimento foi ajustado de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL). As culturas bacterianas foram diluídas 100x (aproximadamente 10^6 UFC/mL) em caldo BHI e adicionadas em placas de 96 poços (80µL/poço) com diferentes concentrações da substância em estudo (20µL/poço) (0, 98 – 200µg/mL), previamente preenchidas (100µL/poço) com caldo BHI. Para controle negativo, foram utilizados poços contendo meio de cultura e inóculo da bactéria em estudo, e, para controle positivo, poços contendo meio de cultura, um agente antibacteriano de uso comercial (amicacina) e inóculo da bactéria em estudo. As placas foram então incubadas a 35°C/24 horas e a inibição do crescimento bacteriano foi determinada por ausência de turvação visual e por meio da mensuração da absorbância a 492nm (Figura 41).

Figura 41 – Ensaio de Microdiluição em Caldo.



Fonte: Torres, 2009.

4.9.9 Análise de Dados

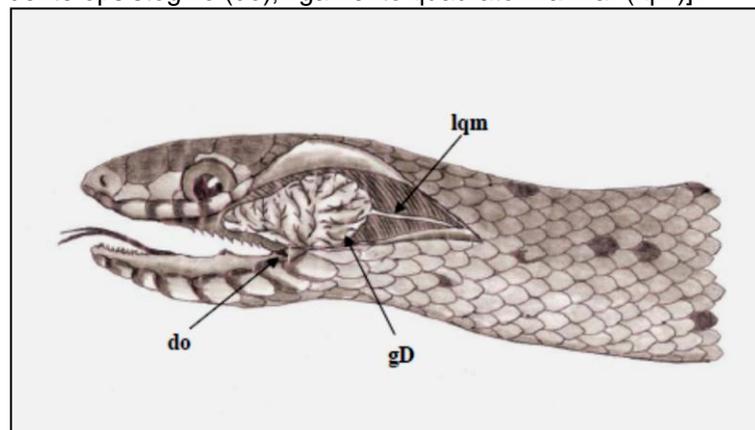
Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão médio (EPM). Para comparação, foram empregados o teste “t” e ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, utilizando-se como critério de significância $p < 0,05$. Os programas utilizados para efetuar a análise estatística foram Microsoft Excel 2007® e GraphPad Prism 5.0®.

4.10 Biblioteca de cDNA da Glândula da Peçonha da *Philodryas Nattereri*

4.10.1 Extração da Glândula da Peçonha

Para a construção da biblioteca cDNA da glândula de peçonha, foram dissecadas as glândulas de serpentes adultas de *Philodryas nattereri* capturadas na Fazenda Aroeiras, do Município de Upanema/Rio Grande do Norte, e tombadas para o Núcleo Regional de Ofiologia da Universidade Federal do Ceará. Duas serpentes foram sacrificadas e dissecadas as glândulas de peçonha (Figura 42) que foram conservadas em solução Síde RNAlater (Quiagen) para preservação do RNA. As glândulas mantidas no RNAlater foram acondicionadas em -80°C para produzir a purificação e análise de RNA.

Figura 42 – Glândula de Duvernoy de *Philodryas nattereri* [(gD); dente opsistóglifo (do); ligamento quadrato-maxiliar (lqm)].



Fonte: Desenho - Claudemir Duran Filho.

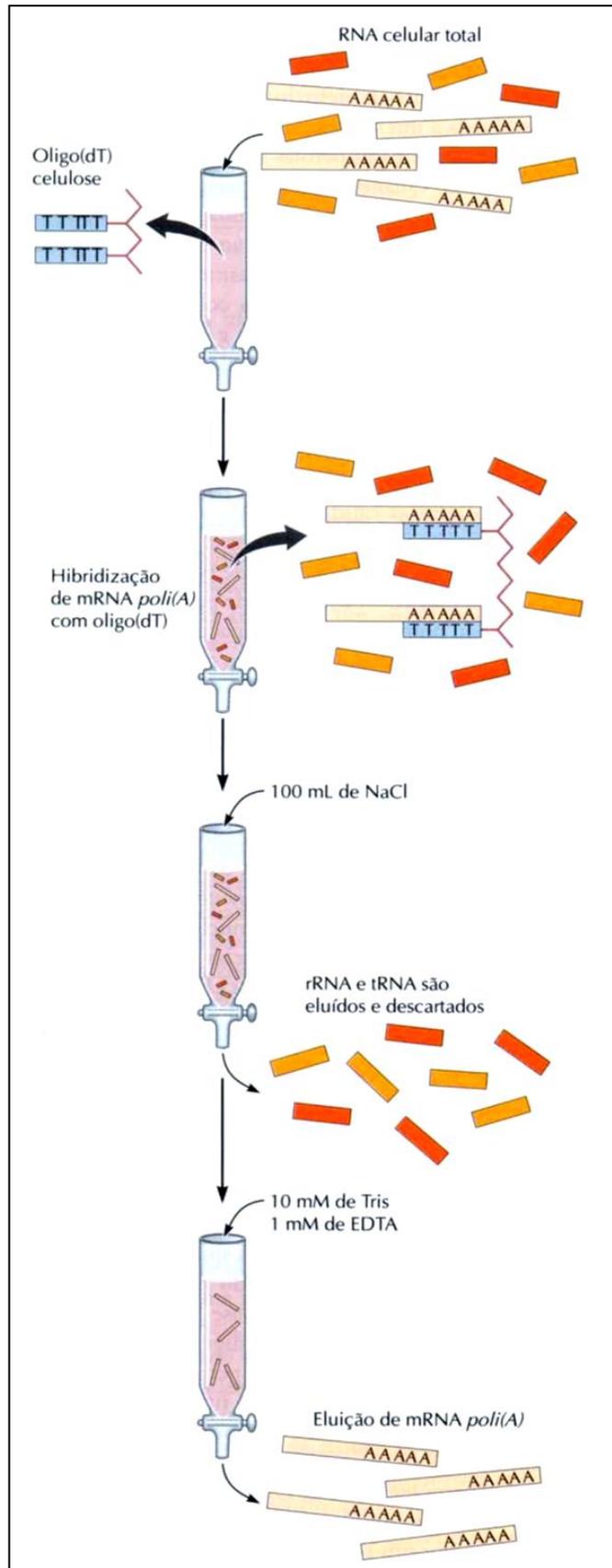
4.10.2 Síntese de Biblioteca de cDNA

4.10.2.1 Isolamento do RNA Total do Gene que Codifica a Peçonha

O RNA total da glândula de peçonha para construção da biblioteca de cDNA foi isolado como segue: as glândulas de peçonha congeladas foram trituradas em um almofariz com nitrogênio líquido. Depois o RNA total foi purificado, com uso do reagente Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante.

A quantidade e o rendimento do RNA total foram verificados para a integridade do rRNA 28S e 18S, por meio de gel de agarose desnaturante e eletroforese, usando espectrofotometria (260/280nm). Poly(A⁺)-RNA foi purificado a partir do RNA total para um complexo de oligo(dT)- biotina e partículas paramagnéticas de estreptavidina Megne Sphere (sistema poly A Tract, Promega, EUA). RNAm, seguida foi quantificada e empregada para síntese cDNA usando o mecanismo de comutação na extremidade 5' do RNA através da transcriptase (SMART) o protocolo (Cretor a SMART e DNA da biblioteca constructrin Kit BD Biosciences, EUA), que preferencialmente purifica a biblioteca final com cDNA de comprimento completo (Figura 43).

Figura 43 – Isolamento de mRNA poli(A).

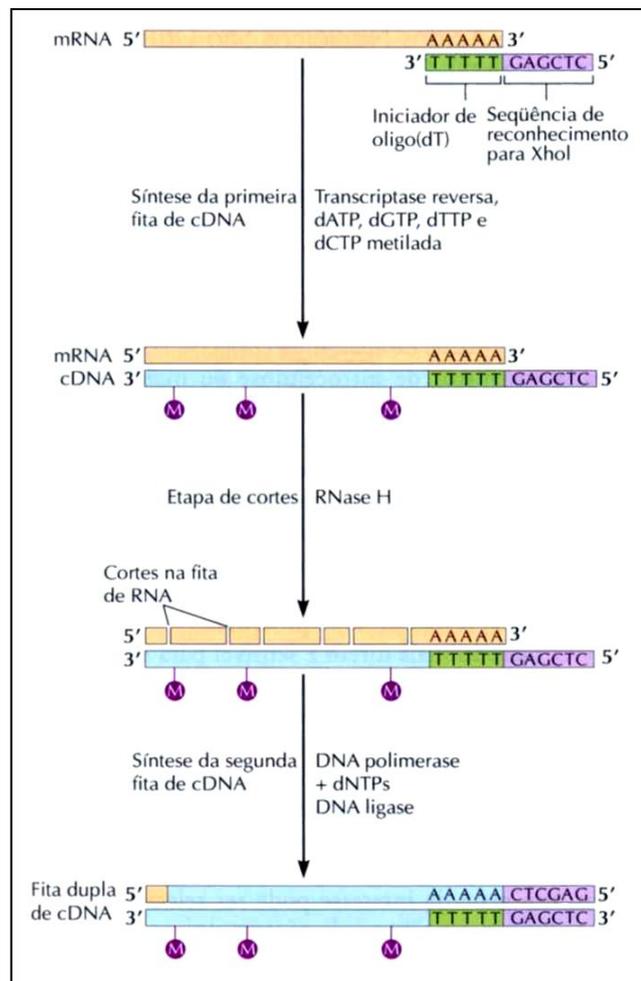


Fonte: WATSON, D. J., 2009.

4.10.3 Síntese de cDNA

Foi realizada de acordo com recomendações do fabricante do IN-Fusion® SMARTer™ Directional cDNA Library Construction Kit User Manual (Clontech, Mountain View, CA-USA). Uma aliquota de 1µg de RNA foi misturada e homogeneizada com 1µL de o 3' SMART CDS *Primer II A* e água deionizada para completar um volume de 4,5µL. O tubo foi incubado a 72°C por 3 min e, logo após, a temperatura foi reduzida para 42°C por 2 min. Adicionou-se o tampão para síntese de fita simples (2µL), DTT (0.25µL), mistura de dNTP (1µL), do oligonucleotideo(SMARTer II A), do inibidor de RNase (0,25µL) e da enzima transcriptase reversa (1µL) (SMARTScribe Reversa Transcriptase). Após homogeneização, o tubo foi incubado a 42°C/90min e, então, armazenado em *freezer* a -20°C (Figura 44).

Figura 44 – Síntese de cDNA.



Fonte: WATSON, D. J., 2009.

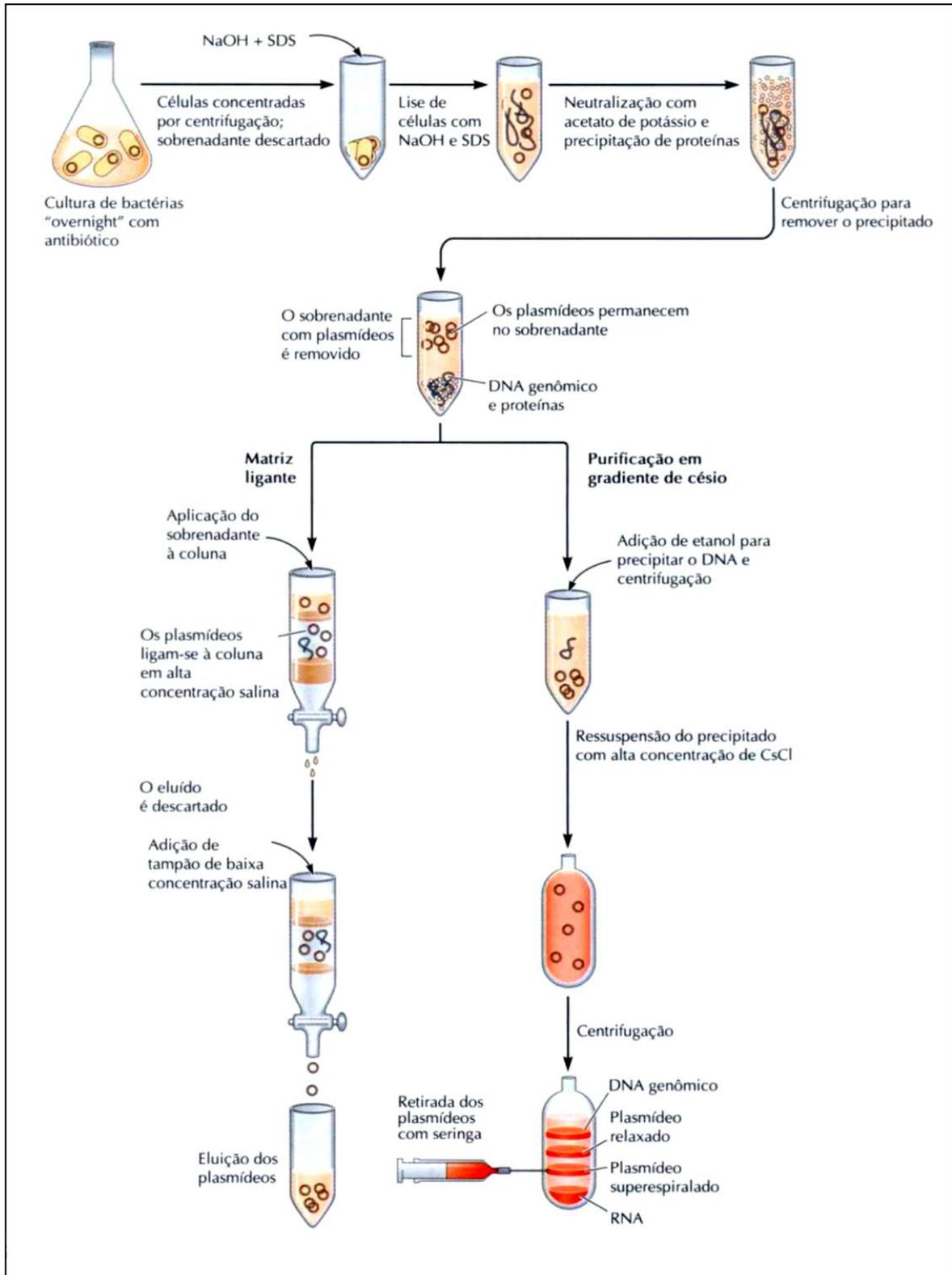
4.10.4 Amplificação por PCR

Em um tubo de reação, foram adicionados e homogenizados 2 μ L do cDNA obtido no item anterior, 82 μ L de água mili-Q autoclavada, 10 μ L de tampão para PCR, 2 μ L de dNTP, 2 μ L de primer 5'para PCR, e a enzima polimerase fornecida pelo kit (2 μ L, homogeneíza). Logo após, o tubo foi colocado no termociclador para o primeiro ciclo a 95°C/1min, o qual foi seguido por vários ciclos a 95°C/15seg, 65°C/30seg e 68°C/6min. Em seguida 5 μ L do produto do PCR foram analisados em gel de agarose (1,2%), utilizando um marcador molecular de DNA (1kb). O gel foi corado em brometo de etídio para visualização do cDNA em luz ultravioleta. Esta análise eletroforética serve para determinar a qualidade do cDNA produzido e o perfil do tamanho em pares de base do cDNA sintetizado. Um cDNA de boa qualidade apresenta um arrastado no gel normalmente entre 0,1 a 4kb. As amostras foram estocadas a -20°C.

4.10.5 Purificação e Fracionamento do cDNA

Esta etapa foi realizada por meio de uma coluna cromatográfica CHROMA SPIN™ DEPC presente no *kit* de síntese de biblioteca de cDNA, equilibrada com tampão e uma amostra de 85 ou 95 μ L. Essa coluna foi acoplada a um tubo coletor e centrifugada a 700rpm/5min. A amostra purificada foi transferida para um tubo de microcentrífuga e adicionados glycogen (1,5 μ L), acetato de sódio 3M pH 4,8(10 μ L) e etanol 100% gelado (250 μ L). O tubo foi incubado a 20°C/1h para precipitar o cDNA. Após a precipitação, o tubo foi centrifugado a 14.000rpm/20min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado etanol 70%(100 μ L), e centrifugado, 14.000rpm/5min, o sobrenadante descartado e o cDNA precipitado é ressuspenso em 15 μ L de tampão TE (Figura 45).

Figura 45 – Purificação de DNA plasmidial de *Escherichia coli*.



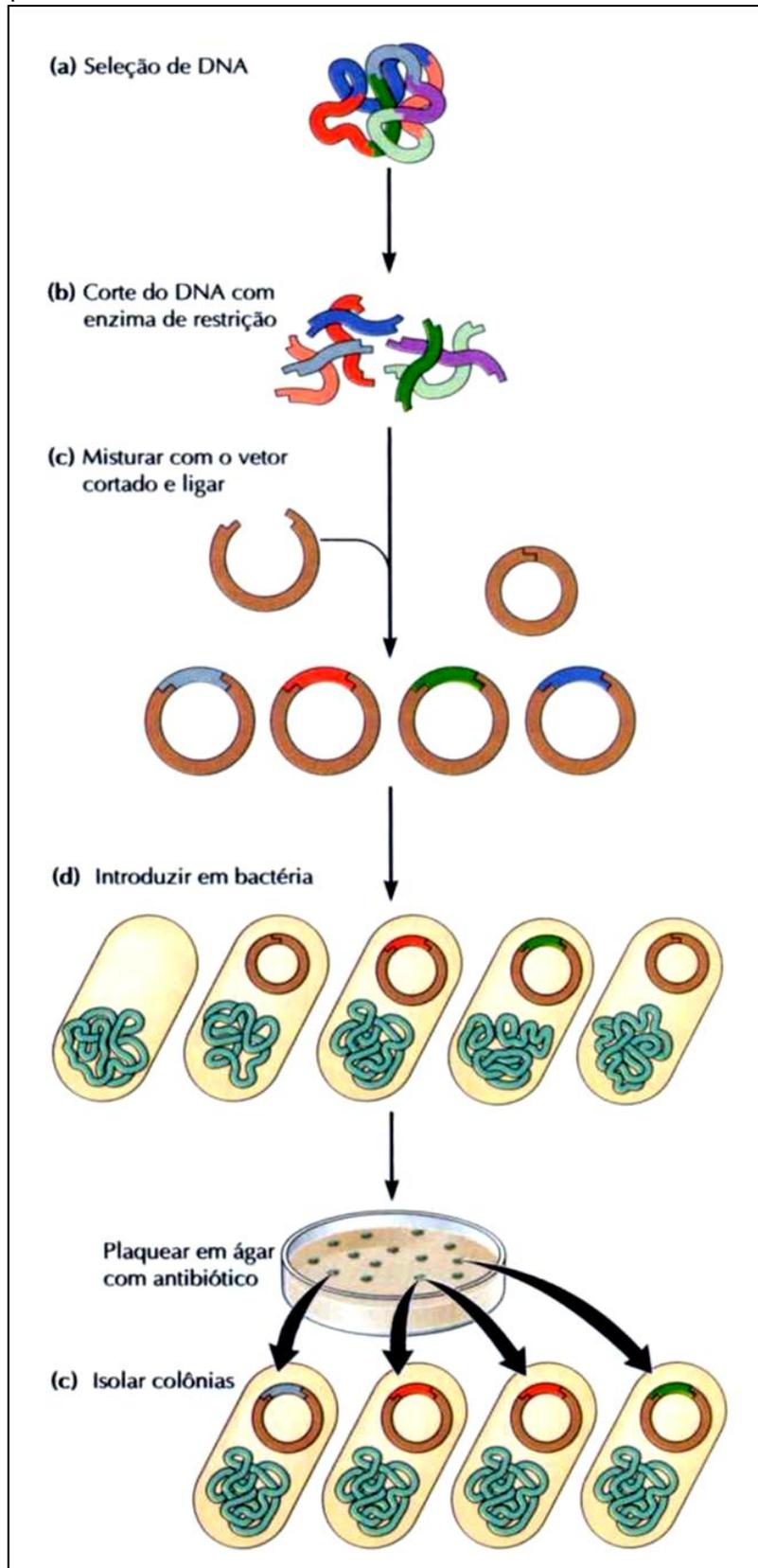
Fonte: WATSON, D. J., 2009.

4.10.6 Adição do cDNA ao Vetor

Em tubos de eppendorf de 0,5mL, adicionou-se diferentes quantidades (A=3 μ L; B=4 μ L; C=5 μ L) de cDNA obtido nas etapas anteriores; 2 μ L do vetor (pSMART2IF); 2 μ L do tampão de ligação (In-Fusion Reaction Buffer); 1 μ L de DNAligase e H₂O deionizada para um volume final de 10 μ L, que foram incubados por 15min/37°C, seguindo-se 15min/50°C .

Após este período, os tubos foram mantidos em gelo e adicionados 90 μ L de H₂O estéril 1,5 μ L de glicogênio em cada tubo de reação que foi homogeneizado para adicionar 280 μ L de etanol 100% incubado a -70°C/1-2horas. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 15.000rpm/20min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 10 μ L de H₂O deionizada em que ficaram incubados a -20°C até o uso com mostra na figura 46.

Figura 46 – Etapas básicas de clonagem de DNA em um plasmídeo.



Fonte: WATSON, D. J., 2009.

4.10.7 Transformação de Plasmídio Recombinante em *E. Coli*

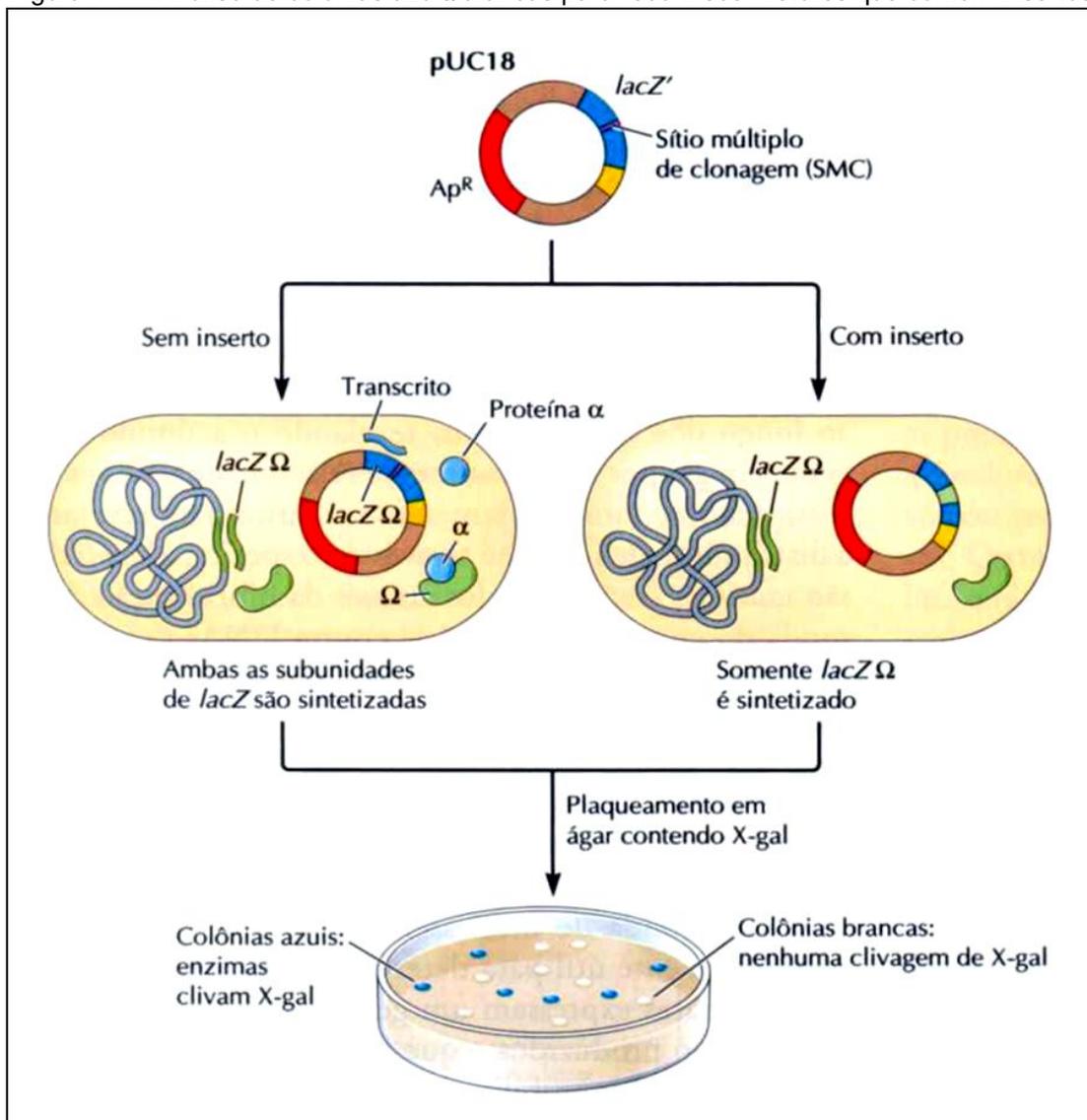
Adicionou-se o volume dos tubos de ligação (A, B, C) ao volume de 25µL de células de *E. Coli* eletrocompetentes. A mistura foi eletroporada em cubetas refrigeradas de 0,1cm. O volume foi transferido para tubos de Falcon, contendo 970µL de caldo LB (Luria-Bertani) e incubados, sob agitação, a 37°C/1hora. Em outros três foram adicionados 50µL de caldo LB e ao final de incubação, foram retirados 2µL da mistura e adicionados aos tubos contendo 50µL de caldo LB; uma alíquota da mistura foi subcultivada em ágar LB contendo 100µg/mL de ampicilina 1mM de IPTG, 75mg/mL de X-Gal e incubada a 37°C/overnight. As placas que contêm as bactérias transformadas confluentes podem ser comparadas com o controle negativo (sem crescimento, amostra sem DNA) e positivo (crescimento, amostra contendo plasmídeo intacto). Os clones foram titulados através de diluições seriadas, devendo apresentar um número $>10^8$ ufc/ml (Como mostra na figura anterior).

4.10.8 Análise dos Clones Obtidos

Após titulação da biblioteca de cDNA sintetizada e as devidas ampliações deste, os diversos clones foram analisados via reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos iniciadores específicos para o vetor utilizado. Para a execução do experimento, uma alíquota de 10µL da biblioteca foi subcultivada em placa de ágar LB. Cada clone obtido foi analisado e separadamente coletado da placa após crescimento em estufa a 37°C/18horas. O clone foi coletado em um tubo de eppendorf (0,2mL) contendo 50µL de H₂O Mili-Q autoclavada. Os tubos seguiram para o termociclador onde foram aquecidos por cinco minutos a uma temperatura de 95°C. Um volume de 2,5µL do sobrenadante foi amplificado por PCR, como descrito acima, os iniciadores M13 específicos ao vetor empregado na síntese da biblioteca. Utilizou-se a enzima GoTaq Green (Promega), usando como protocolo um primeiro ciclo de 95°C por cinco minutos seguido de 30 a 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento a 60°C por 30 segundos; e extensão a 72°C por um minuto. Repetiu-se os 30 a 35 ciclos de

amplificação, realizou-se uma extensão final a 72°C por dez minutos. Todos os produtos obtidos foram avaliados em gel de agarose 1% e fotodocumentados pelo equipamento Chemidoc XRS (Bio-Rad/USA). Após a verificação do tamanho dos insertos por eletroforese, uma alíquota deste PCR foi purificada no QIAquick Purification Kit (QIAGEN/USA), anteriormente ao processo de sequenciamento. Os produtos da PCR purificados foram avaliados por um sequenciador automático de DNA 3100Avant (Applied Biosystems, USA). As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências presentes no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) no sítio eletrônico (Ver figura 47).

Figura 47 – Análise de colônias azuis/brancas para reconhecer vetores que contêm insertos.



Fonte: WATSON, D. J., 2009.

4.10.9 Sequenciamento de Clones Aleatórios

Uma alíquota do PCR foi purificada no QIAquick Purification Kit (QIAGEN/USA) anteriormente ao processo de sequenciamento, seguindo as instruções do fabricante. Os produtos da PCR purificados foram avaliados por um sequenciador automático de DNA 3100Avant (Applied Biosystems, USA), utilizando-se o ABI Prism BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reactions (DETWILER *et al.*, 2005) (Figura 48). As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências presentes no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Figura 48 – Sequenciador automático de DNA 3100Avant (Applied Biosystems, USA).



Fonte: <http://www.google.com.br/Sequenciador++autom.>

4.11 Ressonância Magnética Nuclear

Para analisar a peçonha bruta da *Philodryas nattereri*, usou-se a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN). Usamos entre 5 e 7 mg da peçonha bruta da *Philodryas nattereri*. Esse composto contém átomos de ^1H ou ^{13}C num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia eletromagnética, os núcleos podem absorver energia

num processo denominado ressonância magnética. A radiação utilizada no espectrômetro de RMN é a radiofrequência (rf), de comprimento de onda altíssima (da ordem de metros) e baixa energia (da ordem de 10^{-6} Kcal/mol). A absorção desta radiação pelos núcleos desses elementos é quantizada e produz um espectro característico. Esta absorção não ocorre a menos que a frequência da radiação e a intensidade do campo magnético tenham valores bem definidos. Os espectrômetros medem a absorção de energia pelos núcleos de ^1H e ^{13}C , além do núcleo de outros elementos.

Os espectros de RMN ^1H ; 500, 400 e 200MHz; ^{13}C : 125 e 50MHz (incluindo experimentos especiais 1D e 2D) foram obtidos com espectrômetros Bruker modelo DRX - 500 do CENAUREMN do sob a orientação do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do Departamento de Química Inorgânica e Orgânica da UFC. O sinal residual do solvente deuterado utilizado na dissolução das amostras ou o TMS (tetrametilsilano – $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ contém 12 prótons) foi utilizado como referência interna.

Os espectrofotômetros de ressonância magnética nuclear são constituídos por[3]:

- um oscilador de radiofrequência;
- um receptor de radiofrequência;
- um registrador;
- Calibrador e integrador; e
- um compartimento de amostra que permite o posicionamento desta em relação ao campo magnético principal, à espécie do transmissor e à espécie do receptor.

Existem vários tipos de espectrofotômetros, entre os quais:

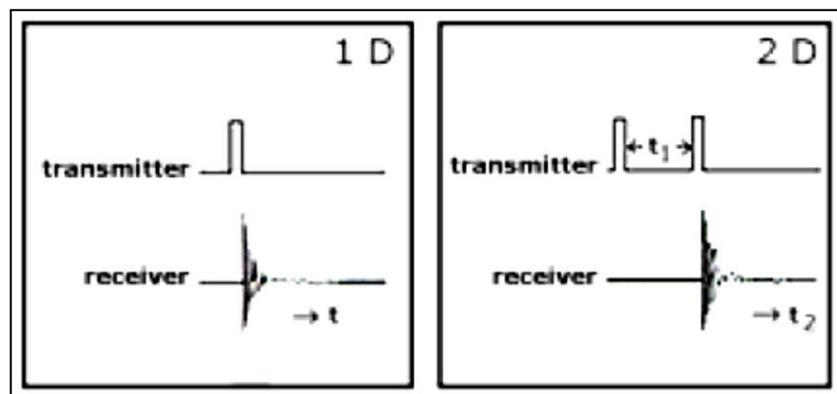
- espectrofotômetro de onda contínua – a frequência é variada de forma contínua e linear, por modulação de frequência básica; e
- espectrofotômetro de impulsos ou de onda pulsada (transformada de Fourrie) – a radiação de radiofrequência é muito mais intensa, mas é aplicada durante curtos intervalos de tempo.

4.12 Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional – 2D

Um dos desenvolvimentos mais importantes para a espectroscopia durante os anos de 1960 – 1970 foi o desenho de novos magnetes, baseados em materiais supercondutores. Este novo tipo de magnetes possibilitou a obtenção de campos magnéticos maiores e mais estáveis, levando à obtenção de espectros com muito melhor sensibilidade e resolução.

A partir deste momento, se podia estudar sistemas mais complexos, porém, o grande desenvolvimento surgiu com Ernst, que desenvolveu em 1975 um sistema de FT-RMN bidimensional (2D), baseado nas técnicas de pulsação. O diagrama ilustra o desenvolvimento do tempo do método FT-RMN unidimensional (1D) e FT-RMN (2D) (Figura 49).

Figura 49 – Pico mostrado em 1 e 2 dimensões.

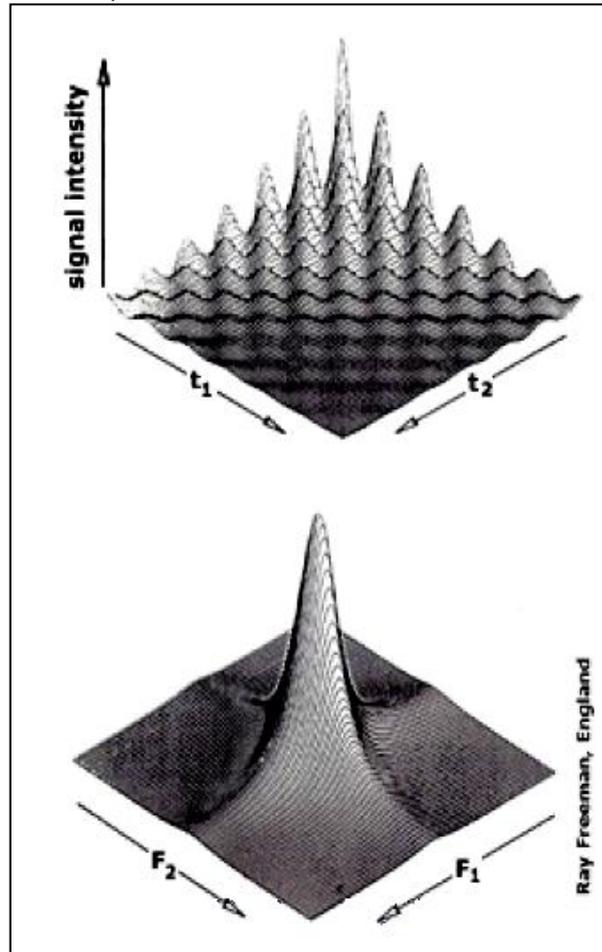


Fonte: UNIVERSIDADE DA MADEIRA. Departamento de Química.

Em RMN (1D), os spins nucleares são expostos a um pulso, após o qual, é detectado um sinal no receptor em função do tempo t_1 . Em RMN (2D), os spins nucleares são sujeitos a dois ou mais pulsos, com um intervalo de tempo t_1 .

Após o segundo pulso, o sinal é obtido da mesma forma que para RMN (1D), embora aqui se designe a variável de tempo por t_2 . Depois desta etapa, o espectrofotômetro retoma o mesmo procedimento mas repetindo-o com outros valores de t_1 . A variação de t_1 modifica o sinal medido durante t_2 . Esta situação origina, então, uma tabela bidimensional que contém a intensidade do sinal como função da t_1 e t_2 (Figura 50).

Figura 50 – A RNM em 1D a um pulso e 2D a dois ou mais pulsos.



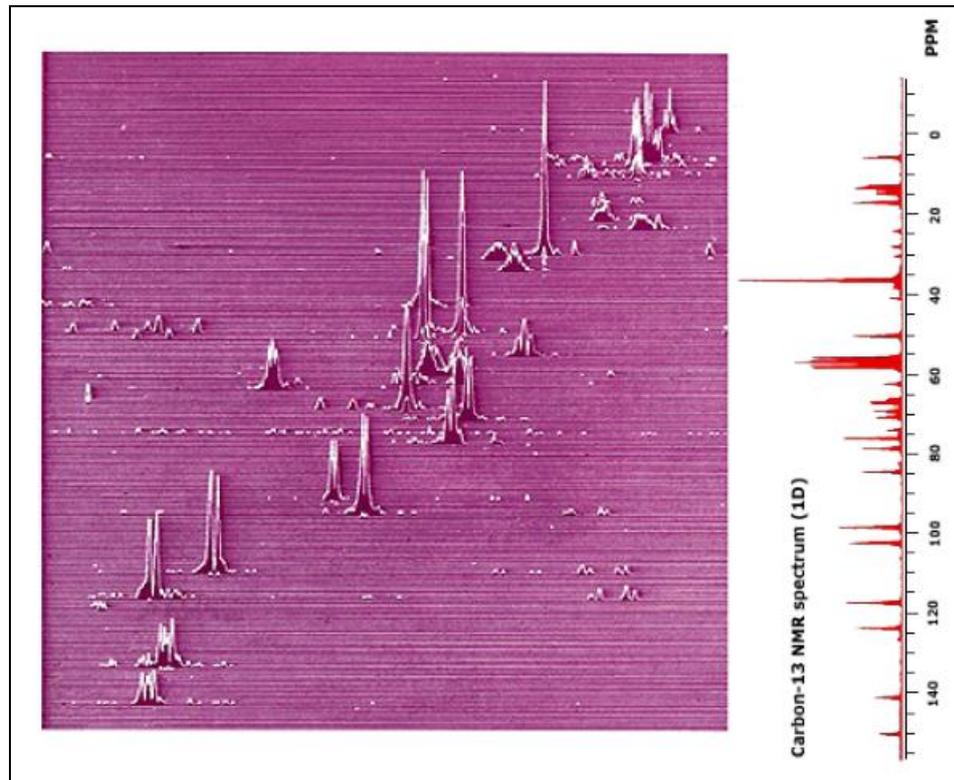
Fonte: Universidade da Madeira. Dep. de Química.

Após estas variáveis serem submetidas e transformadas de Fourier, obtém-se um espectro de frequência bidimensional na forma de um mapa, que mostra a dependência da intensidade do sinal em duas variáveis de frequência, denominadas F_1 e F_2 .

Os dois eixos de frequências correspondem às frequências de ressonância de prótons e carbonos ^{13}C . A ocorrência de um sinal num determinado local significa que o átomo de carbono, que no mapa corresponde a “latitude”, está diretamente ligada ao próton cuja frequência de ressonância é dada pela “longitude”.

Os espectros unidimensionais de próton e de carbono ^{13}C são ilustrados nos extremos da seguinte Figura 51.

Figura 51 – Espectro de correlação de uma molécula orgânica.



Fonte: UNIVERSIDADE DA MADEIRA. Departamento de Química.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear tornou-se um método *padrão* em muitos laboratórios de Química. Esta técnica é reconhecidamente a mais importante para a investigação a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria, uma vez que existem relações muito próximas entre os dados obtidos por ^1H -RMN e o arranjo dos prótons na molécula em investigação (CORREIA *et al.*, 2001).

Em muitos casos, este conhecimento permite:

- prever espectros de moléculas, com base apenas na fórmula estereoquímica;
- propor uma estrutura para uma molécula desconhecida, com base apenas no seu espectro; e
- decidir entre várias estruturas possíveis para uma molécula, com base no espectro obtido, ou pelo menos um limite de várias possibilidades.

A aplicação da Espectroscopia de RMN baseia-se, deste modo, essencialmente, na correlação empírica das estruturas com deslocamentos químicos observados e constantes de acoplamento.

Em termos de investigação clínica e desenvolvimento de imagem, a RMN direciona-se para determinados objetivos, nomeadamente para:

- comparar a RMN com outras modalidades;
- aproveitar as características únicas da imagem RMN;
- determinar as técnicas mais úteis para cada local ou doença;
- determinar a utilidade de medidas diretas de T1 de tecidos normais e de lesões benignas e malignas;
- interrelacionar com a cirurgia e radioterapia na preparação, planeamento e estudo da resposta ao tratamento de cancros e linfomas;
- avaliar o problema da segurança; e
- desenvolver técnicas de aumento de contraste (CORREIA *et al.*, 2001).

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica que vem sendo utilizada fruto das enormes vantagens que possui, nomeadamente a possibilidade de estudar um elevado número de núcleos e em todas as fases (gás, líquido e sólido), elevados intervalos de temperaturas, técnica não destrutiva e segura. O recurso a esta técnica, no entanto, também traz alguns inconvenientes que se referem à insensibilidade do método, bem como à impossibilidade de analisar misturas multicomponentes e ao elevado custo dos aparelhos e sua manutenção (NASCIMENTO *et al.*, 2001).

A versatilidade da NMR, contudo, faz dela um dos métodos mais importante e perspicazes usados nas mais diversas ciências, onde têm aplicação, tal como a área científica onde devem ser respeitados alguns códigos impostos pelos organismos próprios e resumidos no apêndice (CORREIA *et al.*, 2001).

5 RESULTADOS

5.1. Caracterização Bioquímica

5.1.1 Dosagem Proteica

De acordo com os experimentos realizados, comparou-se o teor de proteína total da peçonha bruta liofilizada *Philodryas nattereri*, com a peçonha de *Bothrops jararaca* (peçonha Referência Nacional). A concentração de proteínas da amostra $[P] [P] = AbxF^* \times d$; * Fator = concentração/absorbância; $[P] = 863,9\mu\text{g/mL}$ foi o teor proteico total da peçonha de *Philodryas nattereri*.

Como mostra a tabela abaixo a proteína total bruta da *Bothrops jararaca* corresponde a 100% de proteína bruta enquanto a *Philodryas nattereri* corresponde a 86% de proteína bruta.

Tabela 4 – Teor proteico total das peçonhas de *Philodryas nattereri* e *Bothrops jararaca*. (*) Diferença significativa, analisado por Teste t Student ($p < 0,05$), utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

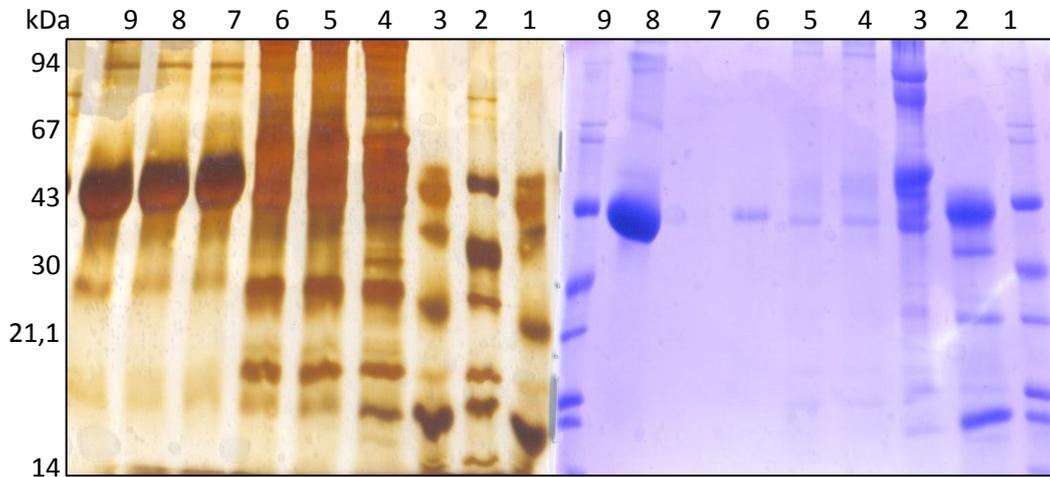
Espécie	Proteínas $\mu\text{g/mg}$ de Peçonha	Conteúdo %
<i>Philodryas nattereri</i>	863,9 $\mu\text{g/mL}$	85 – 90
<i>Bothrops jararaca</i>	1027,10 \pm 0,02* ($p:0,049535$)	100

Fonte: Autora (2012).

5.1.2 Perfil Proteico da Peçonha Bruta

O perfil proteico da peçonha de *Philodryas nattereri* analisado por SDS (PAGE-SDS) (Figura 52) mostra alta densidade nas bandas nas regiões de baixo, médio e alto peso molecular.

Figura 53 – SDS-PAGE das peçonha em gel de poliacrilamida (7,5-17,5%) de acordo com o método de LAEMMLI *et al.*, 1970. 1) Padrão de peso molecular albumina de soro bovina (67 kDa); 2) Peçonha de *Bothrops jararaca* (60 µg) não reduzido; 3) Peçonha de *Philodryas nattereri* (60 µg) não reduzido; 4) Peçonha de *Bothrops jararaca* (60 µg) reduzido; 5) Ovalbumin, 6) anidrase carbônica, 7) inibidor de tripsina de soja; 8) lisozima (14.4 kDa) e 9) Padrão de peso molecular albumina de soro bovina.



Fonte: Autora (2012).

5.2 Caracterização Biológica

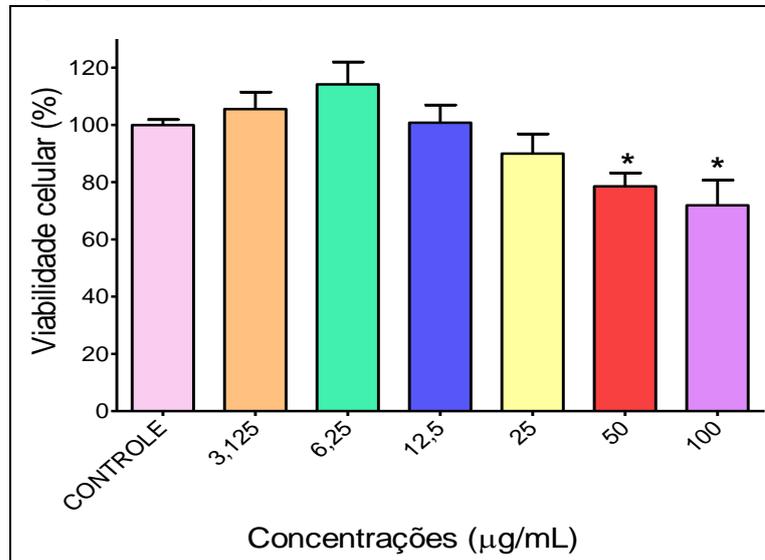
5.2.1 Avaliação do Efeito da Peçonha da Serpente

Philodryas nattereri sobre Células MDCK

5.2.1.1 Ensaio de Viabilidade Celular

A citotoxicidade da peçonha da *Philodryas nattereri* foi avaliada em células tubulares renais (MDCK) após 24 horas de exposição a diferentes concentrações da peçonha (em µg/mL: 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100). No ensaio com o MTT, observa-se que a peçonha reduziu significativamente a viabilidade das células MDCK nas concentrações de 50 e 100µg/mL testadas, quando comparadas ao controle, com uma IC₅₀ de 1,25µg/mL. A figura 53 representa a percentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%.

Figura 53 – Percentagem de viabilidade celular em relação à peçonha de *Philodryas nattereri*.



Fonte: Autora, 2011.

O percentual de viabilidade das células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) após exposição à peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (3,12; 6,25; 12,50; 25,0; 50,0 e 100µg/mL), cujos os resultados foram expressos em média e erro-padrão da média (EPM) em termos de percentual de viabilidade celular, representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle ($n = 3$ ANOVA –Tuker).

Tabela 5 – O Percentual de Viabilidade Celular das Células MDCK Expostas a Peçonha da Serpente *Philodryas nattereri* (ph N) nas Concentrações de 3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 e 100,0 µg/mL.

Grupos Experimentais													
Controle		PhN 3,12		PhN 6,25		PhN 12,50		PhN 25		PhN 50		PhN 100	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
99,95	1,92	105,5	5,95	114,2	7,793	100,8	6,21	89,98	6,87	78,54*	4,648	71,90*	8,79

Fonte: Autora, 2011.

Os resultados dos experimentos ($n = 3$) foram expressos em média mais erro-padrão da média EPM), em % de viabilidade celular, Foi considerado $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle (ANOVA- Tukey).

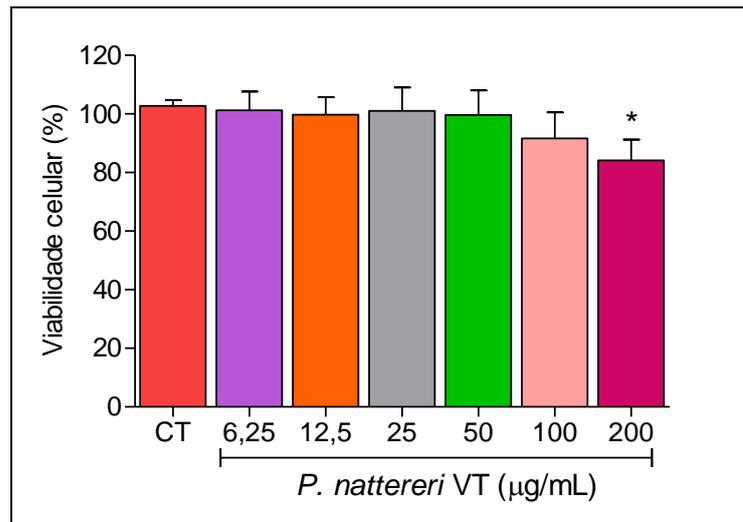
5.3 – Macrófagos - RAW - 264.7

5.3.1 Viabilidade Celular e Citotoxicidade com Sal de Tetrazolium (MTT)

A citotoxicidade da peçonha bruta da *Philodryas nattereri* foi avaliada em cultura de macrófagos após 24 horas de exposição a diferentes concentrações da peçonha na cultura de 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200µg/mL.

Para essas concentrações, as absorbâncias obtidas demonstraram que só na maior concentração foi capaz de produzir formazan, entre as concentrações estudadas. Esses resultados podem ser visualizados na figura 54 e na tabela 6.

Figura 54 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* sobre a viabilidade de macrófago (RAW – 264.7), com MTT.



Fonte: Autora (2011).

Os dados são expressos por média \pm EPM da absorbância e representam o percentual de células viáveis. Considerou-se um $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle ($n = 3$, amostras em triplicata (ANOVA – Tukey).

Tabela 6 – Valores de percentual de viabilidade celular das células de Macrófago (RAW – 264.7) expostas ao Peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas Concentrações de 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,0 e 200,0µg/mL.

Grupos Experimentais													
Controle		PhN 6,25µg/ml		PhN 12,5µg/ml		PhN 25,0µg/mL		PhN 50,0µg/mL		PhN 100,0µg/mL		PhN 200,0µg/mL	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
100,2	3,07	98,2	6,16	97,2	5,69	97,6	7,58	96,5	7,78	89,2	7,87	87,8	7,0

Fonte: Autora, 2011.

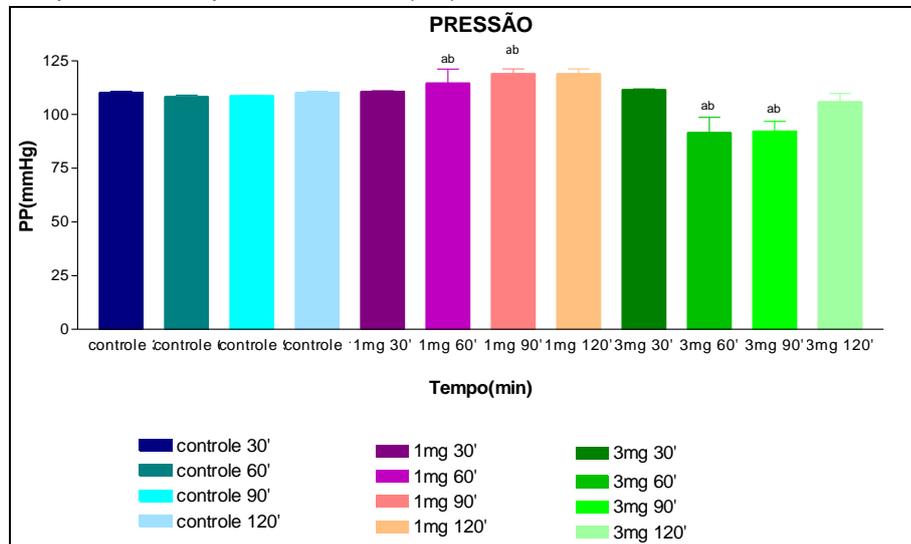
Os resultados dos experimentos ($n = 3$) foram expressos em média mais erro-padrão da média (EPM), em % de viabilidade celular. Considerou-se $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA – Tukey).

5.4 Perfusão Renal

5.4.1 Rim Isolado

Após a aplicação da peçonha *Philodryas nattereri* nas doses de 1mg/mL e 3mg/mL, foram observadas alterações na fisiologia renal. Em termos de pressão de perfusão (PP), notou-se que houve aumento significativo desse parâmetro aos 90min na concentração de 1mg/mL. Na concentração de 3mg/mL, a PP foi reduzida significativamente no tempo de 60 e 90min retomando a valores próximos ao do grupo-controle (Figura 55 e Tabela 7).

Figura 55 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (ph N) na pressão de perfusão renal (PP).



Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle ($n=6$) e ph N (1,0 e 3,0 μ g/mL- $n=6$) foram expressos em média mais erro-padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min); "a" representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle interno e "b" significa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA-Holm Sidak).

Tabela 7 – Valores de pressão de perfusão renal (PP) dos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas concentrações de 1mg/mL e 3mg/mL.

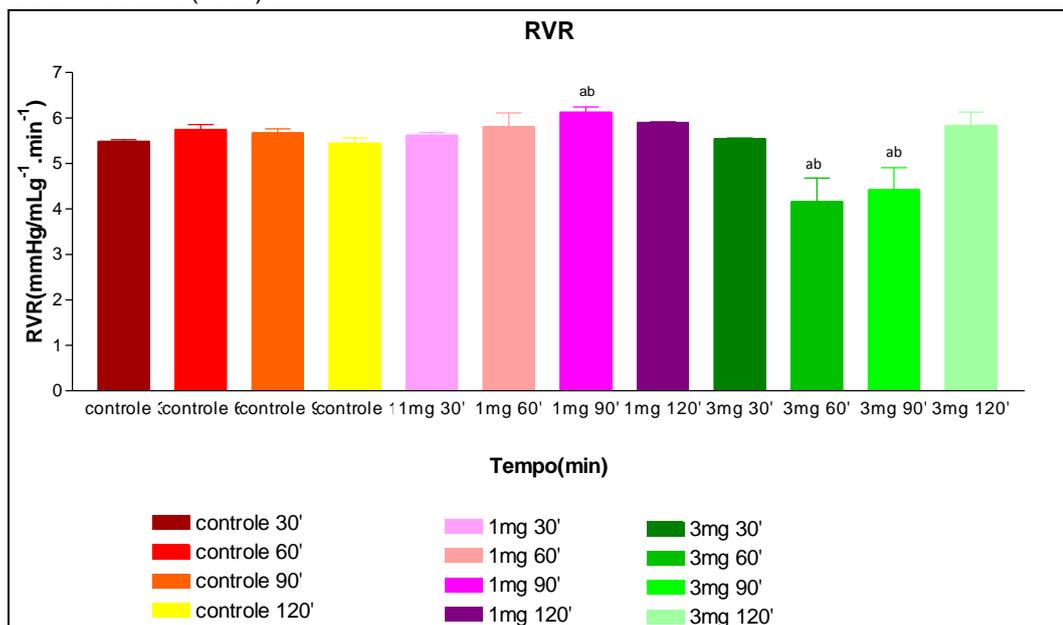
Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo Controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	110,30	0,50	110,70	0,33	111,60	0,33
60	108,30	0,68	114,70 ^{ab}	6,46	91,57 ^{ab}	7,10
90	108,70	0,22	119,00 ^{ab}	2,18	92,23 ^{ab}	4,59
120	110,30	0,50	119,00	2,18	105,90	3,82

Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n = 6) e PhN, 1,0; 3,0mg/mL - n = 6) foram expressos em média e erro padrão da média (EPM), unidade em mmHg, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min); (a) representa p < 0,05 em relação ao grupo-controle interno e (b) significa p < 0,05 em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

A resistência vascular renal (RVR) também se mostrou aumentada aos 60 e 90 minutos, quando o rim foi perfundido com PhN na concentração de 1,0mg/mL, sem alteração em 120min. Com relação ao controle, na concentração de 3,0mg/mL da PhN, foi capaz de reduzir a RVR nos tempos de 60 e 90 min. A redução desse parâmetro foi tanto em relação ao controle interno do experimento quanto grupo controle externo (Ver Figura 56 e Tabela 8).

Figura 56 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) na resistência vascular renal (RVR).



Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/mL, n=6) foram expressos em média mais erro-padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90, 120min); (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA- Holm Sidak).

Tabela 8 – Valores da resistência vascular renal(RVR) dos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri*(PhN) nas concentrações de 0,1 μ g/mL e 0,3 μ g/mL.

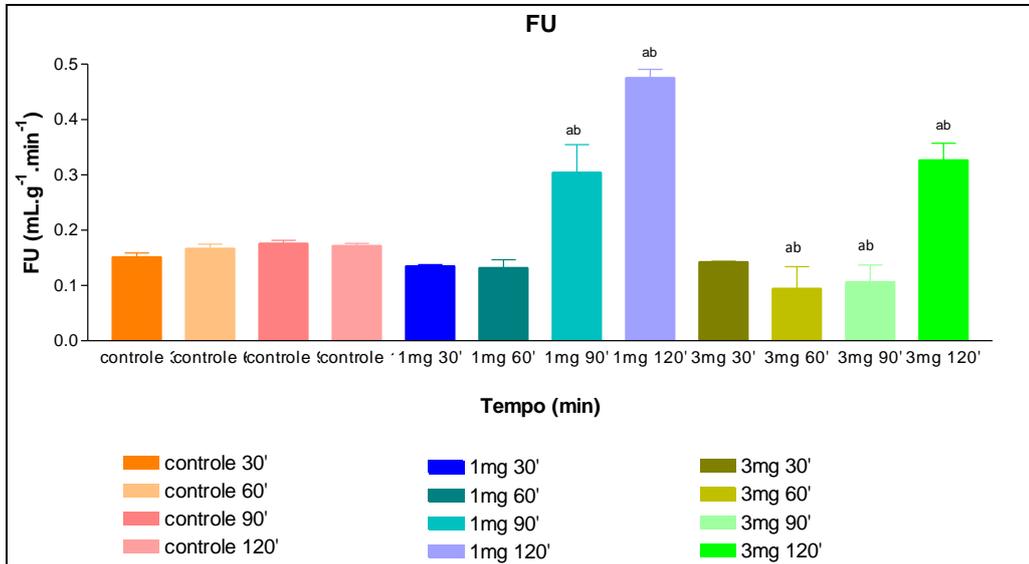
Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo-controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	5,49	0,04	5,62	0,06	5,55	0,01
60	5,75	0,11	5,81	0,30	4,17ab	0,51
90	5,67	0,09	6,12ab	0,12	4,42ab	0,48
120	5,44	0,12	5,90	0,01	5,83	0,30

Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos e dos grupos-controles (n=6) e PhN (1mg/mL e 3mg/mL, n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão na média (EPM), unidade em mmHg. mL⁻¹.g⁻¹.min⁻¹, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min); (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA— Holm Sidak).

Na Figura 57 e Tabela 9, visualizou-se o fato de que o fluxo urinário (FU) foi alterado pela peçonha PhN. O FU foi reduzido aos 60min na concentração de 1,0mg/mL em relação ao controle externo e ao controle interno, bem como em relação à concentração de 3,0mg/mL nos tempos de 60 e 90min. Enquanto isso, houve um aumento significativo na concentração 1,0mg/ml nos tempos de 90 e 120min; na concentração de 3,0mg/mL, o aumento foi no tempo de 120min. em relação aos controles interno e externos.

Figura 57 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) no fluxo urinário (FU).



Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3mg/mL— n=6) foram expressos em média e erro-padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos de tempo (30, 60, 90 e 120min); (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo externo em relação ao tempo avaliado (ANOVA—Holm Sidak).

Tabela 9 – Valores do fluxo urinário (FU) dos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas concentrações de 1,0mg/mL e 3,0mg/mL.

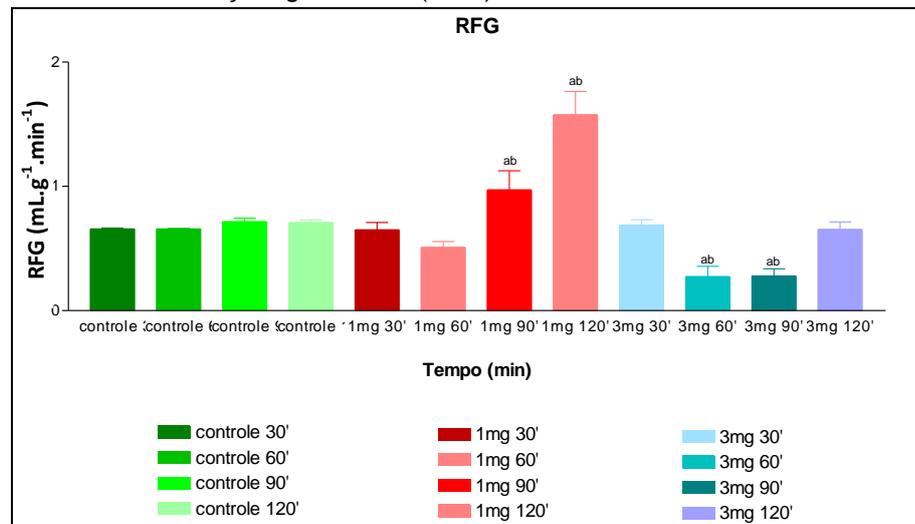
Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo-controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,15	0,01	0,14	0,00	0,14	0,00
60	0,17	0,01	0,13	0,01	0,09	0,04
90	0,18	0,01	0,30 ^{ab}	0,05	0,11	0,03
120	0,17	0,00	0,48 ^{ab}	0,02	0,33 ^{ab}	0,03

Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n=6) e PhN (1mg/mL e 3mg/mL, n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min);(a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA—Holm Sidak).

O ritmo de filtração glomerular (RFG) também foi alterado pela peçonha PhN. Verificou-se que o RFG cresceu em 90min e 120min na concentração de 1,0mg/mL em relação ao controle externo e ao controle interno, bem como, em relação à concentração de 3,0mg/mL nos tempos de 60 e 90min, diminui o ritmo de filtração glomerular em relação aos controles interno e externo, como mostram a figura 58 e a tabela 10.

Figura 58 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) no ritmo de filtração glomerular (RFG).



Fonte: Elaborada pela autora (2011).

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/mL – n = 6) foram expressos em média e erro-padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min); (a) representa p<0,05 em relação ao grupo-controle interno (b) significa p<0,05 em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA–Holm SidaK).

Tabela 10 – Valores de ritmo de filtração glomerular (RFG) dos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas concentrações de 1,0mg/mL e 3,0mg/mL.

Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo-controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,66	0,01	0,65	0,06	0,69	0,04
60	0,66	0,01	0,51	0,05	0,27ab	0,08
90	0,72	0,03	0,97ab	0,15	0,28ab	0,06
120	0,71	0,02	1,58ab	0,19	0,65	0,06

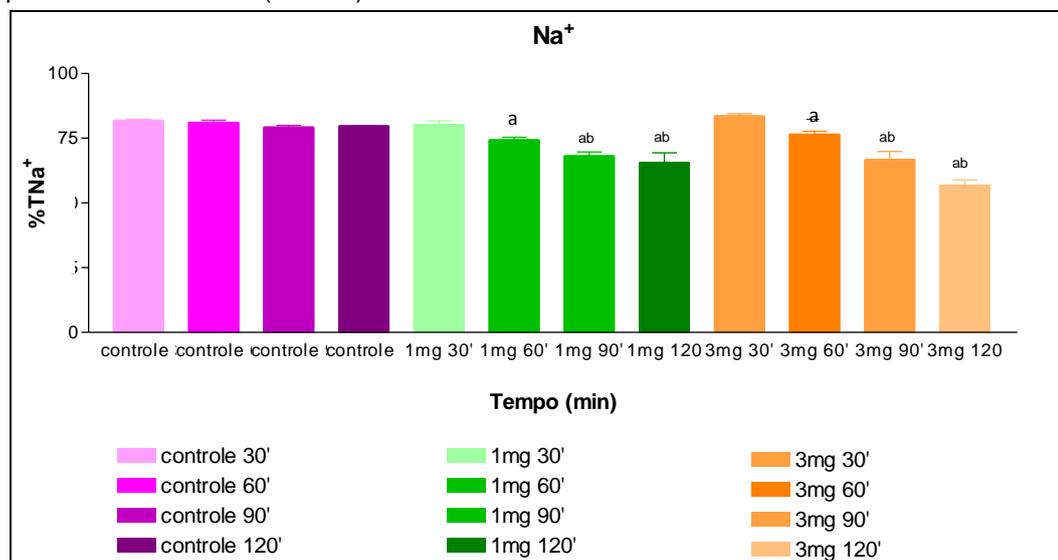
Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg e 3,0mg – n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min); (a) representa $p<0,05$ em relação ao grupo-controle interno e (b) significa $p<0,05$ em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

O transporte dos eletrólitos Na^+ , K^+ e Cl^- foi alterado, independentemente da concentração da peçonha no rim perfundido.

Para o percentual de transporte de Na^+ (%T Na^+), as concentrações de 1,0mg/mL e 3,0mg/mL reduziram significativamente esse parâmetro nos tempos (60, 90 e 120min), embora a 60min essa alteração seja observada no controle interno, os tempos de 90 e 120min foram reduzidos o transporte de sódio, tanto com relação ao controle interno e o grupo de controle externo (Figura 59 e Tabela 10).

Figura 59 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) no percentual de sódio (%T Na^+).



Fonte: Elaborada pela autora (2011).

Os resultados dos experimentos em relação ao sódio dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/mL - n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min.) (a) representa $p<0,05$ em relação ao controle interno e (b) significa $p<0,05$ em relação ao grupo do controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

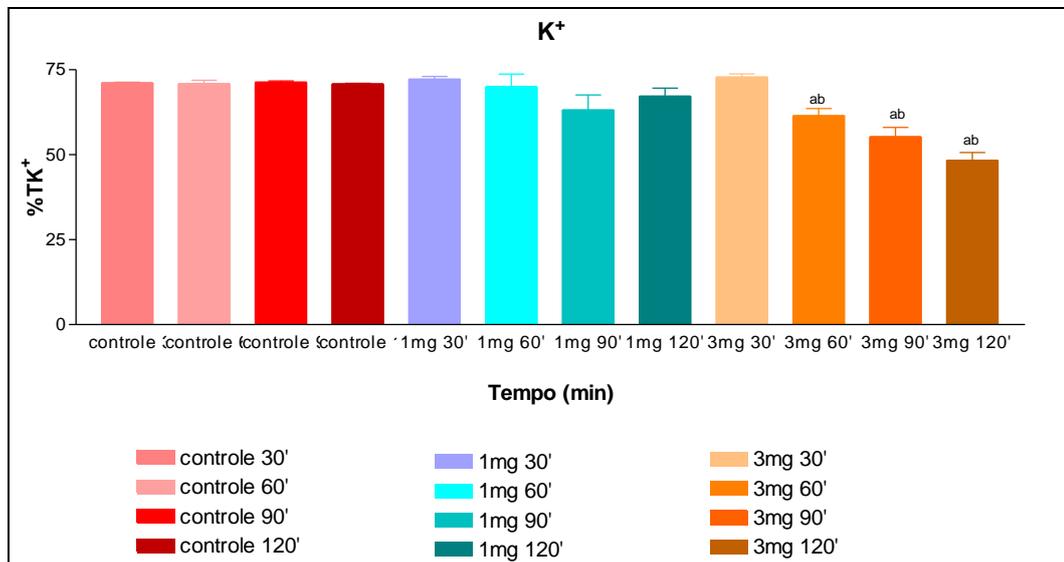
Tabela 11 – Valores de percentual de transporte de sódio (%TNa⁺) nos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas concentrações de 1,0mg/mL e 3,0mg/mL.

Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo-controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	81,94	0,35	80,27	1,45	83,66	0,78
60	81,11	0,84	74,39 a	0,97	76,52 a	1,17
90	79,26	0,67	68,24 ab	1,49	66,81 ab	3,05
120	79,76	0,10	65,66 ab	3,67	56,88 ab	1,97

Fonte: Autora (2011).

Os resultados dos experimentos em relação ao sódio dos grupos-controle (n=6) e (1,0mg/mL e 3,0mg/mL – n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min.) (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Figura 60 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) no percentual de transporte de potássio (%TK⁺).



Fonte: Elaborada pela autora (2011).

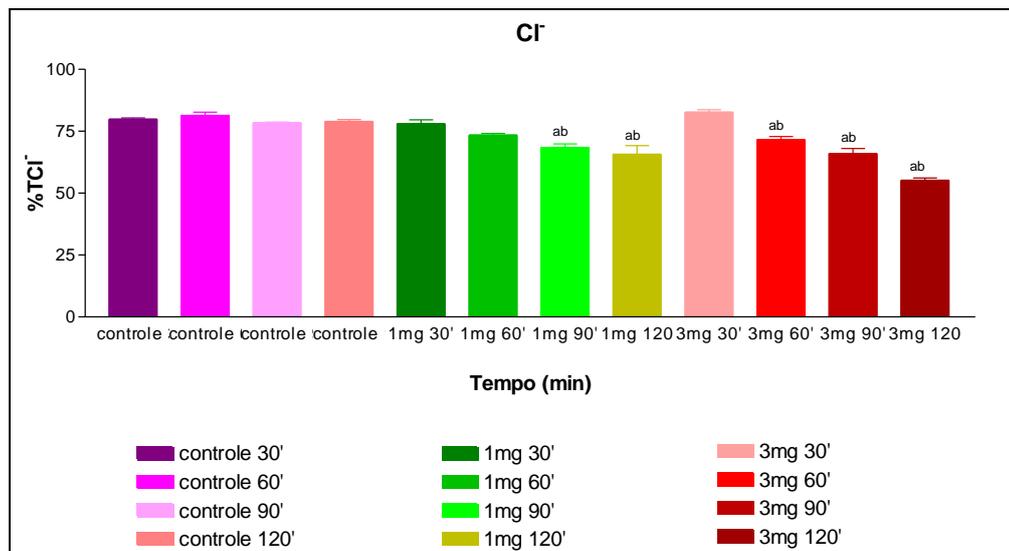
Os resultados dos experimentos em relação potássio dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/mL – n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min); (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Tabela 12 – Valores de percentual de transporte de potássio (%TK⁺) nos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas concentrações de 1,0mg/mL e 3,0mg/mL.

Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo-controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	71,18	0,17	72,20	0,85	72,83	0,93
60	70,88	1,06	70,06	3,66	61,48 ab	2,13
90	71,33	0,38	63,13	4,46	55,26 ab	2,75
120	70,84	0,16	67,20	2,39	48,32 ab	2,36

Os resultados dos experimentos relação ao potássio dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/mL – n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão da média (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min.) (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle interno e (b) significa $p < 0,0$ em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Figura 61 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) no percentual de transporte de cloreto (%TCI⁻).



Fonte: Elaborada pela autora (2011).

Os resultados dos experimentos em relação ao cloro dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/mL – n=6) foram expressos em média e erro-padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min.); (a) representa $p < 0,05$ em relação ao controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

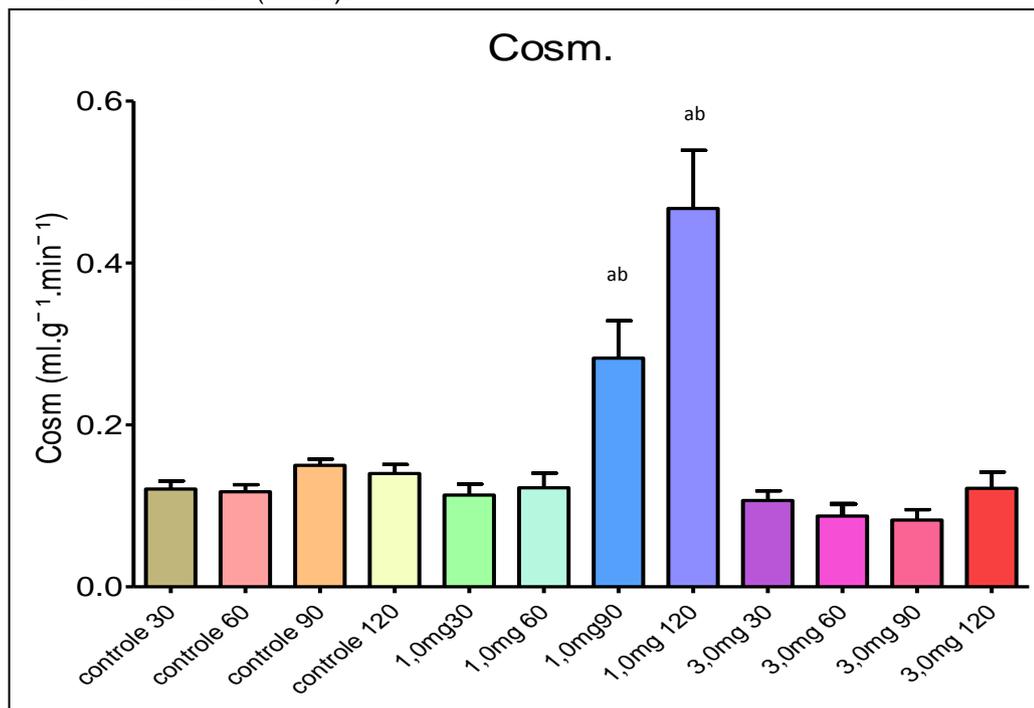
Tabela 13 – Valores de percentual de transporte de cloreto (%TCl⁻) nos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas concentrações de 1,0mg/mL e 3,0mg/mL.

Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo-controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	79,85	0,50	78,05	1,61	82,69	1,03
60	81,38	1,31	73,43	0,73	71,66ab	1,18
90	78,45	0,28	68,42ab	1,44	66,02ab	2,03
120	78,94	0,79	65,68ab	3,52	55,21ab	0,94

Os resultados dos experimentos relação ao cloro dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/ml – n=60) foram expressos em média ± erro-padrão da (EPM), unidade em %, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min.); (a) representa p<0,05 em relação ao grupo-controle interno e (b) significa p<0,05 em relação ao grupo-controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

Para verificar a capacidade de depuração do rim isolado em nível de moléculas osmoticamente ativas, realizou-se o cálculo do clearance osmótico (Cosm). Na concentração de um 1,0mg ocorreram alterações significativas nos tempos de 90 e 120min, em relação aos controles externo e interno. Na concentração de 3,0mg não ocorreu alterações significativas (Figura 62 e Tabela 14).

Figura 62 – Efeitos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) no clearance osmótico (Cosm).



Fonte: Autor, 2011.

Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg e 3,0mg – n=6) foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min); (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA—Holm Sidak) média e erro-padrão da média (EPM), unidade em $\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min).

Tabela 14 – Valores de clearance osmótico (Cosm) nos experimentos realizados com a peçonha da serpente *Philodryas nattereri* (PhN) nas concentrações de 1,0mg e 3,0mg.

Tempo (Min)	Grupo Estudados					
	Grupo-controle		PhN(1mg)		PhN(3mg)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
30	0,12	0,009	0,113	0,0135	0,106	0,011
60	0,117	0,008	0,122	0,017	0,087	0,014
90	0,15	0,007	0,282ab	0,04	0,082	0,012
120	0,14	0,011	0,467ab	0,07	0,121	0,02

Fonte: Autora (2011).

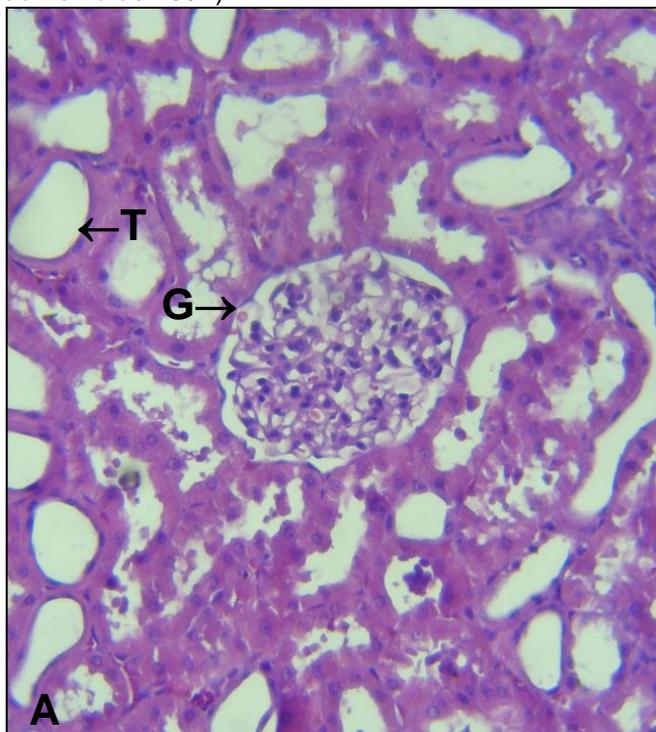
Os resultados dos experimentos dos grupos-controle (n=6) e PhN (1,0mg/mL e 3,0mg/mL – n=6) foram expressos em média \pm erro-padrão da média (EPM), unidade em $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, compilados e distribuídos em quatro períodos (30, 60, 90 e 120min; (a) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo-controle interno e (b) significa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle externo no mesmo tempo avaliado (ANOVA – Holm Sidak).

5.5 Histologia dos Rins Perfundidos

As lâminas analisadas demonstraram que os rins esquerdos utilizados como controle possuíam estruturas normais (glomérulos, túbulos, vasos e interstício normais), assim como os rins do grupo-controle perfundidos somente com solução de Krebs (Figuras 63 a 65).

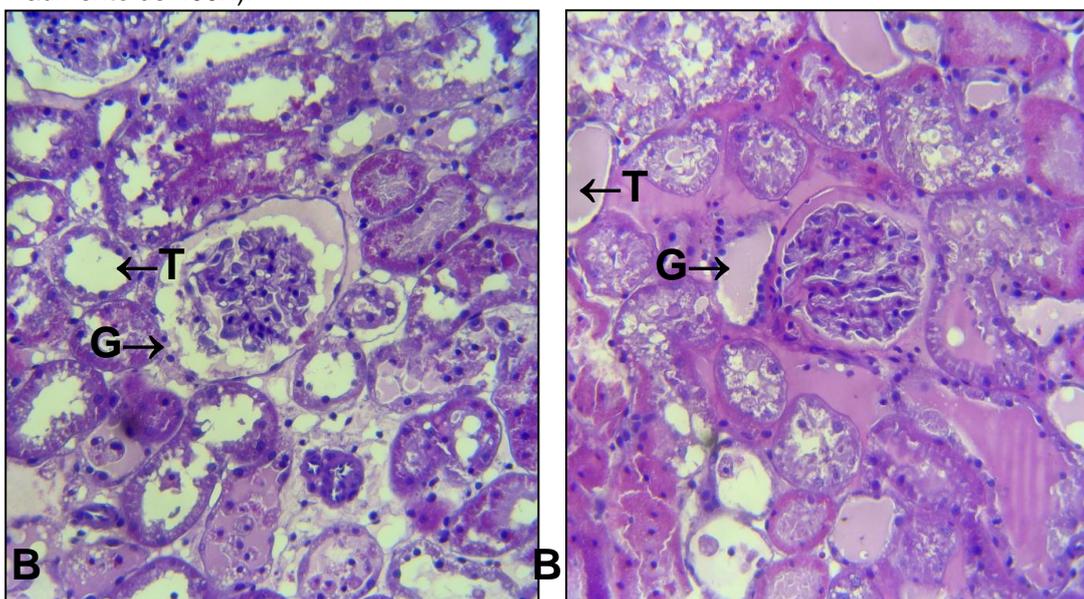
Nos rins perfundidos com a peçonha na concentração de 1mg/mL, observou-se dilatação tubular, principalmente no túbulo contorsido distal, alça de Henle, acúmulo de material proteináceo e sangue dentro dos túbulos; vasos e intertícios normais, e dilatação tubular.

Figura 63 – (A) Fotomicrografia do rim esquerdo (controle), demonstrando túbulos (T) e glomérulo (G) normais (n = 6, coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



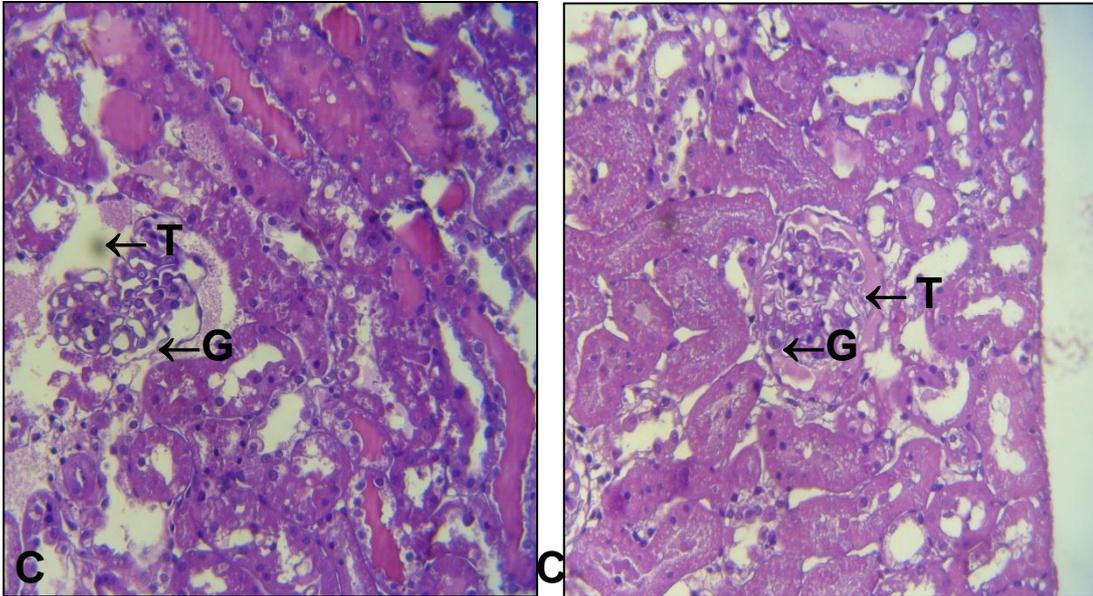
Fonte: Autora (2011).

Figura 64 – (B) Fotomicrografia na concentração de 1µg/mL da peçonha – congestão, dilatação dos vasos, interstícios normais, glomérulos e túbulos com material proteináceo, nos túbulos em maior quantidade e de modo difuso (n = 6, coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



Fonte: Autora, 2011.

Figura 65 – (C) Fotomicrografia na concentração de 3 μ g da peçonha. Evidente degeneração dos túbulos. Material proteináceo dentro dos túbulos e nos espaços de Bowman. Túbulos e glomérulos com alterações, dilatação dos vasos e interstícios (n = 6, coloração de hematoxilina-eosina – aumento de 400X).



Fonte: Autora (2011).

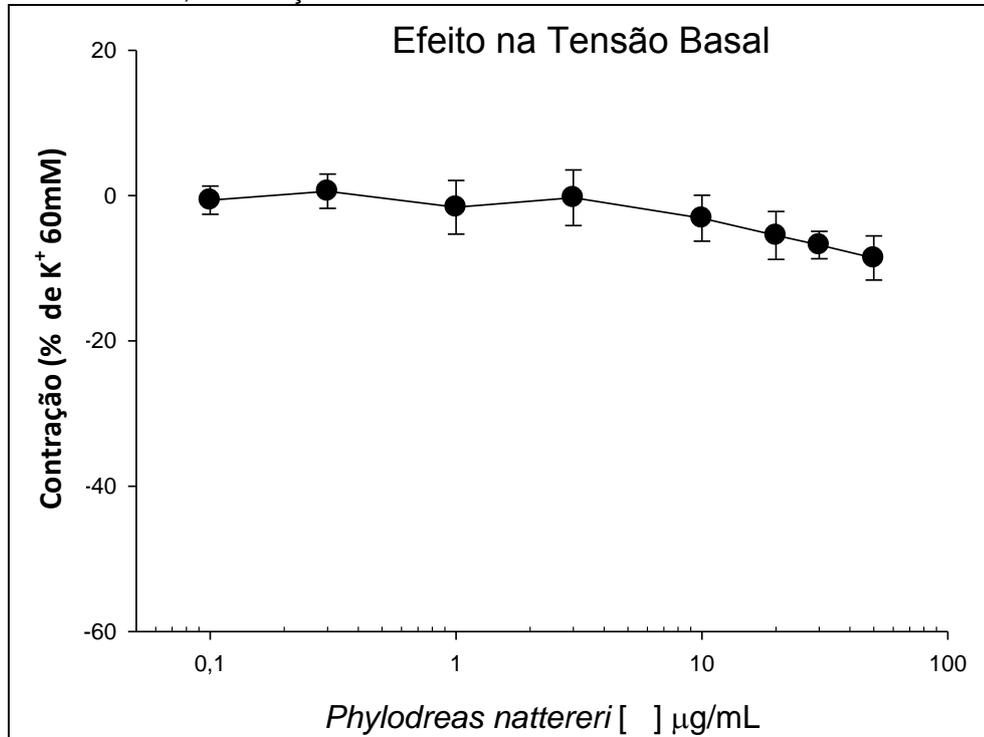
Como pode ser visualizado nos rins perfundidos com a peçonha na concentração de 3 μ g/mL observou-se evidente degeneração dos túbulos, presença de material proteináceo dentro dos túbulos e nos espaços de Bowman; glomérulos com alterações discretas e túbulos com alteração moderadas; não foi observado alteração nos vasos.

5.5.1 Anel de Aorta

5.5.1.1 Efeito da Peçonha de *Philodryas nattereri* na Tensão Basal de Aorta de Rato

Adicionada de maneira cumulativa em concentrações crescentes (0,1 – 200 μ g/mL), a peçonha de *Philodryas nattereri* não alterou a tensão basal em preparações de aorta isolada de rato (Figura 66).

Figura 66 – Efeito da peçonha de *Philodryas nattereri* na tensão basal de aorta isolada de rato, em solução de K^+ 60mM.



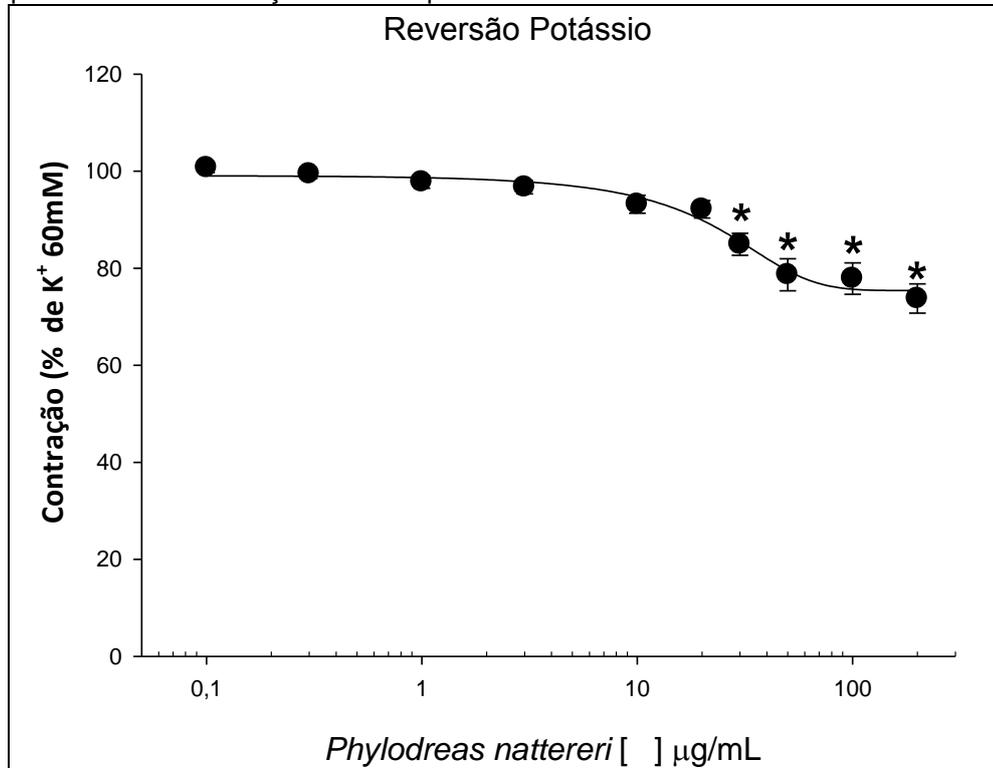
Fonte: Autora, 2011.

Os valores são expressos como Média \pm EPM. O efeito foi calculado em relação à contração controle induzida por K^+ 60mM. A peçonha de *Philodryas nattereri* não alterou significativamente a tensão basal.

5.5.1.2 Efeito da Peçonha de *Philodryas nattereri* na Contração Induzida por Potássio

Como pode ser visualizado na Figura 67 a peçonha de *Philodryas nattereri* (0,1 – 200 $\mu\text{g/mL}$) apresenta dependência com a concentração sendo este efeito mais pronunciado a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 67 – Efeito da peçonha de *Philodryas nattereri* na contração induzida por K^+ 60 mM. Concentrações crescentes de peçonha *Philodryas nattereri* inibiram parcialmente a contração induzida por K^+ 60 mM.



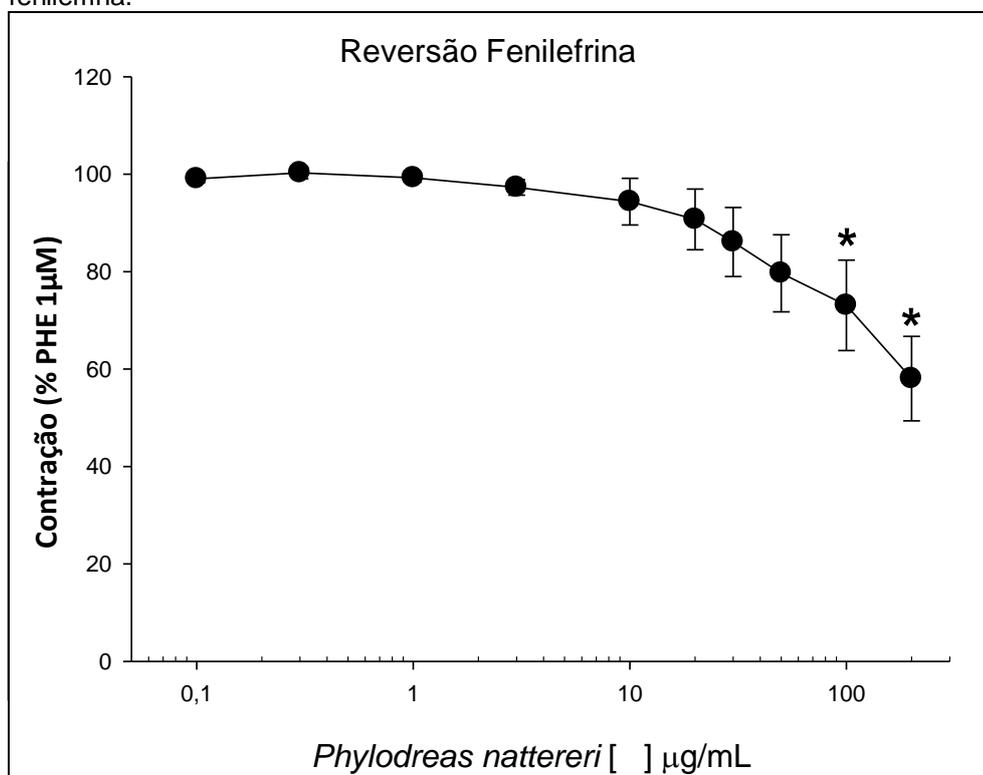
Fonte: Autora, 2011.

Os valores são expressos como Média \pm EPM. O efeito foi calculado em relação à contração máxima induzida por K^+ 60 mM. * $p < 0,05$, ANOVA One-Way, seguido do teste de Holm-Sidak.

5.5.1.3 Efeito da Peçonha de *Philodryas nattereri* na Contração Induzida por Fenilefrina

A peçonha de *Philodryas nattereri* (0,1 – 200 μ g/mL) inibiu, de maneira dependente de concentração ($p < 0,05$, Holm-Sidak), a contração induzida pelo agonista adrenérgico fenilefrina (1 μ M) para $58,04 \pm 8,67$ % em relação à contração máxima. Efeito que começou a ser significativo na concentração de 100 μ g/mL (Figura 68).

Figura 68 – Efeito da peçonha de *Philodryas nattereri* na contração induzida por fenilefrina.



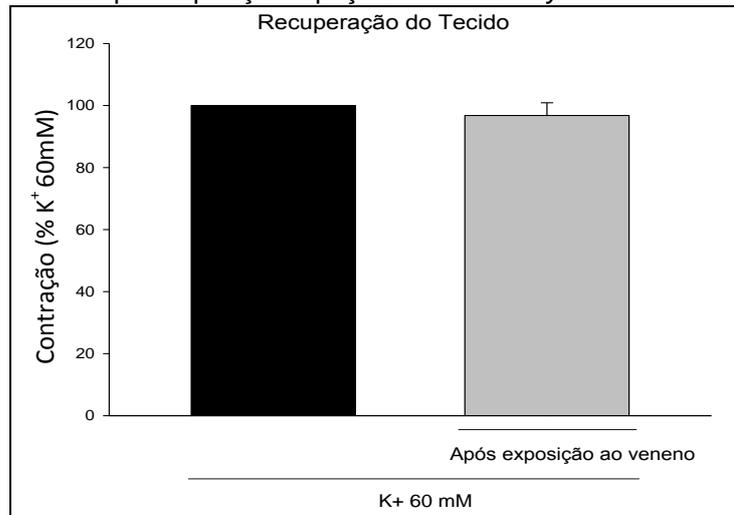
Fonte: Autora, 2011.

Concentrações crescentes da peçonha de *Philodryas nattereri* inibiram parcialmente a contração induzida por fenilefrina 1µM. Os valores são expressos como Média ± EPM. O efeito foi calculado em relação à contração máxima induzida por fenilefrina 1µM. * $p < 0,05$, ANOVA One-Way, seguido do teste de Holm-Sidak.

5.5.2 Recuperação do Tecido após Exposição à Peçonha de *Philodryas nattereri*

A exposição à peçonha de *Philodryas nattereri* não alterou a resposta funcional ao estímulo eletromecânico, uma vez que a recuperação da preparação com K^+ (60 mM) obteve resposta semelhante quando comparada à resposta-controle inicial como pode ser visualizado a seguir na Figura 69.

Figura 69 – Recuperação de anéis de aorta de rato com K^+ 60mM após exposição à peçonha de *Philodryas nattereri*.



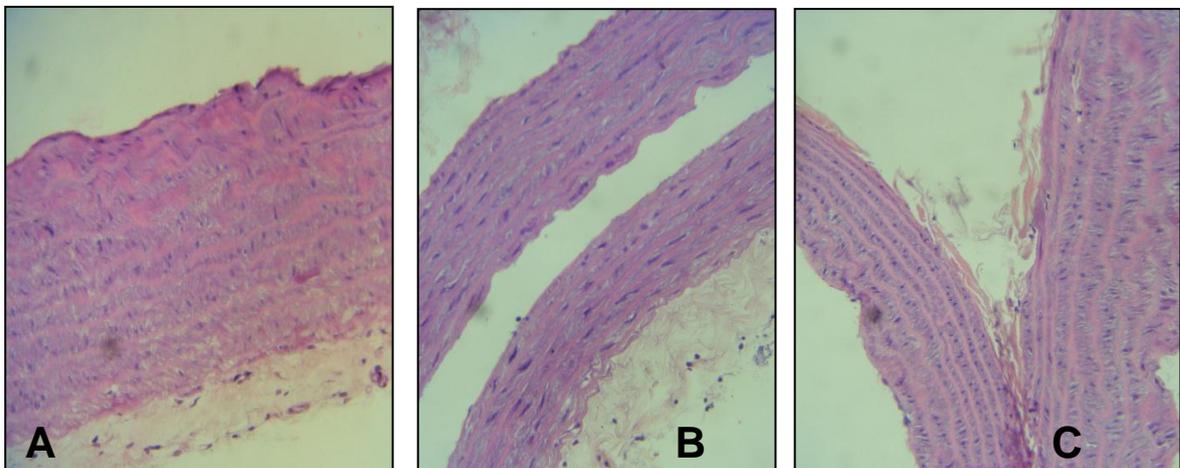
Fonte: Autora, 2011.

Os valores são expressos como Média \pm EPM. O efeito foi calculado em relação à contração-controle induzida por K^+ (60 mM) no início do experimento.

5.6 Histologia do Anel de Aorta

Nos protocolos estudados não observou-se alterações histológicas no anel de aorta, seja nos grupos-controle ou nos grupos expostos à peçonha de *Philodryas nattereri*; independentemente da concentração estudada.

Figura 70 – Fotomicrografia dos anéis de aorta representativos de cada grupo estudado. (A) representa o efeito da peçonha na tensão basal, não ocorreu alteração (B) contração com K^+ revertida pela peçonha e (C) controle (n=4 – coloração de hematoxilina-eosina-aumento de 400X).



Fonte: Autora (2011).

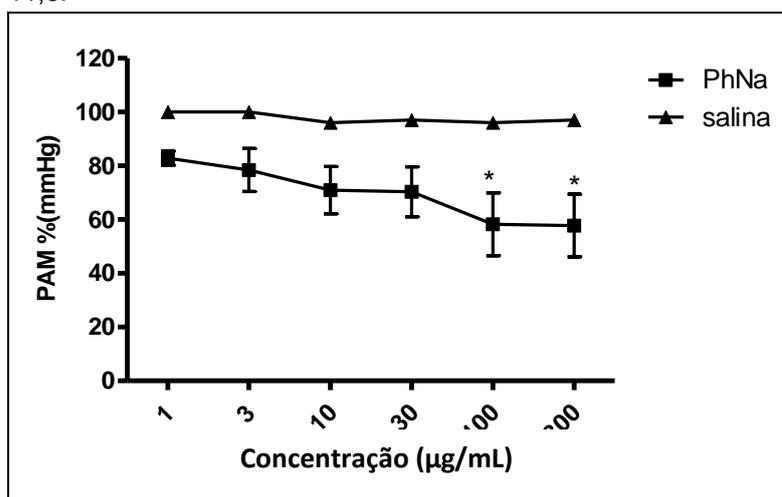
5.7 Avaliação da Toxicidade Cardiovascular

5.7.1 Efeito da Peçonha da *Philodryas nattereri* na Pressão Arterial Média, Frequência Cardíaca e Respiratória

5.7.1.1 Pressão Arterial Média

A pressão arterial média (PAM) em ratos anestesiados, com peçonha da *Philodryas nattereri* foi avaliada nas doses 0,3, 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$, injetadas lentamente pela veia jugular com intervalo mínimo entre as injeções de dez minutos. O registro da pressão arterial média (PAM) nas doses (100,0 $\mu\text{g/mL}$ e 300,0 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou uma redução significativa, comparado ao controle (100mmHg) e (PhN100 $\mu\text{g/mL}$ = 60mmHg), (PAM PhN300 $\mu\text{g/mL}$ = 60mmHg).

Figura 71 – Efeitos da peçonha da *Philodryas nattereri* na pressão arterial média (PAM) em ratos anestesiados (n=6). Registros da queda da PAM nas doses de 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ com uma redução significativa nas doses de 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ comparado ao controle (controle = \pm 100mmHg) PhN1 $\mu\text{g/mL}$ = 80mmHg \pm 2,6 e PhN 100 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$ = 60mmHg \pm 11,6.



Fonte:

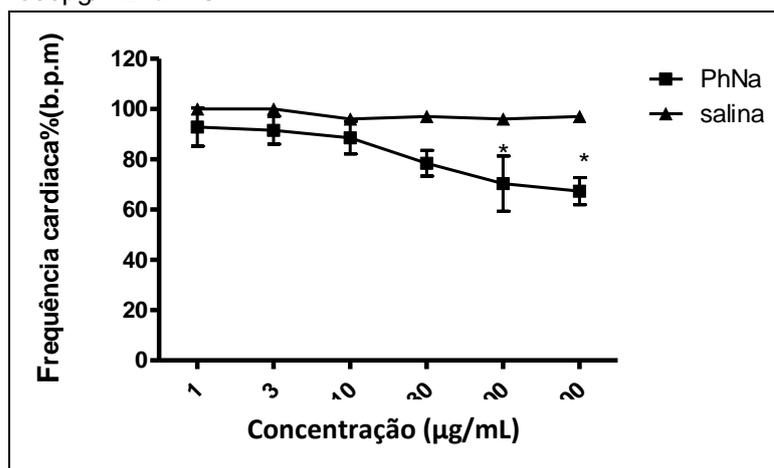
Autor, 2011.

A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (teste de Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm EPM, em comparação com o respectivo grupo controle em cada dose.

5.7.1.2 Frequência cardíaca(FC) e Frequência respiratória (FR)

As frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) após a aplicação da peçonha da *Philodryas nattereri* nas doses de 1,0µg/mL; 3,0µg/mL; 10,0µg/mL; 30µg/mL; 100,0µg/mL e 300,0µg/mL, comparadas ao controle, demonstraram uma redução significativa (controle = \pm 100 batimentos/min, n=6) na concentração de 100µg/mL e 300µg/mL, para a frequência cardíaca de (\pm 76b.p.m). A frequência respiratória (FR) nas doses de 100µg/mL e 300µg/mL reduziu após a infusão da peçonha PhN em relação ao controle.

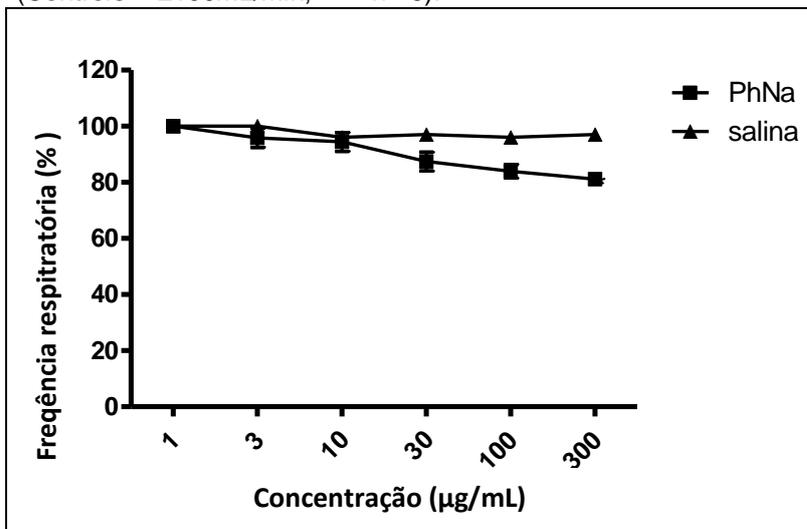
Figura 72 – Efeitos da peçonha da PhN na frequência cardíaca (FC), nas doses : 1,0µg/mL, 3, 10, 30, 100 e 300µg/mL a FC.



Fonte: Autora, 2011.

A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm EPM; em comparação com o grupo-controle em cada dose.

Figura 73 – Redução da Frequência respiratória (FR), nas doses da 100µg/mL e 300µg/mL, de PhN em relação ao controle (Controle = ± 100 mL/min, n= 6).



Fonte: Autora, 2011.

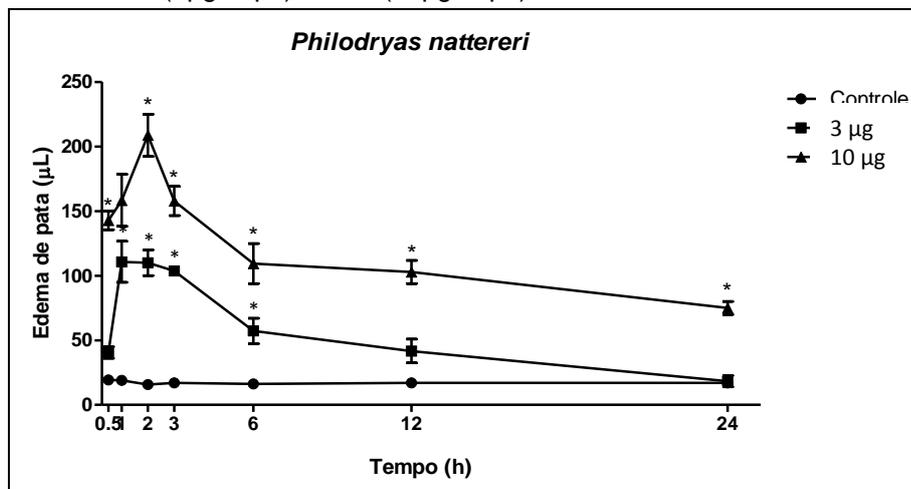
Os efeitos da peçonha da *Philodryas nattereri* sobre a frequência respiratória nas doses de 100µg/mL e 300µg/mL demonstraram redução significativa (controle = ± 100 mL/min, PhN 100µg/mL = 84 mL/min $\pm 2,4$ e PhN 300µg/mL = 81mL/min $\pm 1,0$ min).

A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA teste de (Bonferroni) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$. Os dados são expressos em média \pm EPM, comparando com o respectivo grupo-controle em cada dose.

5.8 Edema de Pata

A peçonha da *Philodryas nattereri* mostrou relevante atividade edematogênica. A análise da evolução do edema demonstrou uma ação rápida, induzindo um edema bem pronunciado nas primeiras duas horas após a inoculação, atingindo seu efeito máximo às duas horas, na concentração de 10µg ($280,70 \pm 16,38$)µL e regredindo gradativamente até 24 horas, como mostra a Figura 74. Na concentração de 3µg, o edema apresentou o comportamento semelhante ao da concentração de 10µg nas 24 horas, em relação ao controle.

Figura 74 – Cinética do edema de pata induzido por *Philodryas nattereri* em (3µg/50µL) e em (10µg/50µL).



Fonte: Autora (2011).

Os dados são expressos com a diferença do volume da pata experimental em relação à pata-controle. Cada ponto representa em média \pm EPM de seis animais (*) significativamente diferente do grupo-controle ($p < 0,05$), análise estatística por ANOVA e teste de Tukey.

5.9 Modulação Farmacológica no Edema de Pata

Os estudos de modulação farmacológica consistiram da avaliação dos efeitos do pré-tratamento dos animais com drogas usadas na clínica e bloqueadores de vias relacionadas a dor e edema. Foram analisados a potenciação ou redução das atividade edematogênicas, utilizando as doses de 3µg e 10µg da peçonha, com atividade máxima de duas horas respectivamente.

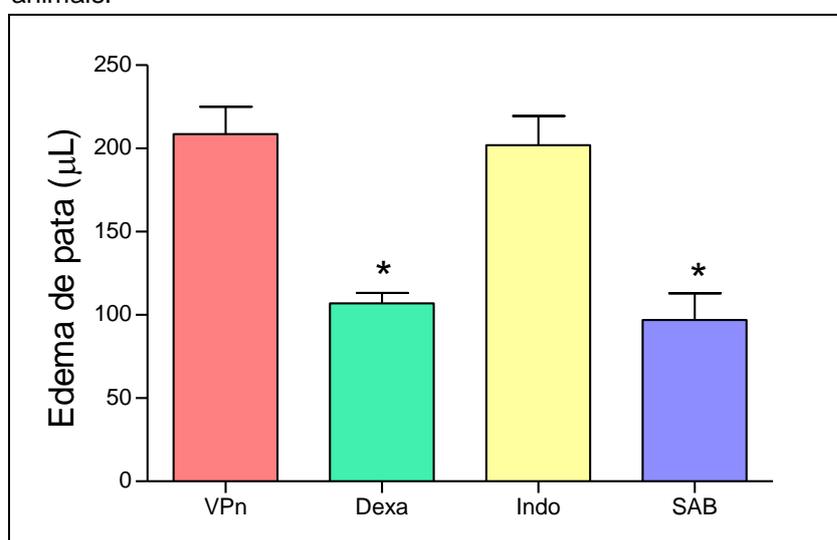
O edema induzido pela peçonha da *Philodryas nattereri* ($280,7 \pm 16,38$) foi reduzido em animais pré-tratados com o anti-inflamatório esteroidal dexametasona na concentração de 1mg/kg ($106,9 \pm 6,22\%$) e soro anti-bothrops ($97 \pm 15,94\%$) em relação ao grupo controle na ausência de qualquer tratamento ($150,67 \pm 0,49$). Entretanto, o anti-inflamatório indometacina 2mg/kg não apresentou nenhuma modificação no edema ($202,0 \pm 17,51$), como pode ser visto na Figura 75 e Tabela 15.

Tabela 15 – Caracterização farmacológica das atividades edematogênicas da peçonha da *Philodryas nattereri*. (*) Diferença significativa do grupo tratado apenas com a peçonha ($p < 0,05$). Análise estatística pelos teste de Mann Withney, utilizando o software *Statsoft Statistica 6.1*.

Tratamento	Dose	Edema %	Mann-withney valor p
Peçonha	3 μ g-10 μ g	280,7 \pm 16,38	<0,05
Dexametasona	1mg/kg	106,9 \pm 6,22	<0,05
Indometacina	2mg/kg	202,0 \pm 17,51	>0,05
Soro Anti-Bothrops	1:5 vol.	97,0 \pm 15,94	<0,05

Fonte: Autora (2011).

Figura 75 – Representação gráfica da modulação farmacológica do edema induzido pela peçonha da *Philodryas nattereri*. PhN representa o grupo-controle tratado somente com a peçonha. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão da média de seis animais.

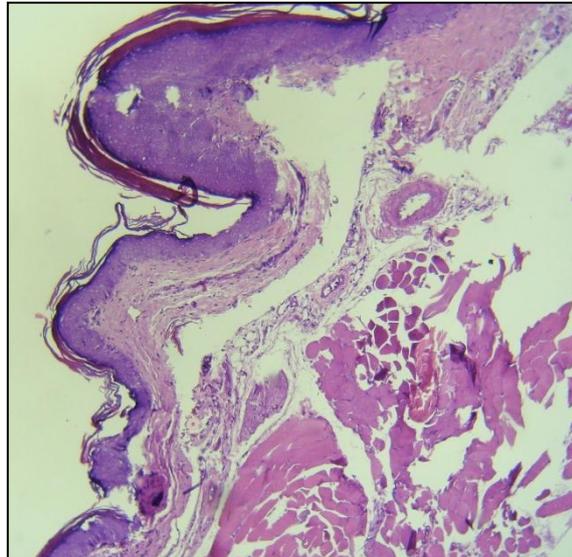


Fonte: Autora (2011).

5.10 Histologia do Edema

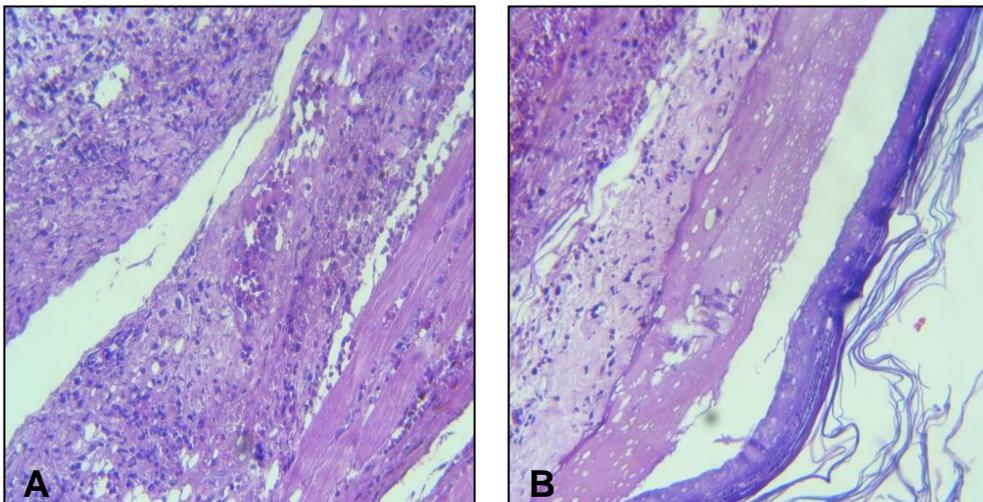
Nas Figuras 76 a 80 são apresentadas fotomicrografia do edema de pata onde pode se vê as várias fases do processo inflamatório bem como a inibição causada com a administração das drogas indometacina, dexametasona e soro antiofídico.

Figura 76 – Fotomicrografia do edema de pata com solução salina; lâminas analisadas através de um microscópio de luz (n=6 – coloração de hematoxilina-eosina-aumento de 100X).



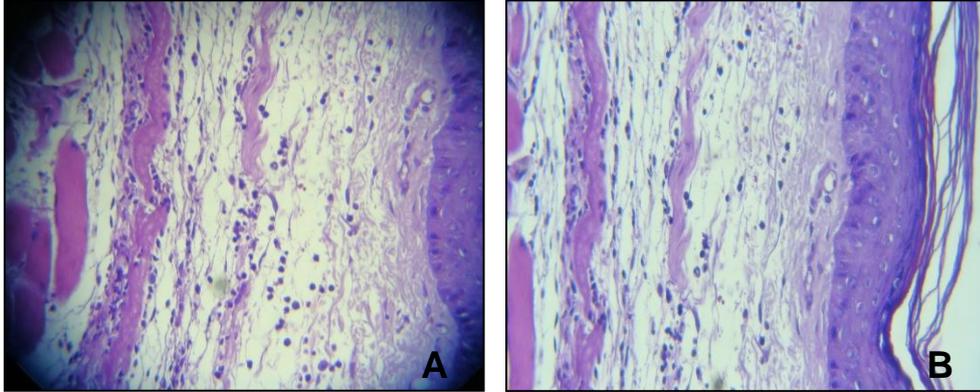
Fonte: Autora (2011).

Figura 77 – Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha *Philodryas nattereri* na concentração de 10 μ g atingindo o pico máximo em duas horas com bastante edema e infiltrado inflamatório nas lâminas A e B (n=6 – coloração de hematoxilina-eosina-aumento de 400X).



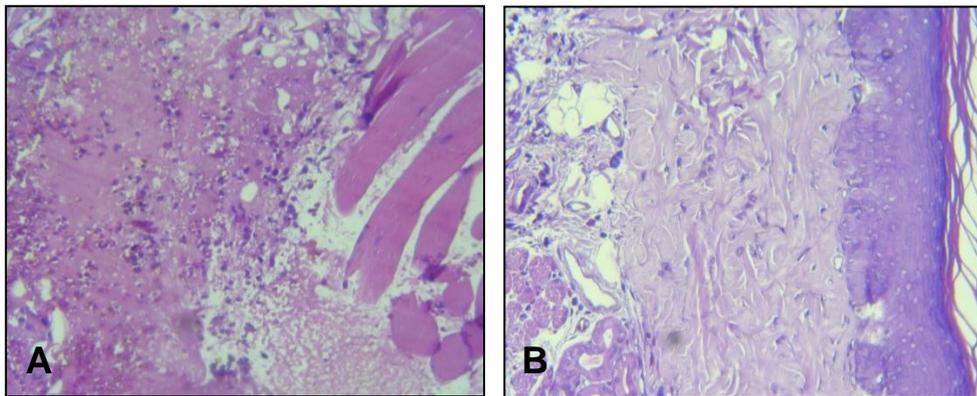
Fonte: Autora (2011).

Figura 78 – Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha *Philodryas nattereri* na concentração de 10 μ g inibido com indometacina, processo inflamatório em toda espessura, presença de granulócitos e neutrófilos nas lâminas A e B (n = 6, coloração de hematoxilina-eosina-aumento de 400X).



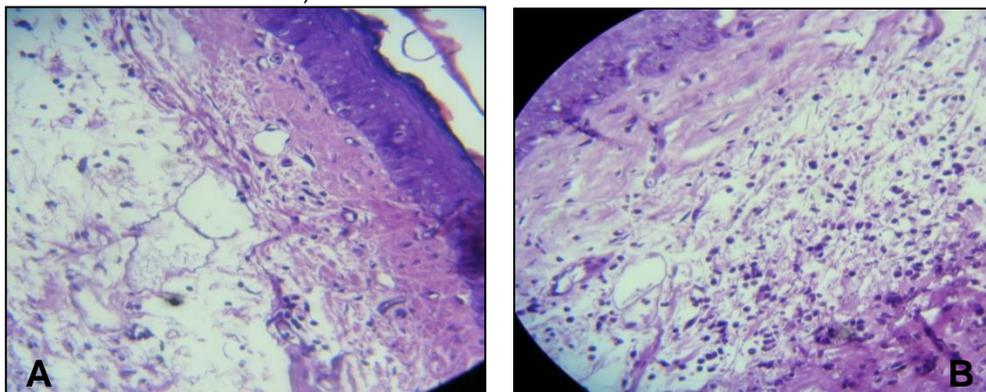
Fonte: Autor, 2011.

Figura 79 – Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha *Philodryas nattereri* na concentração de 10 μ g pré-tratado com dexametasona, leve edema envolvendo toda espessura e infiltrado inflamatório, granulócitos e neutrófilos nas lâminas A e B (n = 6, coloração de hematoxilina-eosina-aumento de 400X).



Fonte: Autor, 2011.

Figura 80 – Fotomicrografia do edema de pata causado pela peçonha *Philodryas nattereri* na concentração de 10 μ g prétratado por soro antiothrópico, edema não muito intenso, epiderme normal com discreto processo inflamatório, poucos granulócitos e neutrófilos nas lâminas A e B (n = 6, coloração de hematoxilina-eosina-aumento de 400X).



Fonte: Autora, 2011.

5.11 Atividade Miotóxica Avaliada por Histologia e Proteína-quinase (CK)

A inoculação da peçonha da *Philodryas nattereri* no músculo gastrocnêmio de camundongos com doses de 50µg avaliada nos tempos 2h, 4h, 24h, 48h demonstraram que a mesma produziu alterações, como hemorragia em focos, edema, parte da fibra muscular íntegra e balonizada em menor número, presença de exsudato inflamatório e mionecrose. Nas quatro horas permanecem a hemorragia em focos; a fibra muscular é destruída focalmente e há presença de moderado exsudato inflamatório, que permanece até as oito horas. Nas 24 e 48 horas, as fibras musculares apresentaram poucas alterações em reparo e regeneração, discreto exsudato inflamatório.

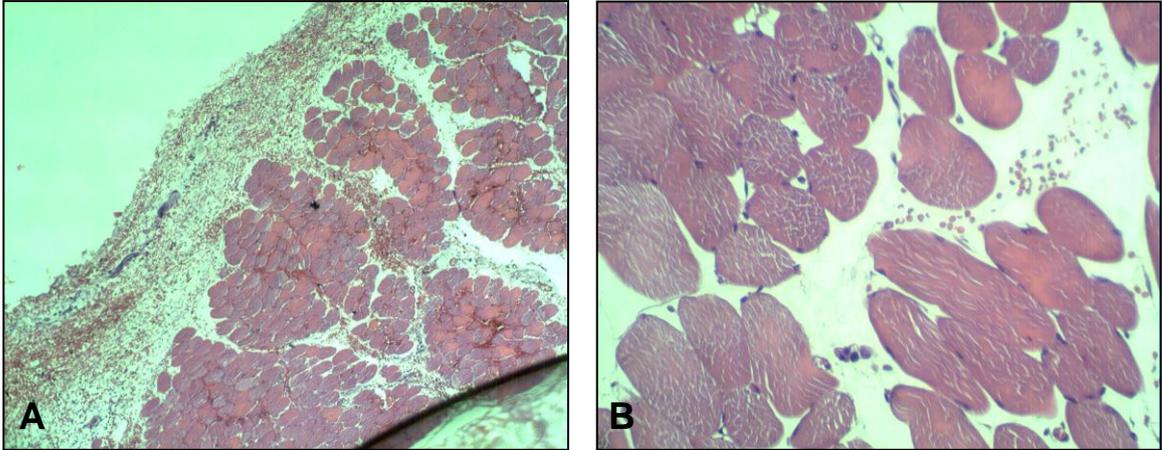
O músculo gastrocnêmio de camundongo injetado com salina (0,05mL) preserva as características normais de músculo estriado esquelético, com células cilíndricas multinucleadas, com núcleos periféricos e estriações transversais visíveis ao microscópio óptico (Figura 81 a 85).

A miotoxidade esta relacionada ao tempo, ou seja, após 30 min da injeção, pode-se observar o início de mionecrose e após duas horas, observa-se o aparecimento de um infiltrado hemorrágico que se estende até a 8ª hora (Figuras 81 e 82).

Após este período iniciam-se uma regressão e uma leve regeneração das fibras (Figuras 83 e 84) mostrando em 24 horas fibras normais circundadas por infiltrado inflamatório, hemorragia e restos de mionecrose (Figura 85).

Identificamos hemorragia em focos e parte da fibra muscular íntegra e balonizada em menos número, sem presença de exsudato inflamatório, no período de duas horas.

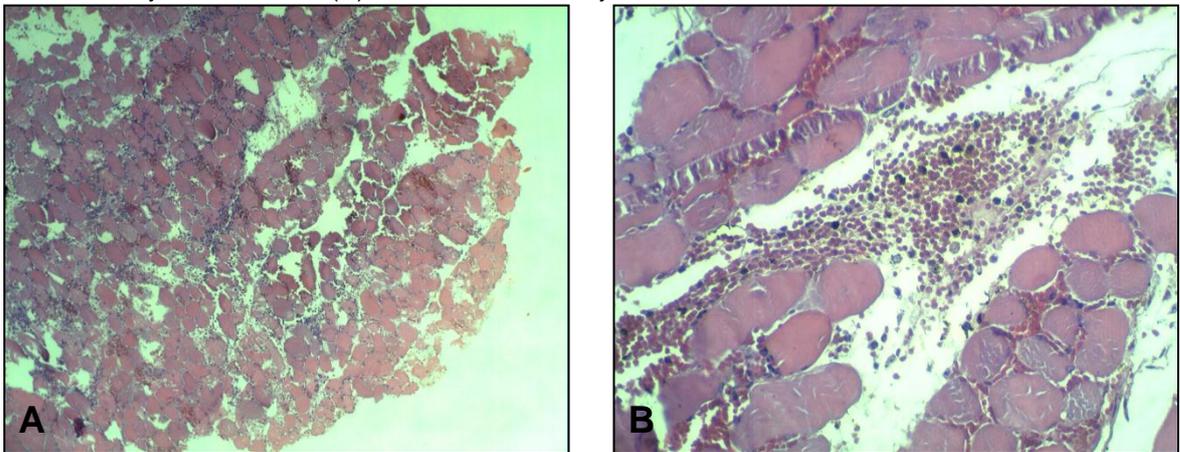
Figura 81 – Lâminas com edema induzido por PhN (50 μ g) após duas horas, visualizando no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 10x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.



Fonte: Autora (2011).

Na figura 82, identificamos hemorragia em focos e parte da fibra muscular destruída focalmente, bem como presença de moderado exsudato inflamatório, no período de quatro horas.

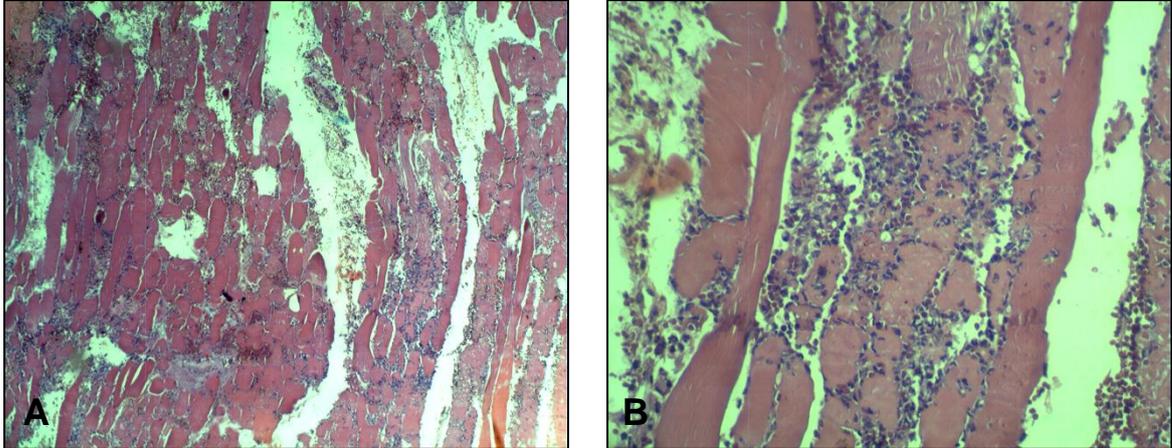
Figura 82 – Lâminas com edema de 4 horas, visualizando no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 10x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.



Fonte: Autora (2011).

Na figura 83, identificamos hemorragia em focos e parte da fibra muscular com degeneração e balonização; moderado exsudato inflamatório, no período de oito horas.

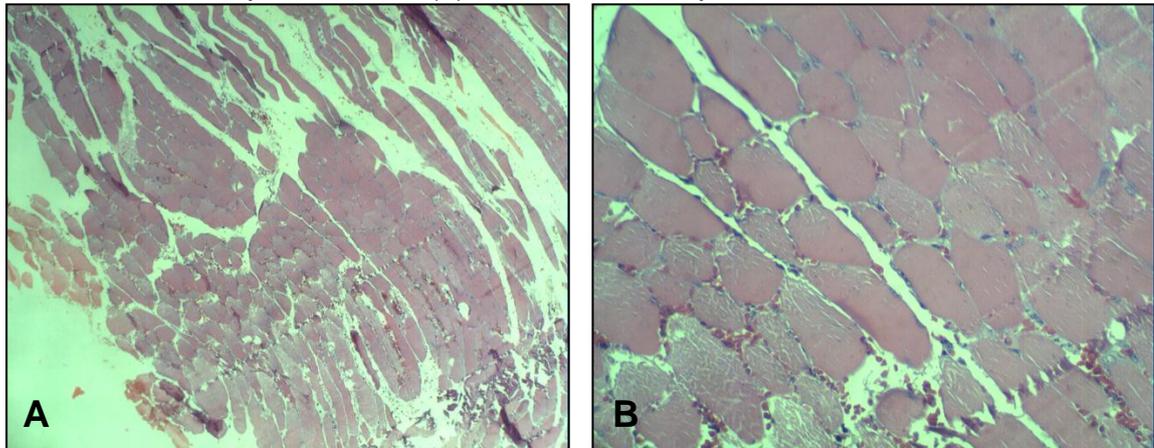
Figura 83 – Lâminas com hemorragia de oito horas, mostrando a atividade inflamatória aguda, visualizadas no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 40x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.



Fonte: Autora (2011).

Na figura 84, identifica-se fibra muscular com poucas alterações e em reparo e regeneração; discreto exsudato inflamatório, no período de 24 horas.

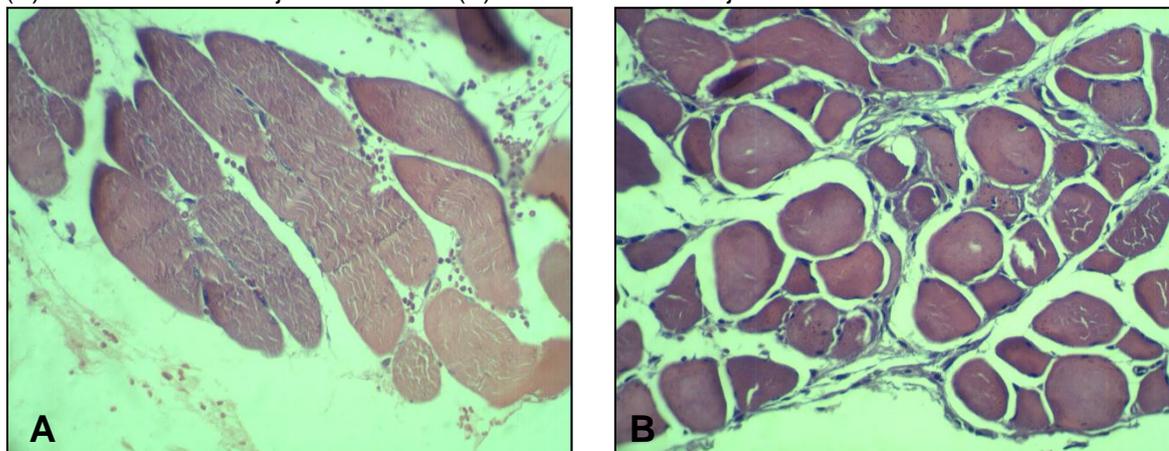
Figura 84 – Lâminas em regeneração de 24 horas, visualizadas no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 40x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.



Fonte: Autora (2011).

Na figura 85, identifica-se fibra muscular com poucas alterações e em reparo e regeneração; discreto exsudato inflamatório, no período de 48 horas.

Figura 85 – Lâminas em regeneração de 48 horas, visualizadas no microscópio óptico com (A) ocular de 10x e objetiva de 40x e (B) ocular de 10x e objetiva de 40x.



Fonte: Autora (2011).

5.11.1 Investigação da Participação de Proteína Quinase na Miotoxicidade

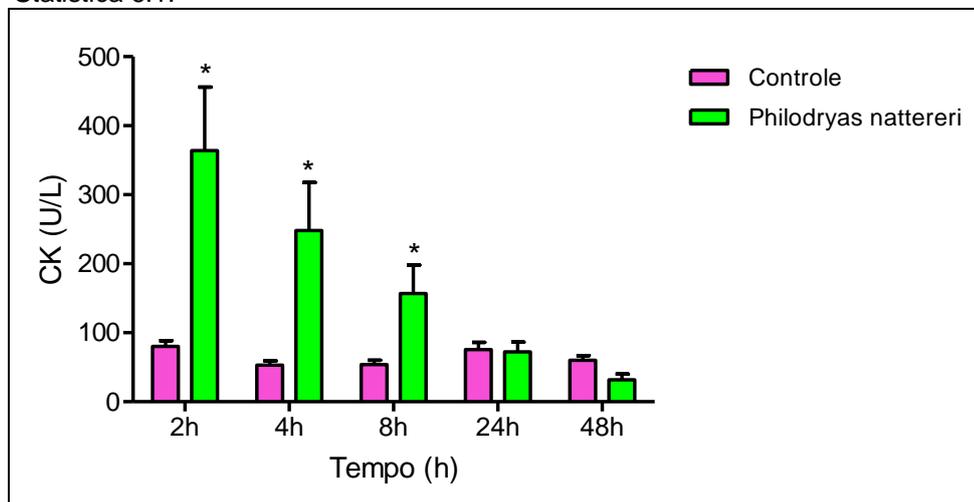
A degradação de proteínas miofibrilares foi perceptível a partir de duas horas após a inoculação da peçonha. Neste mesmo tempo, as proteínas decresceram para $364,0 \pm 92,0$ mg/mL, quando em comparação com o músculo controle. A análise evidencia metaloproteínas que a peçonha é capaz de causar degradação de proteínas musculares.

Tabela 16 – Dosagem de proteína-quinase dos músculos inoculados com $50\mu\text{g}$ da peçonha da *Philodryas nattereri*. (*) Diferença significativa em relação ao grupo-controle ($p > 0,05$). Análise pelo Teste t Student, utilizando o software *Statsoft Estatística 6.1*.

Tempo	Controle	<i>Philodryas nattereri</i>
	média EPM	média EPM
2 horas	$80,33 \pm 8,30$	$364,00 \pm 92,00^*$
4 horas	$53,25 \pm 6,30$	$248,30 \pm 69,60^*$
8 horas	$54,00 \pm 6,00$	$157,00 \pm 41,00^*$
24 horas	$75,50 \pm 10,49$	$72,33 \pm 14,15$
48 horas	$60,00 \pm 6,90$	$32,00 \pm 8,00$

Fonte: Autora (2011).

Figura 86 – Dosagem da proteína-quinase inoculada pela injeção da *Philodryas nattereri*. Cada ponto representa a média \pm erro-padrão da média de seis animais (*) significativamente diferente do controle. ($p < 0,05$). Análise estatística por ANOVA e Tukey, utilizando o software Statsoft Statistica 6.1.

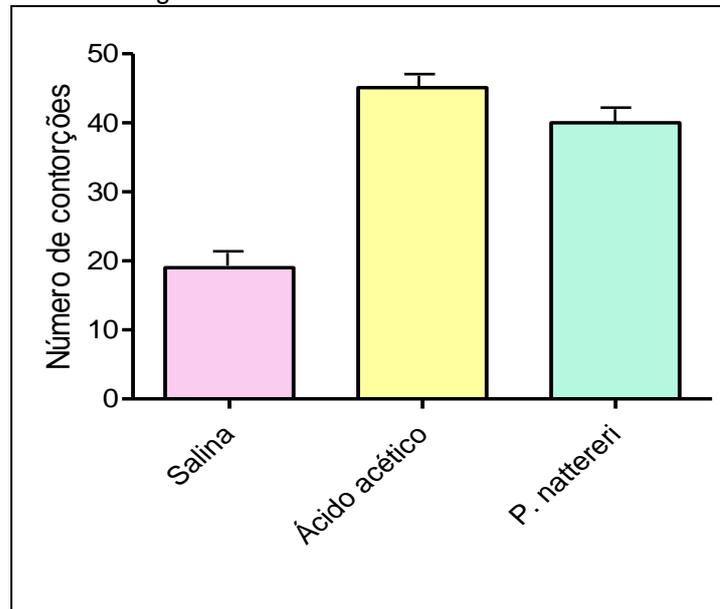


Fonte: Autora (2011).

5.12 Contorções Abdominais Causadas pela Peçonha da *Philodryas nattereri*

A atividade analgésica foi avaliada pelo teste de contorções abdominais em camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 e 30g. A peçonha da *Philodryas nattereri* na dose de 100mg/kg, diluída em salina, foi injetada por via intraperitoneal. Os dados foram observados pelas contorções abdominais, registradas durante um período de 30 minutos. A média de contorções no grupo-controle (salina) foi de $(20,0 \pm 1,2)$ Figura 88. No grupo tratado com ácido acético e peçonha, as médias e EPM foram $45,1 \pm 2,1$ e $40,0 \pm 1,2$, respectivamente.

Figura 87 – Efeito da peçonha de *Philodryas nattereri* (100mg/kg) sobre as contorções abdominais em camundongos swiss.



Fonte: Autora, 2011.

Salina foi utilizada como controle negativo e ácido acético (0,8% v/v) foi usado como controle positivo. Cada experimento representa a média \pm EPM de seis animais (*) significativamente diferente da salina $p < 0,05$, quando em comparação com os grupos tratados. Análise estatisticamente por ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls.

Determinação dos Cromossomos da
Philodryas nattereri e *Olfersii*

6 DETERMINAÇÃO DOS CROMOSSOMOS DA *PHILODRYAS NATTERERI* E *OLFERSSI*

Os indivíduos das espécies *Philodryas nattereri* e *Philodryas olfersii* apresentaram a mesma constituição cromossômica, independentemente do local de coleta. Também não foram detectadas diferenças significativas entre cariótipos de machos e fêmeas analisados, não se constatando, portanto, nenhum tipo de heteromorfismo cromossômico relacionado ao sexo. Os cariótipos são compostos de $2n=36$ cromossomos, como mostra as Figuras 88 a 91. O pareamento é discutível, pelo decréscimo sutil do tamanho dos cromossomos.

Figura 88 – Metáfase de células da fêmea de *Philodryas nattereri* com $2n = 36$ cromossomos. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos, com a constrição secundária no quinto par de macrocromossomos metacêntrico.



Fonte: ALVES, 2011.

Figura 89 – Metáfase de células sanguíneas do macho de *Philodryas nattereri* com $2n = 36$ cromossomos. Cariótipo com 16 macro-cromossomos e 20 microcromossomos, com a constrição secundária no quinto par de macrocromossomos metacêntrico.



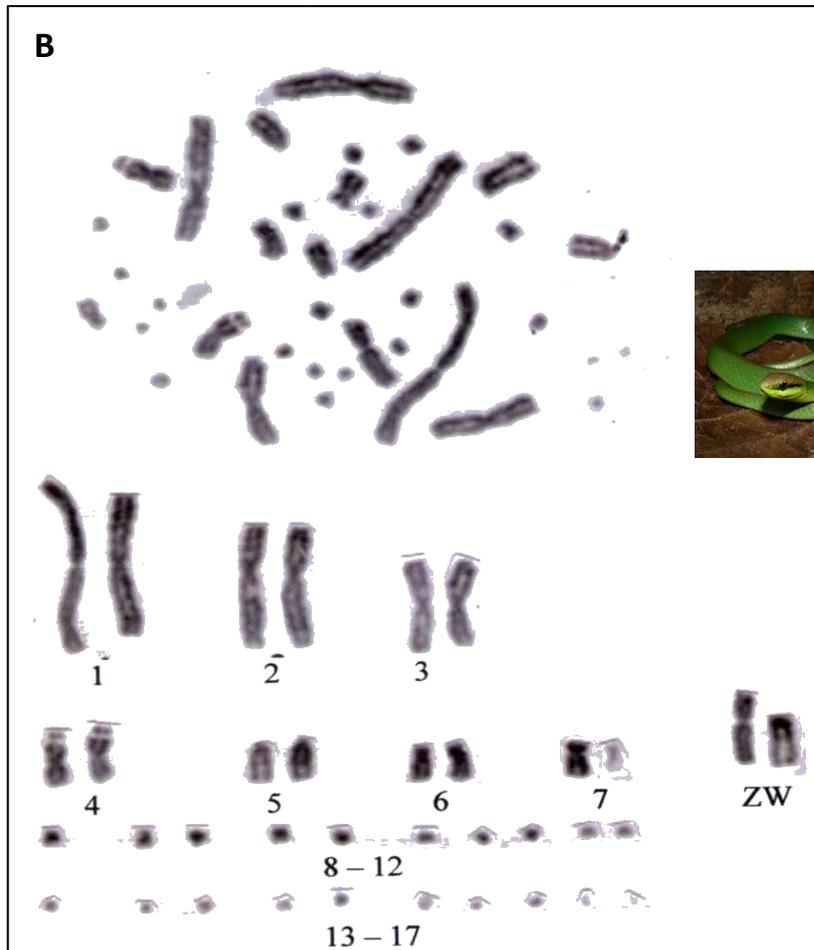
Fonte: ALVES, 2011.

Figura 90 – Metáfase mitótica de células sanguíneas do macho de *Philodryas olfersii* com $2n = 36$ com a constrição secundária no quinto par de macrocromossomos metacêntrico. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos.



Fonte: ALVES, 2011.

Figura 91 – Metáfase mitótica de células sanguíneas da fêmea de *Philodryas olfersii* com $2n = 36$ com a constrição secundária no quinto par de macrocromossomos metacêntrico. Cariótipo com 16 macrocromossomos e 20 microcromossomos.



Fonte: ALVES, 2011.

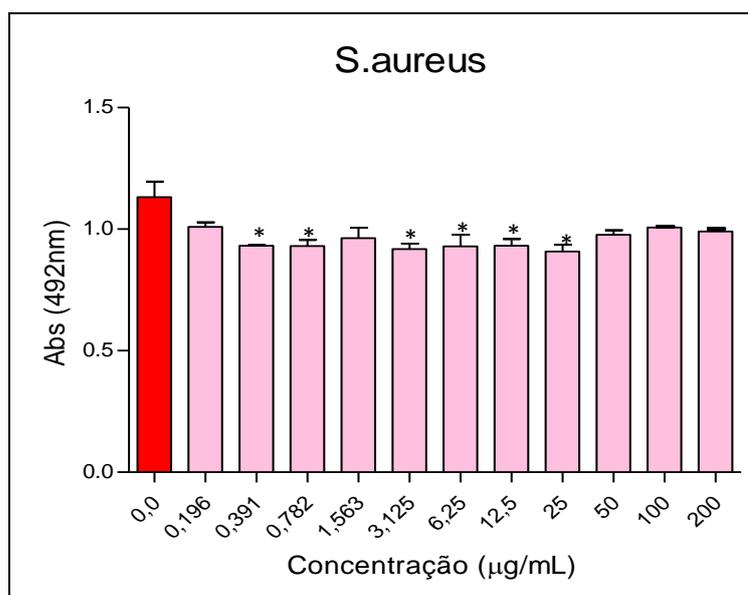
7 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PEÇONHA DA SERPENTE

PHILODRYAS NATTERERI

O potencial antimicrobiano da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* foi verificado pelo método de microdiluição em caldo de cultura sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella choleraesuis* subsp. *Choleraesuis* sorotipo *choleraesuis* ATCC 10708. Esse método baseia-se na avaliação da turvação visível decorrente do crescimento microbiano no caldo BHI. Foi observada presença de turvação em algumas concentrações no estudo, o que foi comprovado após a medição da absorbância e análise desses resultados através de gráficos.

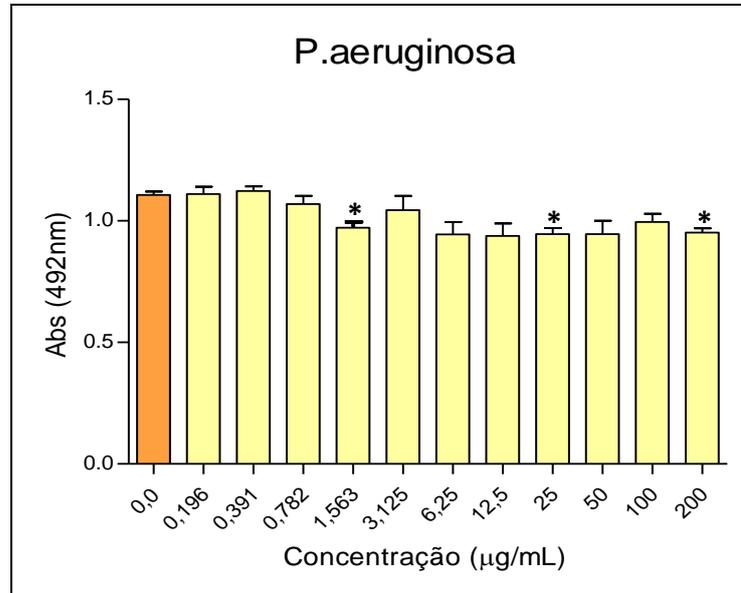
Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro-padrão médio (EPM). Para comparação foram empregados o teste “t” e ANOVA (com pós-teste de Bonferroni), utilizando-se como critério de significância $p < 0,05$. Os programas utilizados para efetuar a análise estatística foram Microsoft Excel 2007® e GraphPad Prism 5.0®.

Figura 92 – Perfil de inibição do crescimento bacteriano da peçonha da *Philodryas nattereri*. Os resultados são expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando em comparação com o correspondente grupo-controle.



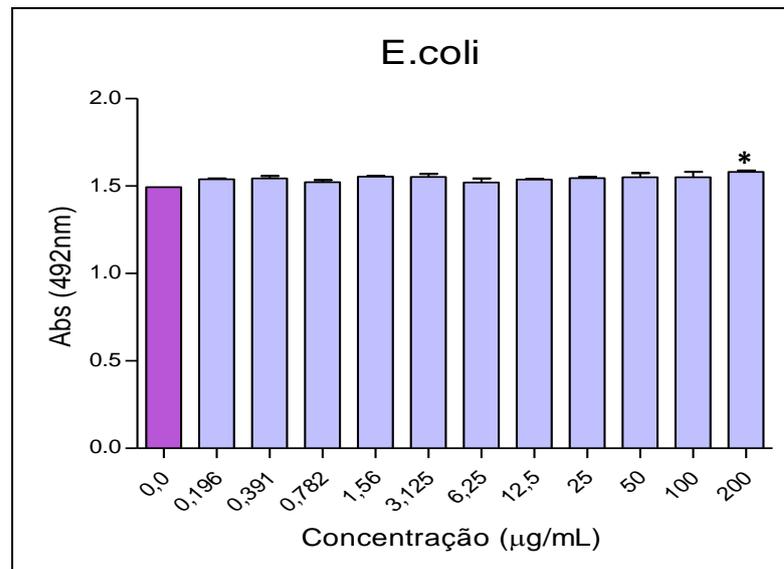
Fonte: Autora (2011).

Figura 93 – Perfil de inibição do crescimento bacteriano da peçonha da *Philodryas naterreri*. Os resultados são expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando em comparação com o correspondente grupo-controle.



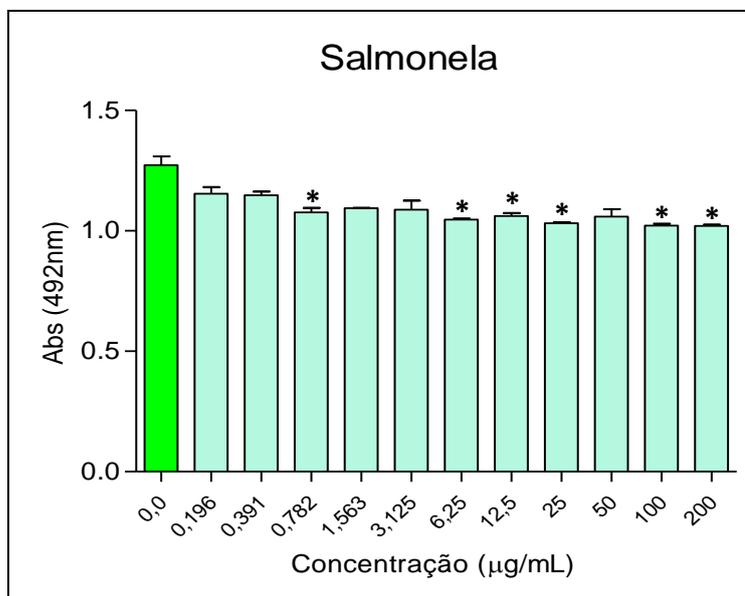
Fonte: Autora (2011).

Figura 94 – Perfil de inibição do crescimento bacteriano da peçonha da *Philodryas naterreri*. Os resultados são expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando em comparação com o correspondente grupo-controle.



Fonte: Autora (2011).

Figura 95 – Perfil de inibição do crescimento bacteriano da peçonha da *Philodryas nattereri*. Os resultados são expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando em comparação com o correspondente grupo controle.



Fonte: Autora (2011).

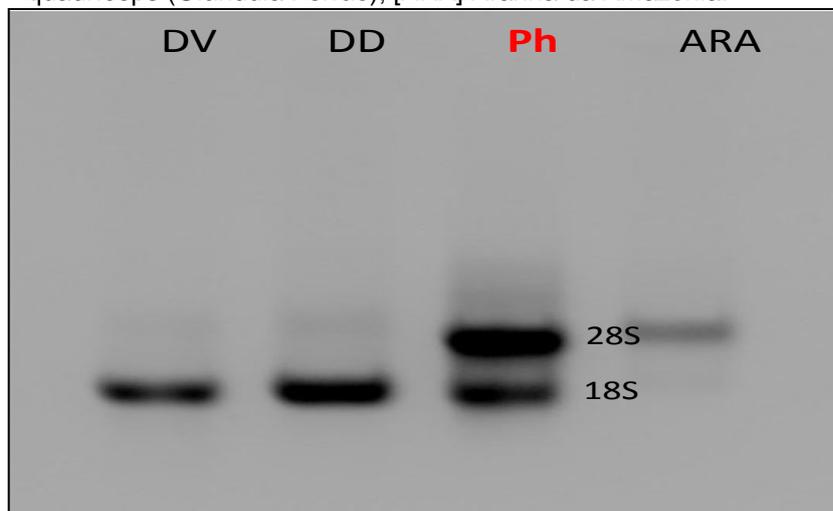
8 BIBLIOTECA DE cDNA

8.1 Resultados da Biblioteca de cDNA

A biblioteca de DNA foi iniciada com RNA extraído das células da glândula da *Philodryas nattereri* (Ph), [DV] *Dinoponera quadriceps* (Glândula Duvernoy); [DD] *Dinoponera quadriceps* (Glândula Ferrão); [ARA] Aranha da Amazônia; [PAC] *Protopalitoua* (Coral); [ML] *Micrurus*; [MM] Modelo molecular, junto com a enzima transcriptase reversa usada *in vitro* para produzir transcritos de DNA fita simples a partir das moléculas de RNAm. O gel de agarose mostrou o grau de pureza do RNA em que a quantidade e o rendimento do RNA total foram verificados para a integridade do rRNA 28S e 18S, por meio de gel de agarose. Lembra-se que a extremidade 3 possui uma extensão de adenina (A) como oligonucleotídeo iniciador para a transcriptase reversa. Os protocolos seguem os Kit BD Biosciences, EUA.

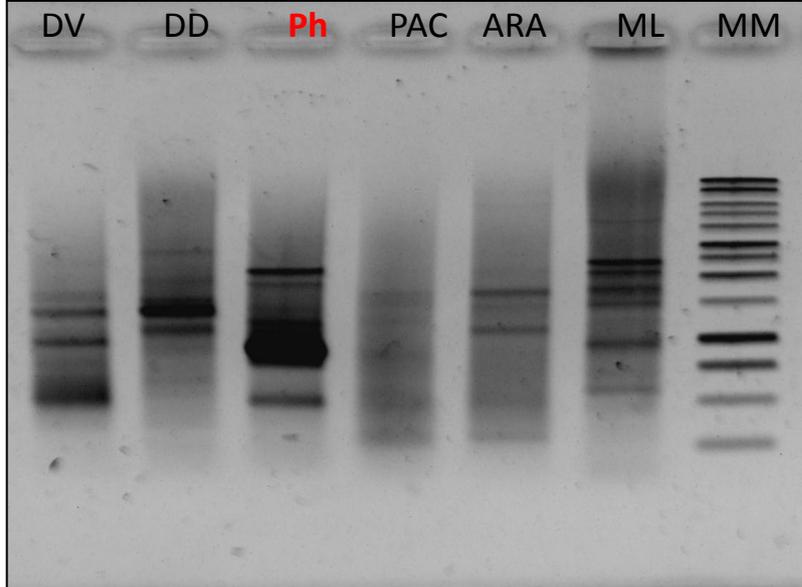
Após a degradação enzimática do RNAm, uma segunda fita de DNA, complementar à primeira, é sintetizada pela DNA-polimerase. O DNA fita dupla resultante foi chamado de DNA complementar (DNAc) (CAMPEBELL, 2010), como mostra nas figuras a seguir (Figura 96 a 99).

Figura 96 – Eletroforese em gel de agarose (TAE/Formamida) do RNA total da glândula de peçonha de *Philodryas nattereri* (Ph). [DV] *Dinoponera quadriceps* (Glândula Duvernoy) [DD] *Dinoponera quadriceps* (Glândula Ferrão); [ARA] Aranha da Amazônia.



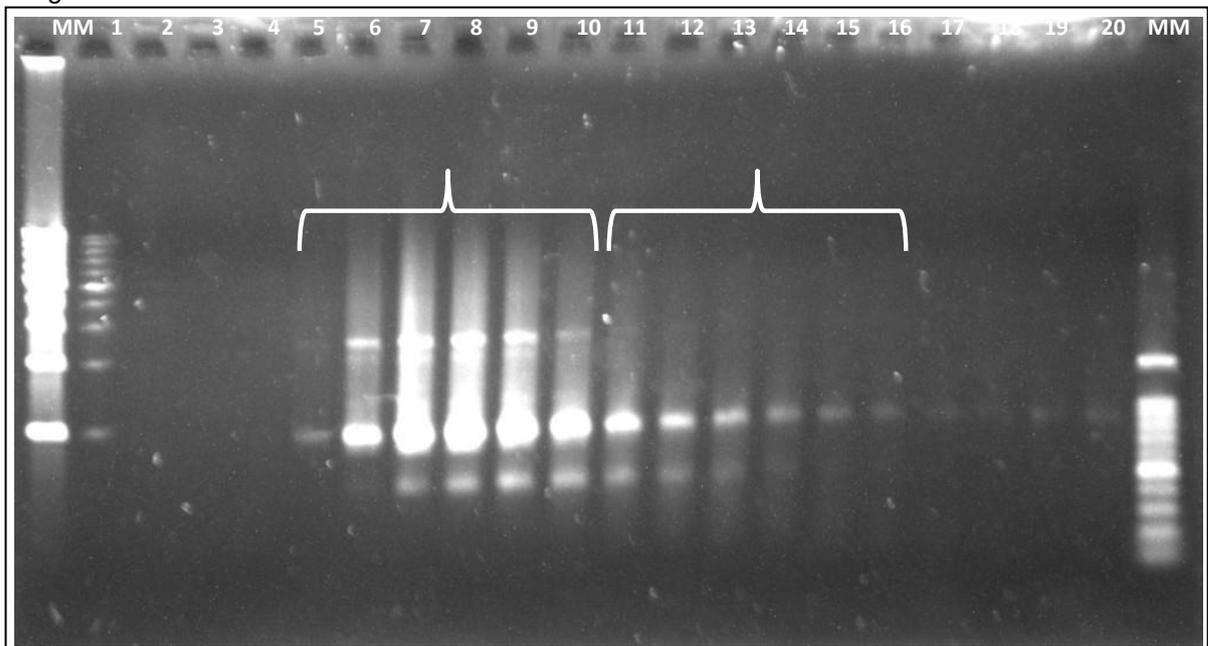
Fonte: Autora, 2011.

Figura 97 – Eletroforese em gel de agarose do DNA obtido a partir do RNA total glândula de peçonha de *Philodryas nattereri* (*Ph*). [DV] *Dinoponera quadriceps* (Glândula Duvernoy); [DD] *Dinoponera quadriceps* (Glândula Ferrão); [ARA] Aranha da Amazônia; [PAC] *Protopalitoua* (Coral); [ML] *Micrurus*; [MM] Modelo molecular.



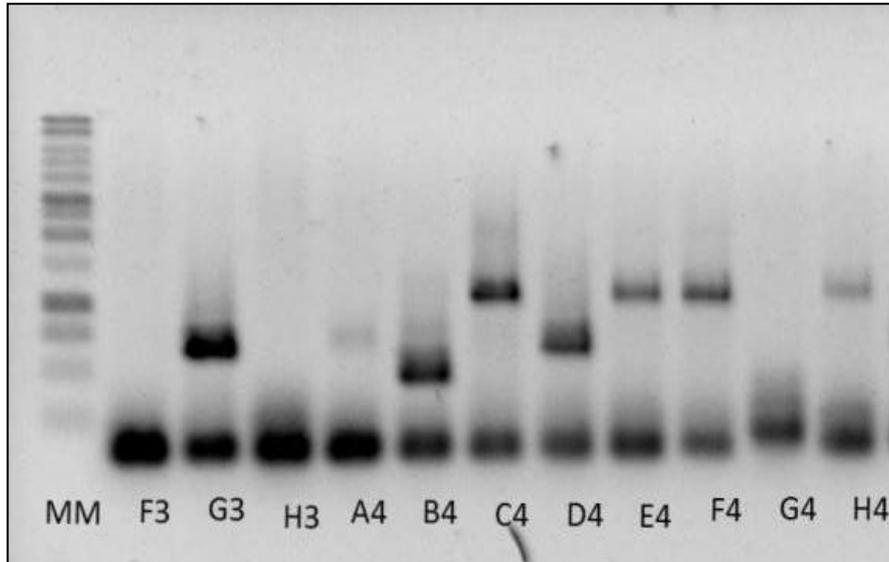
Fonte: Autora (2011).

Figura 98 – Fracionamento do DNA, de acordo com o padrão de distribuição de peso molecular dos fragmentos.



Fonte: Autora (2011).

Figura 99 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de clones isolados da biblioteca de cDNA da glandula de peconha de *Philodryas nattereri*.



Fonte: Autora, 2011.

8.2 Resultados dos clones da Biblioteca de cDNA

Os clones foram obtidos mediante a técnica de utilização da DNA-polimerase que faz cópias parciais do fragmento de DNA que foi sequenciado dos clones F₃, H₃, A₄: **Clone 01 = F₃**, **Clone 02 = H₃** e **Clone 03 = A₄**.

>Clone01

```
GCTAGCGTATTAGCAAATGGAGGTTGTCAAATTTCTCTTCGGAATTATACTAA
TTGTCTCAGCAGCGATGATTTCCATTGCTTTTGGATCTCCGATTGCCGATGCTC
GTGGAACCTCCGGATGCTTATAGTTTTGGATCTTCGGGTGTTATTCCAGACGACT
TTCGGATTCGTTAAACGTGCGTGAAACCGGAAATTGTCCTGACAAGAAAATAA
AGAAAAAGGACAACCTATACTTAATGAACGGAATATATGATATTTATGATACAG
TATATGTAATACCGCATAAATGTAGTATTGCTACTGTGAAATAAATTTTTTCGTA
AAAATAAAAAAAAAAAAA
```

>Clone02

```
CGTATTAGCAAATGGAGGTTGTCAAATTTCTCTTCGGAATTATACTAATTGTC
TCAGCAGCGATGATTTCCATTGCTTTTGGATCTCCGATTGCCGATGCTCGTGGA
ACTCCGGATGCTTATAGTTTTGGATCTTCGGGTGTTATTCCAGACGACTTTTCGG
ATTCGTTAAACGTGCGTGAAACCGGAAATTGTCCTGACAAGAAAATAAAGAAA
AAGGACAACCTATACTTAATGAACGGAATATATGATATTTATGATACAGTATATG
TAATACCGCATAAATGTAGTATTGCTACTGTGAAATAAATTTTTTCGNAAAAATA
AAAAAAAAAAAA
```

>Clone03

CCAAGCCAAGCCAAGATGCATCTCCAGGCTGTAGCTTCTGCTTTCCTCATCGT
 TTTCTTTGCCAACACAATGCTTTGGTCTCTGCCCTTGTGGATCTAACCCAGAC
 ACTCCAAGGAAAACAGACCATCCCAGGACTGAATGATGGAGAATTAGCGAAG
 AACTTCAATGTATTCAAATCTCTGGCAAAGCCATCGACCTCATGGAAACT
 CAAGAGGATTGAGATTGTCACNCAGGTTTTGGTCAAAAAGCCAGATATGACCC
 GCCCAGGACTGAATGATGAAGAATTANCGAAGATACTTCAGTGTCTTCAATCC
 ACTGGCTTATCCGACAACAAGGAGAAATTAGCCAAGCAGCTTAAGGCTATGA
 ACGAGGTTTTGGTCAAAAAGCCAGATATGCTTGCTGGACTGCTCAGTACTC
 GGTTCAACCGTAGAAAATCTCGGTTCAACCGTA

8.3 Sequenciamento Automático de DNA e Análise de Bioinformática

Todas essas análises em Bioinformática foram realizadas, simultaneamente, com os parâmetros dados pelos programas (<http://www.unb.br/ib/cel/biomol/>).

As sequências nucleotídicas com alta qualidade foram submetidas à predição da sequência de aminoácidos, utilizando-se a ferramenta Bio Edit, e à identificação das regiões ORFs, que marcam o início da tradução, com o códon ATG (metionina), e o término e desacoplamento do complexo ribossômico com os códons: TAA, TAG ou TGA (stop códons). Foram identificadas também as sequências que possuem a poliadenilação na região C-terminal, bem como a sequência sinal, AATAAA para a poliadenilação.

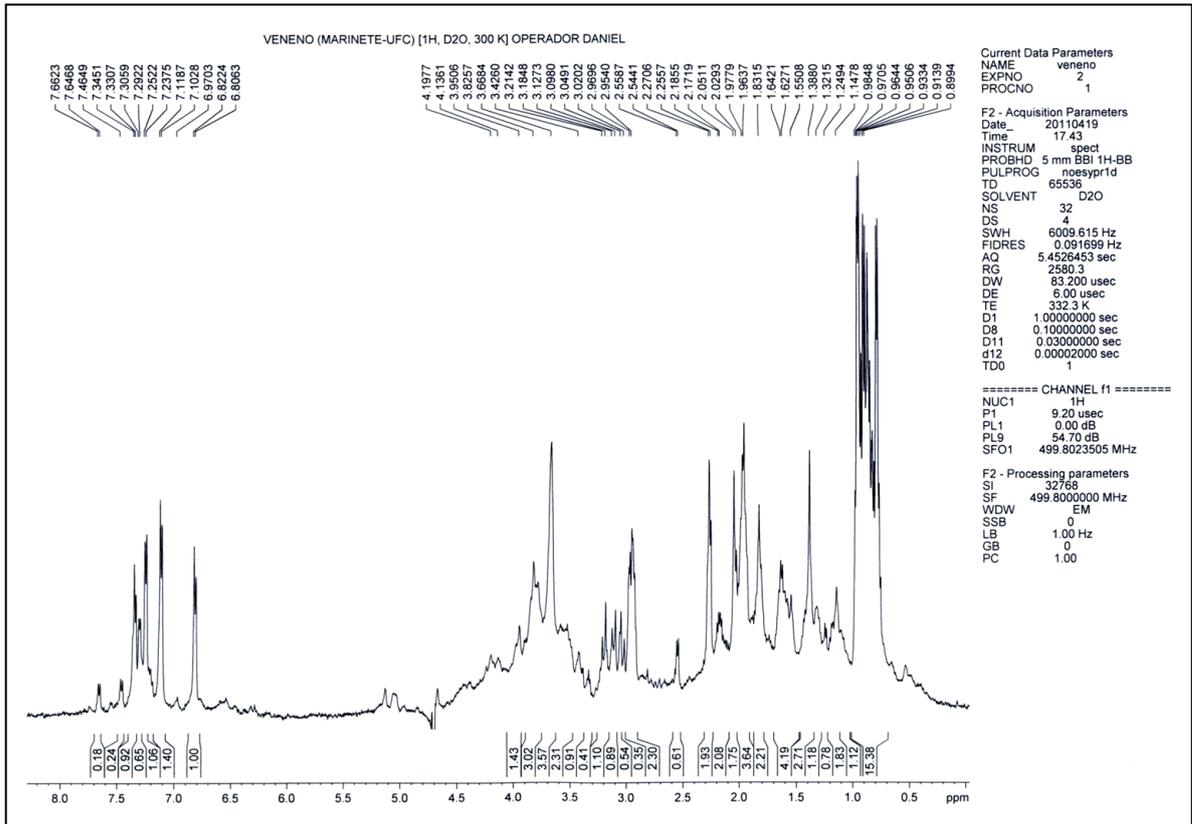
Todas as sequências (*contigs* e singletos) foram submetidas aos programas de busca de similaridade em banco de dados não redundantes de proteínas, por meio do algoritmo BLAST, a fim de atribuir prováveis funções. Foram utilizados os subtipos de Blast: blastn, que analisam a sequência de nucleotídeo, comparando-a com sequências de nucleotídeos depositadas e blast onde a sequência é traduzida nas seis possíveis fases de leitura e a análise é feita contra banco de proteínas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com valores de expectativa (*e-value*) ajustados para $<10^{-5}$ para a identificação das possíveis funções desses ESTs (ALTSCHUL *et al.*, 1990). As regiões de prováveis peptídeos sinais foram preditas com o programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e os alinhamentos múltiplos foram obtidos com o programa CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

**Espectrofotômetro de
Ressonância Magnética Nuclear**

9 ESPECTROFOTÔMETRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

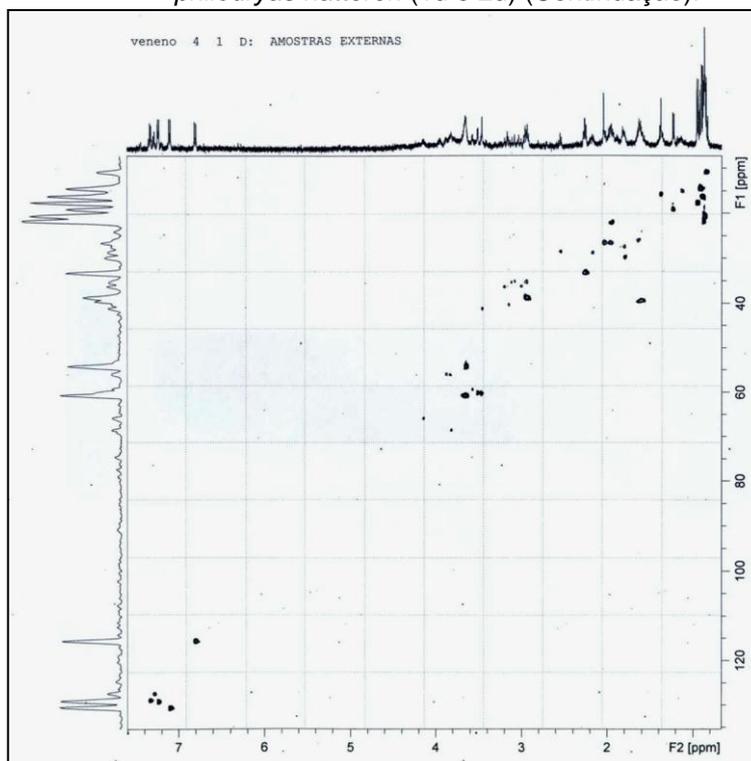
O espectroscopia ^{13}C -RMN reconheceu o esqueleto dos compostos do carbono de acoplados ao ^{13}C - ^1H , decorrente da irradiação simultânea da amostra com uma banda de frequência intensa (desacoplamento de banda larga) como mostra as Figuras 100 a 102.

Figura 100 – Espectrofotômetro de RMN da peçonha da *Philodryas nattereri* (1d e 2d).



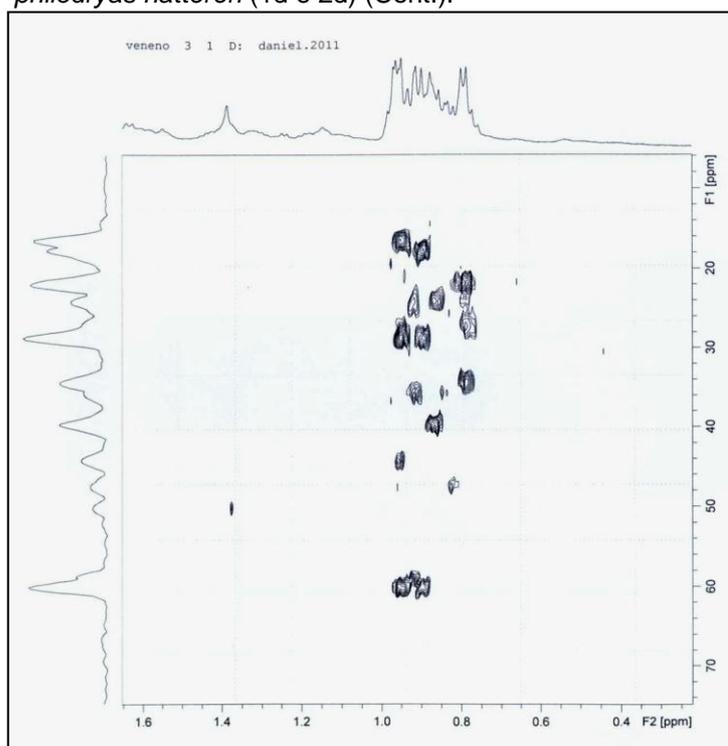
Fonte: Autora (2011).

Figura 101 – Espectrofotômetro de RMN da peçonha da *philodryas nattereri* (1d e 2d) (Continuação).



Fonte: Autora (2011).

Figura 102 – Espectrofotômetro de RMN da peçonha da *philodryas nattereri* (1d e 2d) (Cont.).



Fonte: Autora, 2011.

10 DISCUSSÃO

Neste ensaio, utilizamos diferentes metodologias para a análise dos efeitos farmacológicos da peçonha da serpente *Philodryas nattereri*.

As peçonhas ofídicas são, em geral, misturas complexas, contendo componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que cerca de 90% destes são proteínas com ou sem atividade enzimática, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (DEUTSCH; DNIZ, 1955; IWANAGA; SUZUKI, 1979; BJARNASON; FOX, 1988/89). Enquanto isso, os componentes inorgânicos mais comuns são Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Na^+ , P^+ , Co^{++} , e Zn^{++} , sendo que alguns exercem função de mantenedores da estabilidade estrutural de certas proteínas, como as metaloproteínas, que são fatores hemorrágicos, e outros funcionam como catalisadores em funções enzimáticas específicas (FRIEDERICH, TU, 1971; BJARNASON; FOX, 1988/89). No entanto, grande variabilidade na composição e atividade das peçonhas ofídicas é relatada em diversos trabalhos e pode ser observada em diversos níveis: entre famílias, gêneros, inter e intra-específica, sazonal, ontogenética, sexual, geográfica (CHIPPAUX, *et al.*, 1991).

Segundo Weinstein e Kardong (1994) Hill e Mackessy (2000) e Mackessy (2002), o teor de proteínas totais das peçonhas de Dipsadidae é amplamente variável, ocorrendo diversificação da ordem de 15 a 100% em várias peçonhas estudadas.

A peçonha da *Philodryas nattereri*, após a liofilização, apresentou o conteúdo de proteínas totais de aproximadamente 80 – 86%, sendo, desta forma, menos protéico do que a peçonha de referência nacional de *Bothrops jararaca*, o qual apresenta teor protéico total da ordem de 100%. Estes achados corroboram os estudos realizados por Rocha e Furtado (2007) e Acosta *et al.* (2003b).

No referido estudo, a peçonha de *Philodryas nattereri* tem como parâmetro de comparação a peçonha de *Bothrops jararaca*. Ambas apresentaram várias bandas, quatro delas como majoritárias em faixas de peso molecular aproximado (20 a 80 Kda). Estes achados podem reforçar hipóteses de estreita semelhança no que diz respeito às ações e atividade da

peçonha de representantes das famílias Dipsadidae e Viperidae e corroboram a análise eletroforética realizada em Rocha *et al.*, (2005).

As peçonhas das Dipsadidae, nos últimos anos, são mais frequentemente estudadas e muitos de seus componentes e ações são descritos. De modo geral, sugere-se que há uma grande semelhança entre algumas destas toxinas e dos membros da família Viperidae, em razão da presença de proteases, fosfolipases, hialuronidases, entre outras enzimas que levam à lesão local, culminando em edema, dor (hiperalgesia), equimose, bolhas e necrose (PUORTO ; FRANÇA, 2003; SALOMÃO *et al.*, 2003), e complicações sistêmicas mais severas como insuficiência renal aguda (ROCHA *et al.*, 2008) e alterações no sistema cardiovascular.

Os fatores que influenciam na composição e, conseqüentemente, na atividade biológica da peçonha são a localização geográfica do animal, alimentação, idade, gênero e espécie (ROCHA e FURTADO, 2005). Uma vez que há variabilidade dos sinais e sintomas dependendo da espécie, o estudo de peçonha de serpentes até então não conhecidas e estudadas é fundamental para se compreender as possíveis complicações que possam vir a ocorrer no caso de acidentes com essas serpentes.

Com o objetivo de esclarecer os mecanismos pelos quais a peçonha da *Philodryas nattereri* induz varios efeitos farmacológicos, estudamos o sistema de perfusão de rim isolado, o qual permite avaliar os efeitos funcionais e morfológicos de uma substância sobre esse órgão, sem interferências de fatores sistêmicos.

A administração da peçonha de *P. nattereri* (1µg/mL e 3µg/mL) no sistema de perfusão renal sugere uma ação nefrotóxica, pois verificamos redução na pressão de perfusão (PP), na resistência vascular renal (RVR), e no ritmo de filtração glomerular (RFG). Ocorreu, contudo, um aumento significativo em relação ao fluxo urinário nos tempos de 90 minutos e 120 minutos. O percentual de transporte total de sódio (%TNa) e potássio (% K) e cloro (% Cl) diminuiu, enquanto o clearance osmótico (Cosm) foi maior em relação aos controles.

Esses resultados têm muita semelhança com os encontrados por Monteiro e Fonteles (1999), Havt *et al.* (2008) e Braga (2006) com as peçonhas das serpentes *Bothrops jararaca* e *Bothrops insularis* nas mesmas condições

experimentais. Como é bastante difundido, as peçonhas botrópicas são caracterizadas por promoverem hipotensão em diversos casos de acidentes envolvendo as serpentes desse gênero. Os mecanismos que promovem esse vasorrelaxamento sistêmico provavelmente são os mesmos que afetam a pressão de perfusão renal de forma a reduzir os valores desses parâmetros como encontrado nos estudos realizados com a peçonha da *Philodryas nattereri*.

Por não conhecermos em sua totalidade a peçonha bruta da *Philodryas nattereri*, não se pode afirmar que a redução da pressão de perfusão renal observada nos experimentos realizados pode decorrer de um componente específico. Mesmo com essa limitação, mediadores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-1 (IL -1), IL-6, IL -10 e interferon-gama (IFN- γ) podem estar envolvidos nesse processo de diminuição da pressão de perfusão renal, uma vez que peçonhas geralmente induzem a liberação dessas substâncias, como reportado anteriormente (PETRICEVICH *et al.*, 2000). Pode haver, ainda, compostos que exerçam ação direta no tecido renal. Esses mediadores inflamatórios, com potencial relaxante, podem ter contribuído para a redução da resistência vascular renal neste experimento.

Sabe-se que nas peçonhas ofídicas existem várias enzimas com atividade proteolítica, dentre elas, as metaloproteinases, hialuronidas, fosfolipases A₂, que podem atuar por ação direta sobre diferentes substratos, causando destruição de estruturas teciduais renais pela ativação e liberação de mediadores celulares e moleculares do processo inflamatório como prostaglandinas, citocinas e fatores do complemento (GUTIÉRREZ; RUCAVO, 2000).

As prostaglandinas (PGE₂, PGI₂) são poderosos vasodilatadores intrínsecos e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina. Os níveis basais das prostaglandinas PGE₂, PGI₂ são importantes na manutenção do fluxo sanguíneo renal e do ritmo de filtração glomerular (RANG; DALE; RITTER, 2007). Como os resultados apresentaram semelhança com os das peçonhas das botrópicas, esses destacaram vários peptídeos que intensificam à resposta a bradicinina, um peptídeo isolado da peçonha de várias *bothrops* (FERREIRA *et al.*, 1970, 1992, 1998). A bradicinina participa fisiologicamente da regulação

da pressão sanguínea e da função renal. Trata-se de uma potente substância vasodilatadora que atua através da ativação de receptores β_2 , estimulando a liberação de NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (MOREAU *et al.*, 2005). Guimarães *et al.* (1986) demonstraram que a bradicinina diminuiu a resistência vascular renal e da pressão de perfusão observados em estudos como este.

A peçonha da *Philodryas nattereri* na dose de 3 μ g/mL alterou a histologia renal como dilatação tubular, tendendo para degeneração, lesões reversíveis que refletem as fases iniciais da agressão tóxica da peçonha. A retenção de íons é a causa dessa degeneração ocorrendo a reabsorção tubular, promovendo uma redução do transporte de íons sódio, potássio e cloreto, assim como o aumento do *clearance* osmótico (BRAGA, 2006).

Observou-se depósito de material proteico dentro dos túbulos e nos espaços de Bowman, sem alterações nos vasos, lesão no epitelial tubular, acarretando o acúmulo de proteínas liberadas no citoplasma das células lesadas, juntamente com resíduos citoplasmáticos. Esses achados histológicos corroboram os resultados de espécies do gênero *Bothrops* (HAVT 2001; BRAGA 2006, BURDMAN *et al.*, 1993).

Avaliou-se o potencial citotóxico da peçonha da *Philodryas nattereri* utilizando cultura de células tubulares renais (MDCK). Trata-se de uma linhagem com características morfológicas e funcionais semelhantes às células do túbulo coletor distal de mamíferos (COLLARES-BUZATO; SUEUR; CRUZ-HOFLING, 2002).

Inicialmente verificamos se a peçonha da *Philodryas nattereri* era capaz de induzir morte celular, utilizando o ensaio do MTT, técnica usada para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade celular (MOSMAN *et al.*, 1993). Os resultados mostram que a peçonha apresentou toxicidade para as células, reduzindo de forma significativa a viabilidade celular nas concentrações 50 e 100 μ g/mL.

Vários autores concordam com a idéia de que a ação proteolítica das peçonhas ofídicas têm um importante papel citotóxico em vários tipos celulares (DAMICO, 2007; GUTIERREZ; LOMONTE, 1995; PRIANTI-JR *et al.*, 2003), podendo, desta forma, provocar efeitos deletérios no epitélio tubular renal. Isso poderia também ocasionar a perda da função de transporte das

células epiteliais renais, diminuindo o transporte de eletrólitos, como sódio, potássio e cloro observados nesse estudo.

A peçonha também apresenta metaloproteinases que podem causar proteólise da matriz extracelular, interrompendo a adesão célula- matriz e induzindo apoptose em linhagens de células endoteliais (BALDO *et al.*, 2008). A peçonha da *Philodryas nattereri* demonstra efeito citotóxico em várias linhagens celulares. A citotoxicidade se mostra como indução de apoptose e parece envolver a produção de peróxido de hidrogênio, e o aumento na concentração de H₂O₂ pode induzir a ruptura de membranas, parada do crescimento celular e conseqüentemente morte celular (NAUMANN *et al.*, 2011).

Analisando os resultados referentes aos experimentos utilizando o modelo de pressão arterial, foi notada uma diminuição significativa da pressão arterial média em ratos tratados com a peçonha de *Philodryas nattereri* sendo dose – dependente. As frequências cardíaca e respiratória também reduziram significativamente após a infusão da peçonha nas concentrações das doses de 100 e 300µg/mL.

Embora o mecanismo de ação hipotensor da peçonha não seja elucidado, mas partindo-se de uma premissa científica seguida por Rocha e Silva (1949) e Ferreira (1970), onde, mediante observação de efeitos causados pela picada da serpentes *Bothrops jararaca* que provoca uma súbita queda de pressão arterial nas vítimas, é possível sugerir que o efeito hipotensor decorra de um fator potencializador de Bradicina presente na peçonha de *jararacas* (FERREIRA, 1965; AMORIM *et al.*, 1967; FERREIRA *et al.*, 1994). Assim como foi pesquisado anteriormente na peçonha das *B. jararaca*, é possível investigar o mecanismo envolvido no efeito hipotensor da *Philodryas nattereri*.

Por outro lado, o endotélio vascular vem aumentando seu papel na importância do controle do tônus vascular e no controle da pressão arterial, fluxo cardíaco e débito cardíaco, atuando não apenas como barreira passiva entre o plasma e o líquido extracelular mas como fonte de numerosos mediadores químicos potentes.

Esses mediadores controlam ativamente a contração do músculo liso subjacente e também influenciam a ação das plaquetas e das células mononucleares (WANG, *et al.*, 2004).

As células endoteliais têm a capacidade peculiar de sintetizar e secretar substâncias vasoativas que controlam o fluxo sanguíneo, por exemplo, o óxido nítrico, a prostaciclina e peptídeo vasoativo, como a endotelina (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, Factor of Endotelial Relaxation) foi descoberto por Furchgott e Zawadzki, em 1980, e identificado subsequente como óxido nítrico (NO) pelos grupos de Moncada e Ignarro (Dusse *et al.*, 2003). O reconhecimento deste mediador expandiu enormemente a compreensão do papel desempenhado pelo endotélio.

O NO é o ativador endógeno da guanilato-ciclase solúvel, resultando na formação de GMP_c , que atua como segundo mensageiro em muitas células, incluindo nervos, músculo liso, monócitos e plaquetas (DUSSE *et al.*, 2003).

O NO mostra-se particularmente importante nos vasos de resistência, em virtude da sua liberação contínua, produzindo um tônus vasodilatador e contribuindo para o controle fisiológico da pressão arterial (RANG *et al.*, 2007); (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

A peçonha da serpente de *Philodryas nattereri* promoveu, em anel de aorta, vasodilatação parcial da contração, induzida tanto por estímulo eletromecânico como por estímulo farmacomecânico. É improvável que esta ação decorra de um suposto efeito indireto, visto que a recuperação do tecido após a exposição à peçonha de *Philodryas nattereri* foi possível, indicando que seus efeitos são reversíveis. Seu efeito vasodilatador pode ser o efeito reflexo dos barorreceptores relacionado à sua capacidade de reduzir a pressão arterial média em ratos anestesiados, conforme os experimentos anteriores em que concluímos essa hipótese.

As peçonhas de Dipsadidae, nos últimos anos, são mais frequentemente estudadas e muitos de seus componentes e ações são descritos. De modo geral, sugere-se que há uma grande semelhança entre algumas destas peçonhas e membros da família Viperidae, em razão de presença de proteases, fosfolipase, hialuronidases, entre outras enzimas que

levam à lesão local, culminando em edema, dor (hiperalgesia), equimose, bolhas e necrose (PUORTO; FRANÇA, 2003; SALOMÃO *et al.*, 2003).

As proeminentes atividades edematogênica e hiperalgésica, características em acidentes ofídicos, e seus rápidos desenvolvimentos, são típicos sinais do processo inflamatório agudo, decorrente da ação de substâncias endógenas liberadas após o estímulo lesivo, como bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, entre outros (LOMONTE, 1994; CHACUR *et al.*, 2001). Vários componentes das peçonhas podem ser responsáveis pela formação do edema, tais como aminas biogênicas, pequenos peptídeos, proteínas, esterases, enzimas liberadoras de cininas; porém ainda são escassas as pesquisas quanto à purificação e caracterização destes componentes (GUTIÉRREZ ; LOMONTE, 2003).

É interessante notar que poucos trabalhos tratam da elucidação dos processos envolvidos no edema e na hiperalgésia, que são os sintomas mais evidentes nos envenenamentos causados por colubrídeos e Dipsadidae (NICKERSON ; HENDERSON, 1976; SILVA; BUONONATO, 1983/84; RIBEIRO *et al.*, 1999; SALOMÃO *et al.*, 2003). Estudos do desenvolvimento do edema induzido por *Philodryas nattereri* determinaram sua dose mínima edematogênica como 3µg, sendo mais edematogênica do que algumas peçonhas de botrópicos (ACOSTA *et al.*, 2003b; PEICHOTO, *et al.*, 2004).

Experimentos realizados com peçonha de serpentes mostram que a iniciação e o tempo requerido para que o edema atinja sua ação máxima variam consideravelmente (VISHWANATH *et al.*, 1987; SELISTRE *et al.*, 2005; TAN; SAIFUDDIN, 1990).

Os resultados mostraram que a peçonha traz uma ação edematogênica máxima de duas horas após a inoculação, seguida por um gradual declínio igualando-se ao controle em 24 horas, sendo 3µg a dose mínima edematogênica determinada, achados estes que corroboram os resultados encontrados por Rocha *et al.*, (2006). A peçonha de *Philodryas nattereri* demonstra uma cinética rápida de duas horas enquanto outras peçonhas como, por exemplo, *Bothrops* alcançam seu pico de edema três horas após a inoculação (BARBOSA *et al.*, 2003).

Observou-se ainda, que as respostas nociceptivas apresentaram um padrão onde a maior reatividade dos animais se mostrou aproximadamente

entre 20 e 30 minutos após a inoculação e o pico máximo de edema é atingido em duas horas após a inoculação. Poderia sugerir, então, que tais atividades estariam ligadas diretamente ao processo inflamatório, porém estudos mais específicos, como as investigações realizadas por Teixeira *et al.* (1994) para a peçonha de *Bothrops jararaca*, Ferreira (2000) para a peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri* e, Chacur *et al.* (2001) para a peçonha de *Bothrops asper*, são necessários para a elucidação dos mecanismos envolvidos na dor e no edema, bem como sua ligação com a reação inflamatória. A lesão tecidual local representa a principal causa de dor e isso resulta possivelmente na liberação local de uma ampla variedade de agentes bioquímicos que podem estar envolvidos na formação do edema e que agem sobre as terminações nervosas. Os receptores opióides nas terminações nervosas mediam a inibição da liberação de neurotransmissores, que podem agir diretamente ou propiciar a liberação de outros mediadores que atuam no desenvolvimento da dor e do edema. Segundo Lopes (2008), com a peçonha de *Philodryas patagoniensis* observou os mesmos resultados encontrados em nossos experimentos. Para testar o envolvimento de receptores opióides na mediação da dor e do edema, eles usaram um analgésico opióide de ação central. O analgésico foi capaz de reduzir a dor, mas não o edema.

Inibidores do metabolismo do ácido araquidônico podem prevenir o edema induzido por numerosos agentes flogísticos (HO *et al.*, 1993; ERD *et al.*, 1993).

A ciclooxigenase (COX) é a enzima que catalisa a biossíntese de prostaglandinas a partir do substrato ácido araquidônico (VANE *et al.*, 1998).

Os eicosanóides prostaglandinas (PG_S) têm uma gama de atividades biológicas, as quais são importantes em processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a inflamação (MITCHELL *et al.*, 1995; PORTANOVA *et al.*, 1996; SMIT *et al.*, 1998). Prostaglandina E₂ (PGE₂) é o principal produto em sítios inflamatórios e contribui para o aumento do fluxo sanguíneo local, formação de edema e sensibilização à dor (GIULIANO; WARNER, 2002).

Metabólitos do araquidonato possivelmente produzidos pela via das ciclooxigenases podem estar envolvidos na formação do edema e na indução

da nocicepção pela peçonha da *P. nattereri*, uma vez que a Indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases, não foi capaz de reduzir ambas as atividades, como demonstrado em nosso trabalho.

Outra evidência da participação da via que envolve os metabólitos do ácido araquidônico no desenvolvimento do edema por *P. nattereri* também foi encontrada, uma vez que o corticosteróide dexametasona reduziu significativamente a atividade edematogênica da peçonha, assim como ocorre nas peçonhas de *Philodryas patagoniensis* (LOPES, 2008), *Bothrops lanceolatus* (GUIMARÃES *et al.*, 2004), *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* (OLIVO *et al.*, 2007), *Bothrops insularis* (BARBOSA *et al.*, 2003), e *Lachesis muta rhombeata* (SOARES DE MOURA *et al.*, 1998).

A dexametasona, de forma indireta inibe fosfolipase A₂, uma enzima criticamente envolvida na mobilização do ácido araquidônico dos fosfolipídios de membrana, mediante a liberação da lipocortina (FLOWER, 1989). Os efeitos aqui observados podem também ter um envolvimento na ação direta sobre leucócitos e outros tipos celulares que inibem a liberação de citocinas (ANGELI *et al.*, 1999) ou outros mediadores inflamatórios envolvidos nas respostas induzidas pela peçonha.

Estes corticosteróides podem, adicionalmente, interferir com a expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-I) e a liberação de quimiocina KC de mastócitos, suprimindo assim, a acumulação leucocitária (TAILOR *et al.*, 1999), e também inibir a penetração dos leucócitos por meio das junções das membranas (KATORI *et al.*, 1990). Estes e outros efeitos da dexametasona não mediados pela lipocortina poderiam contribuir para o efeito do corticosteroide no edema induzido pela peçonha.

Dentre os mediadores possivelmente envolvidos em vias de desenvolvimento de dor e edema, testamos também as chamadas aminas vasoativas, como a serotonina e a histamina, que exercem papel fundamental na inflamação, sendo capazes de causar dilatação de vênulas pós-capilares e, conseqüentemente, aumentar o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular (BARNES *et al.*, 1995). Além disso, elas estão implicadas em processos inflamatórios (BESSON, 1997). A histamina e a serotonina agem sinergicamente com a bradicinina, induzindo hiperalgesia (LAVICH *et al.*, 2003).

A serotonina é estocada em plaquetas e mastócitos, sendo capaz de ser liberada sob estímulo inflamatório (HOURANI; CUSACK, 1991). Esta amina está envolvida na inflamação por via de receptores serotoninérgicos 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5HT₄ e HT₇ (SUFKA *et al.*, 1992; DOAK ; SAWYNOK, 1997; PARADA *et al.*, 2001; LAVICH *et al.*, 2003). Por outro lado, diversos autores mostram que a serotonina desempenha importante papel na indução do edema por diversas peçonhas (GUIMARÃES *et al.*, 2004; NASCIMENTO Jr. *et al.*, 2005).

Nossos resultados ora aqui relatados demonstraram que o pré-tratamento com soro antibotrópico inibe o edema induzido pela peçonha da *Philodryas nattereri* pela metade.

O soro antibotrópico contém imunoglobulinas específicas purificadas do plasma de animais hiperimunizados, que foram capazes de neutralizar as atividades hemorrágica, hemolítica e necrosante do processo inflamatório.

Grande parte das peçonhas com ação local exibe altos níveis de atividade fosfolipásica A₂. Entretanto a peçonha aqui estudada expressa diminuta atividade de fosfolipase (ROCHA *et al.*, 2006) e a ausência desta atividade pode sugerir que mecanismos peculiares estejam envolvidos no desenvolvimento dos sinais locais ocasionados por estas peçonhas. Então, resolveu-se investigar mais profundamente as alterações induzidas diretamente na microcirculação, uma vez que a manutenção da integridade do tecido depende da microvasculatura e modificações no comportamento da rede microcirculatória levam a condições patológicas. As modificações vasculares associadas a processos inflamatórios, hipertensão, distúrbios de coagulação ocorrem em virtude desses eventos que se iniciam no plano microvascular (BRAIN, 1994).

A resposta inflamatória compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos (ALBEDA; BUCK, 1990; OSBORN, 1990) e está intimamente ligada à indução e à severidade dos efeitos locais desencadeados por peçonha de ofídicos.

Entre os eventos vasculares, estão as alterações hemodinâmicas que culminam no extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Inicialmente ocorre uma vasoconstrição transitória, seguida de uma

vasodilatação, que favorece o aumento de fluxo sanguíneo, causando calor e rubor no local da injúria.

Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso, caracterizadas, principalmente, pela contração de células endoteliais e abertura de junções entre essas células. Isto, por sua vez, leva ao crescimento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (KOWAL-VERN *et al.*, 1997; RANKIN, 2004), que caracteriza o edema inflamatório (JANEWAY; TRAVERS, 1994; TEDGUI; MALLAT, 2001). As vênulas pós-capilares são o principal sítio de controle do processo inflamatório e participam ativamente dos seus eventos vasculares, pois é nesses vasos que as células endoteliais irão agir, dependendo do estímulo, aumentando a permeabilidade vascular, levando a formação do edema e ou iniciando eventos que levam à acumulação de células inflamatórias em tecidos (BRAIN, 1994; LOPES, 2008).

As alterações de diâmetros de vênulas aqui observadas indicam que a peçonha de *P. nattereri* pode agir na indução dos eventos iniciais do processo inflamatório agudo, o qual, posteriormente, culminará no aumento da permeabilidade vascular, formação do edema e acúmulo de células no local da inflamação. Tal perfil de diâmetros de vênulas aqui relatado foi também observado por Farsky *et al.*, (1999) com a peçonha de *B. Jararaca*, e Lopes, (2008), com a peçonha *Philodryas patagoniensis*.

A mionecrose pode ser causada pela ação direta de miotoxinas das peçonhas sobre a membrana plasmática das células musculares, e indireta, pelo desenvolvimento de isquemia, resultante de drásticas alterações causadas por tais peçonha (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MACKESSY, 2002). As miotoxinas são um grupo de componentes responsáveis pelo dano muscular, sendo estes componentes denominados “miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂”. Se, entretanto, em algumas, pode estar ausente o efeito enzimático (MANDELBAUM; ASSAKURA, 1988; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; GUTIÉRREZ *et al.*, 1989; SELISTRE *et al.*, 2005; MOURA-DA-SILVA, *et al.*, 1991; LOPES, 2008).

Em decorrência de pouca informação disponível sobre a importância da miotoxicidade no modo de ação das secreções de Dipsadidae, investigamos, com análises histológicas, as lesões induzidas pela peçonha de

Philodryas nattereri em músculo gastrocnêmio de camundongos. As análises mostraram que a peçonha foi capaz de induzir alterações morfológicas como hemorragia interfibrilar, edema, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e necrose de fibras.

Estudos sobre a atividade miotóxica desta peçonha, avaliada *in vitro*, mostram algumas discrepâncias no que diz respeito à liberação da enzima intra-muscular creatino-quinase (CK) (COSTA, 2006), a qual é frequentemente utilizada como marcador de lesão muscular. Peichoto *et al.* (2004) mostraram que 50µg da peçonha foram capazes de induzir um aumento do nível sérico de CK, o qual foi significativo a partir de duas horas após a inoculação e atingiu seus maiores valores entre duas e quatro horas após a inoculação da peçonha. Segundo Mebs *et al.*, (1978), a dosagem dos níveis séricos de creatino-quinase é um método clínico estabelecido para a estimativa de doenças envolvendo células musculares, isto é, danos celulares e/ou mionecrose. Nossa avaliação histológica dos efeitos miotóxicos corrobora os estudos realizados por Peichoto *et al.* (2005) e Rocha *et al.*, (2006) no que diz respeito às alterações induzidas *in vivo*. Lesões semelhantes também foram encontrados para a peçonha de *Philodryas olfersi* (ACOSTA DE PÉREZ *et al.*, 2003b; ROCHA *et al.*, (2006). Tais alterações são também descritas para peçonha de espécies do gênero *Bothrops*, mas nesses casos, a intensidade e os intervalos de tempo nos quais as lesões são vistas diferenciam daqueles aqui mostrados, podendo indicar mecanismos diferentes na indução da mionecrose (GUTIÉRREZ, 2002).

A injeção intraperitoneal da peçonha *P. nattereri* induziu um significativo processo inflamatório semelhante ao do ácido acético, avaliado pelo número de contorções abdominais. Os registros apontam uma nova visão sobre a importância médica dos representantes da família Dipsadidae.

Dessa forma, a pesquisa de atividades biológicas nessas fontes se torna uma importante ferramenta de *screening*, pois são responsáveis pelos efeitos observados, sendo realizados estudos de mecanismo de ação e toxicidade, tanto na busca de substâncias de valor terapêutico quanto por ferramentas farmacológicas e de diagnóstico (FERREIRA *et al.*, 2008).

O potencial antimicrobiano, observado com a peçonha da *Philodryas natterier* com *Staphylococcus aureus*, demonstrou efeito inibitório sobre o

crescimento de maneira significativa em várias concentrações, enquanto contra *Pseudomonas aeruginosa* só inibiu o crescimento de maneira significativa na concentração de 200µg/mL. Em relação as cepas de *E. Coli* e *Salmonela*, observamos pequena inibição parcial sobre as cepas testadas.

Os efeitos antibacterianos das peçonhas de varias serpentes, (Dipsadidae, crotalídeos, viperídeos e elapídeos), provavelmente podem decorrer das citotoxinas fatores líticos direto e enzimas fosfolipase A₂ (FLA₂) contidas nessas peçonhas (BLAYLOCK, 2000). Também a LAAO presente na peçonha de serpentes mostra ação antimicrobiana sobre diversos microorganismos. Esse efeito é muitas vezes decorrente da produção de peróxido de hidrogênio a partir da atividade catalítica dessa enzima sobre aminoácidos, como observado por Ciscotto *et al.* (2009). Samy *et al.* (2007) demonstraram o efeito antibacteriano de L-aminoácido – oxidase isolada de *Crotalus adamanteus* e *Bothrops asper* sobre *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*, usou o mesmo modelo Stiles *et al.* (1991). Em contrapartida, a peçonha total de *Bothrops leucurus* inibiu o crescimento de *S. Aureus*, enquanto sua fração L-aminoácido oxidase não inibiu nenhuma das cepas testadas (TORRES *et al.*, 2010). Tal resultado pode ser explicado pela produção de peróxido de hidrogênio, pois se acredita que esse composto induza a ruptura da membrana microbiana e, conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo citoplasmático (TOYAMA *et al.*, 2006).

Outra possível razão para essa diferença de susceptibilidade entre a peçonha bruta e a fração de LAAO (L-aminoácido-oxidase) pode ser explicado pelo que Nunes *et al.* (2011) apresentaram sobre o efeito antibacteriano de uma lectina presente nas peçonha das serpentes, o qual não foi capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram-negativas, como *E. Coli* e *K. Pneumoniae*. Os autores explicam que uma possível razão é a dificuldade que a lectina da peçonha bruta tem em atravessar as paredes celulares das bactérias Gram-negativas para chegar ao espaço periplasmático, por ser capaz de se ligar à peptidoglicanos da parede celular de Gram-positivos, mas não de Gram-negativos.

À vista dos resultados resolveu-se conhecer melhor a peçonha bruta da *Philodryas nattereri*, mediante as técnicas de DNA recombinante, uma poderosa ferramenta para o estudo da genética de qualquer organismo pelo

isolamento do DNA de praticamente qualquer gene. Um gene particular pode ser isolado e produzido em grandes quantidades por meio de clonagem, e sua informação genética pode ser lida pelo sequenciamento. Pode-se concluir que a biblioteca de cDNA da glândula da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* exibe um resultado condizente com o de outras serpentes botrópicas já estudadas por outros pesquisadores.

Na tentativa de encontrar um método alternativo ao isolamento e à purificação de proteínas de peçonha de serpentes, foram realizadas a amplificação e a clonagem de cDNA isolado da glândula de peçonha da serpente *P. nattereri*, que apresenta genes de vários pares de bases. Estes genes codificam proteínas de vários resíduos de aminoácidos, com massa molar e ponto isoelétrico (GALLAS e SILVEIRA, 2011).

A expressão dos genes foi realizada em *E. Coli*, como corpos de inclusão, seguida de renaturação da proteína à sua estrutura nativa, conforme já observado em vários trabalhos (CHANG *et al.*, 2007; WARD *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003; ROBERTO *et al.*, 2004)

A técnica de RMN é importante para investigação a nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria, uma vez que existem relações muito próximas entre os dados obtidos por ^1H -RMN e o arranjo dos prótons na molécula investigada. Esta técnica vem sendo muito usada fruto das enorme vantagens que possui, nomeadamente a possibilidade de estudar um elevado número de núcleos e em todas as fases (gás, líquido e sólido), elevadas intervalos de temperaturas, técnica não destrutiva e segura (CHAVES, *et al.*, 2004), (OLIVEIRA, 2006).

10 CONCLUSÃO

Com suporte nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- ✓ a peçonha *Philodryas nattereri* possui aproximadamente 80% de proteínas quando comparada à peçonha *Bothrops jararaca*.
- ✓ as alterações renais promovidas pela peçonha da *Philodryas nattereri* ocorreram em todos os parâmetros renais (vasculares e tubulares) estudados em pelo menos uma das concentrações avaliadas;
- ✓ as principais estruturas renais afetadas pela peçonha da serpente *Philodryas nattereri* foram os túbulos renais, provavelmente por ação da peçonha a essas estruturas, além da possibilidade de dano direto às estruturas renais, a diminuição da pressão de perfusão renal colabora para um aumento dos danos aos tecidos renais, uma vez que, *in vivo* e *in vitro*, isso pode representar hipoxia e isquemia, gerando injúria tecidual;
- ✓ a peçonha da *Philodryas nattereri* exerce um efeito citotóxico em cultura de células MDCK e RAW nas maiores concentrações;
- ✓ a atividade vascular da peçonha aparentemente depende do tipo de vaso no qual a toxina age, uma vez que não se verificaram alterações fisiológicas e/ou histológicas em relação aos vasos renais e em anel de aorta;
- ✓ a peçonha bruta de *Philodryas nattereri* demonstrou uma ação hipotensora e bradicárdica, independentemente de ativação de quimioceptores ventriculares do sistema nervoso parassimpático, com bloqueio na condução elétrica cardíaca;
- ✓ a peçonha é capaz de induzir edema de pata dose-dependente, atingindo atividade máxima em duas horas após a inoculação, tendo a possível participação de metaloproteinases e sendo mediado pela via das leucoxigenases (prostaglandinas);

demonstrado pela inibição do efeito com dexametasona e soro anti-bothrops. Entretanto, indometacina mostrou-se ineficaz nesse mecanismo;

- ✓ as contorções abdominais causadas pela peçonha da *Philodryas nattereri* ocorrem muito perto do resultado com ácido acético;
- ✓ a peçonha induz degradação de proteínas musculares não colágenas e miofibrilas totais;
- ✓ a serpente *Philodryas nattereri* tem um número de cromossomos $2n=36$, igual ao da serpente *Philodryas olfersii* também com $2n=36$ cromossomo; pertencendo a mesma família Dipsadidae, antes Colubridae;
- ✓ a peçonha *Philodryas nattereri* exibe potencial antibacteriano, sendo capaz de inibir parcialmente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, pouca inibição *Pseudomonas aeruginosa*, mas não ocorreu nenhuma inibição em *E. coli*;
- ✓ a análise dos transcritos da glândula de peçonha da serpente *Philodryas nattereri* fornece a primeira visão global dos genes transcritos da glândula de peçonha. A análise de ESTs (Expressed Sequenced Tags) ou cDNAs permitiu a caracterização de várias sequências, demonstrando a riqueza e a diversidade de componentes dessa espécie, contribuindo assim para a descrição de novos fármacos, estudos de evolução de toxinas e filogenética das espécies de serpentes, escorpião e abelhas, bioengenharia de toxinas, e outras aplicações depositadas no GenBank;
- ✓ a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear tornou-se um método *standart* em muitos laboratórios. Essa técnica é reconhecidamente a mais importante para a investigação no plano molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria, uma vez que há

relações muito próximas entre os dados obtidos por ^1H -RMN e o arranjo dos prótons na molécula em investigação. Este conhecimento permite-nos prever espectros de moléculas com base apenas na fórmula estereoquímica; propor uma estrutura para uma molécula desconhecida baseando-se apenas no seu espectro; decidir entre várias estruturas possíveis para uma molécula, com suporte no espectro obtido, ou, pelo menos, um limite de várias possibilidades. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica que vem sendo muito usada, fruto das enormes vantagens que possui, nomeadamente a possibilidade de estudar um elevado número de núcleos e em todas as fases (gás, líquido e sólido), elevados intervalos de temperaturas, técnica não destrutiva e segura.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. Tradução da 5ª edição. Elsevier, 2005.
- ACOSTA DE PÉREZ, O.; LEIVA, L. C.; PEICHOTO, M. E. MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; REY, L. 2003b. Hemorrhagic activity of the Duvernoy's glands secretion of the Xenodontine Colubrid *Philodryas patagoniensis* from the northeast region of Argentina. **Toxicon**, 41: 1007-1012.
- ALBEDA, S.M. & BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. **ASEB (Fed. Am. Soc. Biol. J.)**, 4: 286-290, 1990.
- AMARAL, A. Últimos trabalhos inéditos de J. Florencio Gomes: Duas novas espécies de Colubrídeos opisthoglyphos brasileiros (*Philodryas oligolepis* e *Apostolepis longicaudata*). **Ann. Paul. Med. E Cir. IX**: (7 e 8):157-221, 1921.
- AMARAL, A. Mecanismo e gênero de alimentação das serpentes do Brasil. **Bol. Mus. Biol.** São Paulo 1: 2-4, 1933.
- AMORIN, D.S.; FERREIRA, S.H.; MANÇO, J.C.; TANAKA, A.; SADER, A.A.; CARDOSO, S. Potentiation of circulatory effects of bradykinin by a fator contained in the *Bothrops jararaca* venom. **Cardiology**. V. 50, p. 23-32, 1967.
- ANGELI A., MASERA RG., SARTORI ML., FORTUNATI N., RACCA S., DOVIO A., STAURENGHI A., FRAIRIA R. 1999. Modulation by cytokines of glucocorticoid action. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 876: 210-20.
- ARAÚJO, F.A.A.; SANTALÚCIA, M. e CABRAL, R.F. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. ; HADDAD, V.JR (Ed.). **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 6-12, 2003.
- ARAÚJO, M.E. & SANTOS, A.C.M.C.A. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 30(6): 517-519, 1997.
- ALTTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, DJ (1990). Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.** v. 215, p. 403-410, 1990.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J.. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon** 23: 631-636, 1985.
- BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg Med (Fremantle)**, v. 13, p. 28-36, 2001.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEON, I.R.; BATISTA, I.F.C.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P. B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G.P.; RODRIGUES, V. M., PERALES, J.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, p. 54-65, 2008.

BARBARINI, C.C. **Aspectos Osteológicos e Histológicos do Aparelho de Peçonha dos Ofídios (Reptilia-Squamata-Ophidia)**. Monografia, Departamento de Biologia da Universidade Cidade de São Paulo, São Paulo, 1998, 55p.

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

BARBOSA, A.M.; DO AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**. 42: 515-523, 2003.

BARNES, R.S.K.; CALOW, P. E.; OLIVE, P.J.W. **Os invertebrados, uma nova síntese**. Editora: Athneu. São Paulo, 526 p., 1995.

BEÇAK, W.; BEÇAK, M.L. & NAZARETH, H. 1966. Evolution and Sex chromosomes in Serpentes. **Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.** 33 (1): 151-152.

BLAYLOCK, R. S. (2000) Antibacterial properties of KwaZulu natal snake venoms. **Toxicon** **38**:1529-34.

BERNARDE, P.S. MOURA-LEITE, J.C., MACHADO, R.A.; KOKOBUM, M.N.C. Diet of the colubrid snake, *Thamnodynastes strigatus* (günther, 1858) from Paraná state, Brazil, with Field notes on anuran predation. **Revista Brasileira de Biologia**, 60 (4): 695-699, 2000.

BESSON, J. M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**. **53 (Suppl. 2)**: 1-9. BJARNASON, J.B.; BARISH, A.; DIRENZO, G.S.; CAMPBELL, R.; FOX, J.W. 1983. Kallikrein-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.** **258**, 12566-12573, 1997.

BIGELLI, R. L. C.; BEREZIN, E. N.; MIMICA, M. J. **Avaliação da presença dos genes *lukS-PV* e *lukF-PV* em cepas pediátricas de *Staphylococcus aureus***. Rev. Arquivos Médicos dos Hospitais e das Faculdades de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. 57(2):59-62, 2012.

BJARNASON, J. ; FOX, J.W. Hemorrhagic Toxins Snake Venoms. **J. Toxicol. Toxin Reviews** **7**: 121-209, 1988/89.

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

BOWMAN, R. H. Gluconeogenesis in the perfused rat kidney. **J. Biol. Chem.** 245, 1604-1612, 1970.

BRAIN, S.D. **Immunopharmacology of the Microcirculation**. San Diego, Academic Press, 239p, 1994.

BRAGA, M. D. M. **Avaliação dos efeitos vasculares e renais do veneno da *Bothrops insularis* e de frações isoladas**. 2006. 238 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, 2006.

BRAGA, M. D. M., MARTINS, A. M. C., ALVES, C. D., MENEZES, D. B., MARTINS, R. D., BARBOSA, P. S. F., OLIVEIRA, I. M. S., TOYAMA, M. H., TOYAMA, D. O., DIZFILHO, E. B. S., FAGUNDES, F. H. R., FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. Purification and renal effects of phospholipase A2 isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon** 51: 181-190, 2008.

BRASIL. Ministerio da saude. **Manual de diagnostico e tratamento de acidentes por animais peconhentos**. Brasilia, 2001.

BRUCE, A. **Fundamentos da Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 2011, 844 p.: il. Color.; 28 cm + 1 DVD. ISBN 978-85-363-2442-2. 1 Biologia. 2. Biologia Celular.

BURDMANN, E. A.; WORONIK, V.; PRADO, E. B.; ABDULKADER, R. C.; SALDANHA, L. B., BARRETO, O. C.; MARCONDES, M. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n.1, p. 82-88, 1993.

BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford: Blackwell, 1992.

CABRAL, G. A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sciences** 77: 1669-1710. 2005.

CÂMARA, C.C. **Estudo dos efeitos antinociceptivos, comportamentais e regenerativos do tratamento com gabapentina em modelo experimental de dor neuropática**. 2009. 227 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CAMPBELL, N. **Biologia**. N eil A. Campbell, Jane B Reece; tradução: Anne D. Vilela...[et al] – 8a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

CARNEIRO DA COSTA, et al. Comp. Biochem Physiol e Toxicol Pharmacol. 148(1):31-38. Ação Neuromuscular Dependente de CK. Rio Grande do Sul, 2008.

CASTRO, I. Study of toxicity of crotalic and botropic species in afidic accidents, with an emphasis in renal toxicity. **O mundo da saúde** 30(4):644-653, 2006.

CERRAREZZI, H. Uma Sinopse dos Gêneros e Classificação das Serpentes (Squamata) : I Scolecophidia e Alethinophidia não Colubrídeos. **Herpetologia no Brasil** 1: 69-80, 1994.

CHANG, H.Y.; CHENG, C.L.; CHEN, J.J.; de GROAT, W.C. Serotonergic drugs and spinal cord transections indicate that different spinal circuits are involved in external urethral sphincter activity in rats. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 292, n. 3, p. F1044-105353, 2007.

CISCOTTO, C. J.; MACHADO de AVILA, R. A.; COELHO, E. A.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; de CARVALHO, M. A.; MARIA, W.S.; SANCHEZ, E.F.; BORGES, A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of na L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n.3, p. 1050-1055, 1992.

CISCOTTO, P.; AVILA, R. A. M.; COELHO, E.A.F., *et al.* Antegenic, miocrobicidal and antiparasitic propests of an L-amino ancid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. 53, 330-340, 2009.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M., TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon** 39: 1173-1181, 2001.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V. WHITE, J. 1991. Snake venoms variability:methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29 (11): 1279-1303.

COHEN, J. J.; KOOK, Y. J.; LITTLE, J. R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 266, n.1, p. 103-121, 1977.

COLLARES-BUZATO, C. B.; LE SUER, L.P.; CRUZ-HOFLING. M. A. Impairment of the Cell-to-Matrix Adhesion and Cytotoxicity Induced by *Bothrops moojeni* Snake Venom in Cultured Renal Tubular Eputhelia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 181, p. 124-132, 2002.

CORNELIUS, F. T. M. **Atividade Biológicas e Identificação dos Constituintes Químicos Isolados das Espécies Vegetais: *Plumeria lancifolia* Müll. Arg. (Apocynaceae) e *Solanum crinitum* Lam. (Solanaceae) e Identificação da Acetanilida Exsudada por *Xenohyla truncata* (IZECKSOHN, 1998).** Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Exatas do Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

CORREIA, J.M.M. e ZULIAM, A. Imunidade relacionada a resposta alérgica no início da vida. **Jornal de Pediatria**. v. 77, n. 6, p. 441-6, 2001.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, 33: 31-39, 1995.

CHAVES, H. M; BARBOSA, A.S.; NETO, M.M.J.; PIMENTEL, S.; LAGO, G.H.J. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Streculia striata* St. Hil. Et Naud. **Revista Química Nova**. Vol. 27. no. 3, São Paulo, 2004.

COSTA, T. **Estrutura da comunidade de Serpentes de uma área de Caatinga do Nordeste Brasileiro**. 2006. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, 2006.

COTTA, G.A. (Eds.), **Herpetologia no Brasil, I**. PUC-MG; Fundação Biodiversitas e Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, p.69-80, 1994a.

COTTA, G.A. (Eds.). Uma sinopse dos gêneros e classificação das serpentes (Squamata) II. Família Colubridae. In: , L. B.; BERNARDES, A.T.; COTTA, G.A. (Eds.), **Herpetologia no Brasil, I**. PUC-MG; Fundação Biodiversitas e Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, p.81-91. 1994b.

CUPO, P.; MELLO DE OLIVEIRA, J.A.; HERING, S.E.; AZEVEDO-MARQUES, M.M. Miopathology in human striate muscle in *Crotalus* envenomation: a clinical and histoenzymologic study. In: (WEGMANN, R.J. ; WEGMANN, M.A. eds) **Recent Advances in Cellular and Molecular Biology**, vol.5, p.45-50. Peeters Press, Leuven, Belgium, 1992.

DA SILVA, C.J. JORGE, T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, n. 2, p. 251-255, 2003.

DAMICO, D. C. S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B.; PONCE-SOTO, L. A., JOAZEIRO, P.P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONIA, S.; COLLARES-BUZATO, C. B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmRX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v. 49, p. 678-692, 2007.

DEUTSCH, H. F. & DINIZ, C. R. 1955. Proteolytic activities of snake venoms. **J. Biol. Chem.** **216**: 283-288.

Detwiler, K. M.; Burrell, A. S.; Jolly, C. J. Conservation implications of hybridization in African cercopithecine monkeys. **International Journal of Primatology**. v.26. Chicago: 2005, p. 661684.

DIAZ, F.; NAVARRETE, L.F.; PEFAUR, J.; RODRIGUEZ- ACOSTA, A. **Rev. Inst. Med. Trop.** S. Paulo, 46(5): 287-290, 2004.

DOAK, G. J. and SAWY NOK, J. 1997. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience.**, **80 (3)**: 939-949.

DU, XY e CLEMETSON, KJ. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659-665, 2002.

DUMÉRIL, A. M. C.; BIBRON, G. **Erpétologic Générale**, 7 atlas, 1834-54, 1854.

DUSSE, L.M.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. **Revisão sobre Óxido Nítrico**. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39 (4): 343-350, 2003.

ERD, F.; TRK, K.; ARNYI, P.; SZKELY, J.I. 1993. A new assay for antiphlogistic activity: zymosan induced mouse ear inflammation. **Agents Actions**, **39**: 137-142.

ESTES, R.; QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J. Phylogenetic relationships within Squamata. In: **ESTES, R.; PREGILL, G. Phylogenetics relationships of the Lizard families**. Essays Commemorating Charles L. Camp. Stanford, California: Stanford University Press, 1988. p. 199-281.

FARSKY, S. H. P.; GONÇALVES, L. R. CURY, Y. Characterization of local tissue damage evoked by *Bothrops jararaca* venom in the rat connective tissue microcirculation: an intravital microscopy study. **Toxicon**, **37**: 1079-1083, 1999.

FENWICK, A. M., GUTBERLET JR R. L.; EVANS J. A.; PARKINSON C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool j Linn Soc.**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A. C. Using bradykinin-potentiating peptide strues to develop new antihypertensive drugs. **Genet. Mol. Res.** 3: 554-63, 2004.

FERRAREZZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das serpentes (Squamata) II. Scolecophia e Alethinophidia não colubrídeos. In: NASCIMENTO, L. B.; BERNARDES & Cotta, G. A (Eds) Herpetologia no Brasil, 1 Buc-MG, Fundação Biodiversitas e Fundação e Zequiél Dias. p.81-91, 1994.

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

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Brit. J. Pharmacol.** 24: 163-169, 1995.

FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; RABERMEUL, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V, from *Bothrops Neuwied* venom. **J Protein chem.**, v. 17, p. 285-289, 1998.

FERREIRA, B.L.; SANTOS, D.O., SANTOS, A.L.; RODRIGUES, C.R.; DE FREITAS, C.C.; CABRAL, L.M.; CASTRO, H.C. Comparative Analysis of Viperidae Venoms Antibacterial Profile: a Short Communication for Proteomics. **Evid Based Complement Alternat Med.** [Epub ahead of print], 2008.

FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., CORREIA, F.M.A. 1978. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, **53**: 39.

FERREIRA, L. A.; HENRIQUES, O. B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M. B. C.; PREZOTO, B. C.; ANDREONI, A. S. S.; ZERNIK, R.; HABERMEHL, C. A new bradykinin – potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 30, p. 33-40, 1992.

FERREIRA, S.H.; BARTELD, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583-2595, 1970.

FERREIRA, M.L. 2000. ***Thalassophryne nattereri* (niquim): Do veneno à Terapia.** Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 176p.

FERREIRA, S.H. 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature New Biol.**, **240**: 200-203.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Nitric Oxide: The Simple Messenger Passing Through Complexity. Metabolism, Synthesis and Function. Rev, Assoc. Bras., 46(3): 265-271, 2000.

FLOWER, R.J. 1989. Glucocorticoids and the inhibition of phospholipase A₂. In: **SCHELMER, R.P.; CLAMOR, H.N. ORONSKY, A.L. editors. Antiinflammatory Steroid Action Basic And Clinical Aspects.** New York: Academic Press, 48-66.

FONTELES, M. C.; COHEN, J. J.; BLACK, . J.; WHERTHEIN, S. J. Support of kidney function by long-fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 244, p. 235-246, 1983.

FOWLER, I. R.; SALOMÃO, M. G. A study of sexual dimorphism in six species from the colubrid snake genus *Philodryas*. **Snake** 26: 117-122, 1994.

FRANCIS, B. R.; WILLIAMS, E. S.; SEBART, C.; KAISER, I. I. Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. **Toxicon** 31: 447-458, 1993.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. ; HADDAD, V. JR. (Ed.) **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 13-32, 2003.

FRIEDERICH, C. ; TU, A.T. Role of metal in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochemistry** 18(4): 678-684, 1971.

FUNASA. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos.** Brasília, Outubro, 2001.

FURTADO, M. F. D; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R; ROCHA, M. M. T. Sexual Dimorphism em Venon the Bothrops Jararaca (Serpentes Viperidae). **Toxican** v. 48, p. 401-410, 2006.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cell in the relaxations of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GALLAS, M.; SILVEIRA, E.F. Mesocestoides SP. (Eucestoda, Mesocestoididae) parasitizing four species of wild felines in Southern Brasil. Rev. Bras. Parasitol Vet. 20: 168-170, 2011.

GIRARDI, G. Os boticários da fauna brasileira. **O Estado de São Paulo**, 2007.

GIULIANO, F., WARNER, T.D., 2002. Origins of prostaglandin E₂: involvements of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) in human and rat systems. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **303**: 1001–1006.

GOMES, V.M.; CARVALHO, A.O.; DA CUNHA, M.; KELLER, M.N.; BLOCH Jr. C.; DEOLINDO, P.; ALVES, E. W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 45, p. 817-827, 2005.

GOULD, R. J. ;POLOKOFF, M. A. ; FRIEDMAN, P. A. ; HUANG, T. F. ; HOLT, J. C.; COOK, J. J. ; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 195: 168-171, 1990.

GRAZZIOTIN, F. B.; ZAHER, H. ; FERRAREZZI, H.; KLACZKO, J.; BONATTO, S. L.; WILKINSON, M. Higher. Level molecular phylogeny of snake: conflicts and congruence. **Darwiana** 45: 17-19, 2007.

GREENE, H. W. **Snakes: the Evolution on Mystery in Nature**. Berkeley: University California Press. 1997, 351p.

GUIMARÃES, J. A.; VIEIRA, M. A. R.; CAMARGO, M. J. F.; MAACK, T. Renal vasoconstrictive effect of kinnins mediated by B1 – knnin receptors. **Eur. J. Pharmacol**, v. 130, p. 177-185, 1986.

GUIMARÃES, A.Q.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FERREIRA DE ARAÚJO, P.M.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. 2004. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm. Res.** **53**: 284-291.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. ; LOMONTE, B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. JR. (ED.). **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 310-323, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. ; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33(11): 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, a review. **Mem. Inst. Butantan** **51(14)**: 211-233.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los Peçonhas de serpientes: 50 anos de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.** **50(2)**: 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENE, J. A.; LOMONTE, B.; CAMACHO, Z. ; SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon** 27(7):735-45, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; DA SILVA, N. J.; NUÑEZ, J. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). **Toxicon** 30: 1299-1302, 1992.

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

GYGAX, P. Development, morphology and function of the venom gland (Duvernoy's gland) of *Natrix tessellata*. **Acta Trop.** 28(3): 226-274, 1971.

HANCOCK, R. E.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proc Natl Acade Sci USA. V.97, p. 8856-8861, 2000.**

HARTMANN, P. A. ; MARQUES, O. A. V. Diet and habitat use two sympatric species of *Philodryas* (Colubridae), in south Brazil. **Amphibia-Reptilia** 26: 25-31, 1971, 2005.

HANSON, R. W.; BALLARD, F. J. Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of commercial serum albumin. **Journal of Lipid. Research**, v. 9, p. 667- 668, 1968.

HARVEY, A. L.; BRADLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; ROWAN, E. G.; PRATT, J.A.; QUILLFEDT, J.A.; JERUSALINSKY, D.A. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1635-1640, 1998.

HAVT, A. FONTELES, M. C., MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* and the role of PLA₂ and PAF Blockers. **Toxicon** 39: 1841-1846, 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.; BOSCHEIRO, A. C.; CARNEIRO, E.M.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.37, n. 1, p. 130-141, 2005.

HAVT, A., TOYAMA, M. H., NASCIMENTO, R. R. F., TOYAMA, D. O., NOBRE, A. C. L., MARTINS, A. M. C., BARBOSA, P. S. F., NOVELLO, J. C., JORGE, A. R. C., ALVES, R. S., NORÕES, T. B. S., SOUSA, D. F., XIMENES, R. M., OLIVEIRA, I. M. S., SILVA NETO, A. G., ARAÚJO LIMA, A. L. G. C., NOJOSA, D. M. B., MONTEIRO H. S. A. Estudo dos efeitos biológicos do veneno da serpente *Bothrops lutzi* em rim isolado de rato. **40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2008.

HEINRICH, E. L.; WELTY, L. A. Y.; BANNER, R. R.; OPPENHEIMER, S. B.; Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta histochemia**, v. 107, p. 335-3. 2005.

HILL, R.E. & MACKESSY, S.P. 2000. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. **Toxicon** **38**: 1663-1687.

HO, C.L.; HWANG, L.L.; CHEN, C.T. 1993. Edema-inducing activity of lethal protein with phospholipase A1 activity isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon** **32**: 605-613.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & GIGLIO, J.R. 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of Bothropstoxin. **Toxicon** **26(7)**: 615-627.

HOSSAM Z.; GRAZZIOTTON, G. F.; CADLE, G. J; ROBERT W. MURPHY; MOURALEITE, J. C.; BONATTO, S. L. Molecular Phylogeny of advanced snakes (serpentes, caenophedia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. **Papeis avulsos de zoologia**. São Paulo. Vol. 49 N^o. 11, 2009.

HORTSMANN, P. A.; MARQUES, O. A. V. Diet and Habited use of two Sympatric Philodryas (Colubridae) in South Brasil. **Amphibia – Reptilia** **26**: 25-331, 2005.

HOURANI, S. M. and CUSACK, N. J. 1991. Pharmacological receptors on bloods platelets. **Pharmac. Rev.**, **43**: 243-298.

IWANAGA, S. & SUZUKI, T. 1979. Enzymes in snake venom. **In**: LEE, C.Y. (Ed.). **Snake Venoms**. Berlin, Springer-Verlag, p. 61.

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.L.; SANTANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SCARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, n. 20, p. 7034-7043, 2006.

JANEWAY, C.A. & TRAVERS, P. 1994. The immune system in health and disease. **In**: **Immunobiology**. New York: Ed. Current Biology/ Garland Publishing. P.12-16.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C. Haemostatic changes caused by venoms of South American snakes. **Toxicon** **27**: 955-963, 1989.

KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I.S. South american snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, **14**: 359-374, 1995.

KAMIGUTI, A. S.; RUGMAN, F. P.; THEAKSTON, R. G. D.; FRANÇA, F. O. S.; ISHII, H.; HAY, C. R. M. and B. I. A. S. G. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. **Thromb. Haemost.** **67**: 484-488, 1992.

KAMIGUTI, A. S.; SLUPSKY, J. R.; ZUZEL, M.; HAY, C. R. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb. Haemost.**, **72(2)**:244-9, 1994.

KARDONG, K.V. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, 21: 1-19, 2002.

KATORI, M.; ODA, T.; NAGAI, K. 1990. A site of action of dexamethasone on leukocyte extravasation in microcirculation. **Agents Actions** 29: 24-26.

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

KOCHVA, E. The development of the venom gland in the opisthoglyph snake *Telescopus fallax* with remarks on *Thamnophis sirtalis* (Colubridae, Reptilia). **Copeia** 1965(2): 147-154, 1963.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KOWAL-VERN, A.; WLANGA, J.M.; SHAPR-PUCCI, M.; HOPPENSTEADT, D.; GAMELLI, R.L. 1997. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endothelin-1, and C1 esterase inhibitor. **J. Burn Care Rehabil.**, 18: 99-103.

KOZOLOWISKI, G.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P. Methyl jasmonate protects Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] seedlings against *Pythium ultimum* Trow. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, n.1, p. 53-58, 1999.

KPH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELON, K. Snake Venom Components and their Applications in Biomedicine. Cellular and Molecular. **Life Sciences**. 63: 3030-3041, 2006.

KUCH, U. & MEBS, D. Envenomations by Colubrid Snakes in Africa, Europe, and the Middle East. **J. Toxicol.-Toxin Reviews.**, 21: 159-179, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LAVICH, T.R., CORDEIRO, R.S., CALIXTO, J.B., SILVA, P.M., MARTINS, M.A., 2003. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 462: 185-192, 2003.

LEE, C. Y. ; LEE, S. Y. Cardiovascular effects of snake venoms. In: LEE, C. Y. (Ed). **Handbook of Experimental Pharmacology: Snake Venoms**. Berlin, Springer-Verlag. v. 52 cap. 15 p. 547-556, 1979.

LEE, C.Y.W.; BURNET JR., J. C. Natriuretic peptides and therapeutic applications. **Heart Failure Reviews** 12(2) : 131-42. 2007.

LEE, M. S. Y. ; CALDWELL, M. W. Anatomy and relationships of *Phachyrhachis proplematicus*, a primitive snakes with hindlimbs. **Phil. Trans. R. Soc. London** 352B: 1521-1552, 1998.

LEE, M. S. Y. ; SCANLON, J. D. The Cretaceous marine squamate *Mesoleptos* and the origin of snakes. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond (Zool.) 68(2)**: 131-142, 2002.

LEE, M.S.Y. The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. **Phil. Trans. R. Soc. London 352B**: 53-91, 1997.

LEE, M.S.Y. Convergent Evolution and Character Correlation in Burrowing Reptiles: Towards a Resolution of Squamate Relationships. **Biol. J. Linnean Soc. 65**: 369-453, 1998.

LEE, M. S. Y.; HUGALL, A. F.; LAWSON, R.; SCANLON, J. D. Phlogeny os snakes (Serpentes): combining morphological and molecular data in likelihood, Bayesian and parsimony analyses. **Sustematics and Biodiversity**, 5(4): 371 – 389. 2007.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Lund, v. 52, n.2, p. 201-220, 1964.

LEWIS, B.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews – Drug Discovery**. 2:790-802, 2003.

LOMONTE, B. **Tissue damage and inflammation induced by snake venoms**. Dissertation for degree of Doctor of Phylosophy. University of Göteborg, Göteborg, 87p. 1994.

LOPES, L.F.L. **Salmonella sp em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: freqüência de isolamento, caracterização dos isolados e as conseqüências para o manejo em cativeiro e reintrodução**. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 123p, 2008.

LOPES, H.P. **Alterações Locais Induzidas pela Secreção Tóxica de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae)**. Dissertação de Doutorado do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MACKESSY, S.P. 2002. Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. **J. Toxicol.-Toxin Reviews**, 21: 43-83.

MANDELBAUM, F.R. & ASSAKURA M.T. 1988. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 26(4): 379-85.

MARQUES, O.A.V.; ETEROVIC, A.; SAZINA, I. **Serpentes da Mata Atlântica: Guia Ilustrado para Serra do Mar**. Holos, Ribeirão Preto, 184p. 2001.

MARQUES, O.A.V.; SAWAYA, R. J., STENDER – OLIVEIRA, F & FRANÇA, F. G. R.. Ecology of the colubrid snake *Pseudablades agassizii* in south – eastern south America herpetological Journal 16(1) : 37 – 45, 2006.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; STAWROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARA, N.; SUKI, W. N.; EKNOYAN, G.. Renal effects of Lithium administration in rats: alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. **J, Lab. Clin. Med.**, 80(3):445-4611, 1978.

MEBS, D.; SCHARRER, I.; STILLE, W. & HAUKE, H. 1978. A fatal case of snake bite due to *Thelotornis kirtlandii*. In: ROSENBERG, P. (Ed.). **Animal, Plant and Microbial Toxins**. Pergamon Press, 16: p. 477-479.

MESQUITA, P.C.M.D.; **História Natural das Serpentes *Oxybelis Aeneus* (Wagler, 1824) (Squamata, Colubridae) e *Philodryas nattereri* Steindachner, 1870 (Squamata, Dipsadidae) em Domínio de Caatinga no Estado do Ceará**. Fortaleza-Ce, 2010.

MESQUITA, P.C.M.D.; NOJOSA, D. M. B.; PASSOS, D. C.; BEZERRA, C. H.. **Ecology of *Philodryas nattereri* in the Brazilian semi-arid region**. Herpetological Journal 21: 193-198, 2011.

MITCHELL, J.A., LARKIN, S., WILLIAMS, T.J., 1995. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. **Biochem. Pharmacol.**, 50: 1535- 1542.

MOURA-DA-SILVA, S.M.; DESMOND, H.; LAING, G. & THEAKSTON, R.D.G. 1991. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon** 29 (6): 713-723.

MONTEIRO, H. S. A. & FONTELES, M. C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. **Pharmacology and Toxicology** 85: 198-200, 1999.

MORAIS, I. C. O. **Estudo dos efeitos renais e mecanismos de morte celular induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus***. 2011. 107 p. Dissertação (Mestrado Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MOREAU, M.E.; GARBACHI, N. MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein-Kinin system: Current and future pharmacological targets. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 99, p. 6-38, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J, Immunol. Methods**, v 65, n.1/2, p. 55-63, 1983.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; LAING, G.D.; PAINE, M.J.; DENNISON, J.M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D. Processing of protumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.** 26(9): 1996.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, A.R. Thrombin-like and factor X – activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemostasis** 41: 314-328, 1979.

NASCIMENTO Jr., E.B.; COSTA, K.A.; BERTOLLO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; ROCHA, L.T.S.; SOUZA, A.L.S.; GLÓRIA, M.B.A.; MORAES-SANTOS, T.; COELHO, M.M. Pharmacological investigation of nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon** 45: 585-593, 2005.

NASCIMENTO, J. C.; BLOCH JR, C. Pesquisa: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento **Ressonância Magnética Nuclear: Gradus Primus**. No. 21, 2001.

NAUMANN, G.B.; SILVA, L.F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C.M.F.; NAVDAEV, A.; REXENDE, F.F.; EBLE, J.A.; SANCHEZ, E.F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2011.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; SANTANA, G.M.S.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; LIRA-DA-SILVA, R.M., SILVA-LUCCA, R.M.; OLIVA, M.L.V.; GUARNIERI, M.C.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 57-63, 2011.

NICKERSON, A.M.; HENDERSON, R.W. A case of envenomation by the South American colubrid *Philodryas olfersii*. **Herpetologica** 32(2):197-198, 1976.

NIZET, A. The isolated perfused kidney: possibilities, limitations and results. **Kidney Int.**, v. 7, n.1, p.1-11, 1975.

NÚÑEZ *et al.*, Snake Venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* etc. OVADIA, M. 1984. Embryonic development of Duvernoy's gland in the snake *Natrix tessellata* (Colubridae). **Copeia**. 1984: 516-521, 2009.

OLIVEIRA, S. I. **Ressonância Magnética Nuclear: Uma Tecnologia para a Computação Quântica**. WECIQ Mini Cursos 6 (Parte 1), 2006.

OLIVO, R.A.; TEIXEIRA, C.F.P.; WALLACE, J.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. 2007. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, **49(5)**: 670-677.

OSBORN, L. 1990. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell.**, **62**: 3-6, 1990.

OVADIA, M. Embryonic development of Duvernoy's gland in the snake *Natrix tessellata* (Colubridae). **Copeia** **1984**: 516-521, 1984.

PASSOS, P. CISNEROS-HEREDIA, Diego Francisco, RIVERA, Dani Enrique, AGUILAR, Cesar & Schargel, Walter. 2012. Rediscovery of *Atractus maicrorhynchus* and reappraisal of the taxonomic status of *A. emersoni* and *A. natans*. **Herpetologica** **68**:375-392, 2012.

PAIOLI, S.F. **Efeito Citotóxico de Crotoxina em Células de Melanoma Murino e Fibroblastos**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação Interunidades em

Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT) – Universidade São Paulo. São Paulo, 39p, 2011.

PARADA, C.A.; TAMBELLI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formaline-induced nociception. **Neurosci.**, **102**: 937-9444.

PEICHOTO, M.E.; ACOSTA, O.; LEIVA, L. TEIBLER, P.; MARUÑAK, S.; RUÍZ, R. 2004. 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**, **44**: 589-596.

PEICHOTO, M.E.; LEIVA, L.C.; GUAIMÁS MOYA, L.E.; REY, L.; ACOSTA, O. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: effects on blood coagulation. **Toxicon**, **45**: 527-534, 2005.

PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.P.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ J.M. 2000. Increment in serum cytokine and nitric oxide in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, **38**: 1253-1266.

PINHO, F. M. O., PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n.1, p. 24-9, 2001.

PEREIRA, I. D.; PINHO, F. M. O. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 47, p. 24-29, 2001.

PORTANOVA, J.P., ZHANG, Y., ANDERSON, G.D., HAUSER, S.D., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., GREGORY, S.A., ISAKSON, P.C., 1996. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J. Exp. Med.**, **184**: 883–891.

POUCH, H. F.; ANDREWS, M.R; CADLE, E.J; CRUMO, L.M; SAVITZKY, H.A; WELLS, D.K. **Herpetology**. New Jersey, 1998.

PRIANT-JR, A.C.G.; RIBEIRO, W.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; RODRIGUES-SIMONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; LEITE, G.B.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**, v. 41, p. 595-603, 2003.

PUORTO, G.; FRANÇA, F.O.S. Serpentes não peçonhentas e aspectos clínicos dos acidentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD, V.JR. (Eds.). **Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed. Sarvier, São Paulo, , p. 108-114, 2003.

RAMSEY, H.W.; TAYLOR, W.J.; BORUCHOW, I.B.; SNYDER, G.K. Mechanism of shock produced by an elapid snake (*Micrurus f. fulvius*) venom in dogs. **Am. J. Physiol.** **222(3)**: 782-786, 1972.

RANG e DALE. Farmacologia/H P. Rang... [et al]; [tradução de Raimundo Rodrigues Santos e outros]. – Rio de Janeiro: Elsevier. Tradução de: Pharmacology, 6 th ed. Apêndices ISBN 978-85-352 – 2243-2, 2007.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C**, 142/3-4: 328-346, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M. e RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 Ed. Guanabara Koogan 703p, 2007.

RANKIN, J.A. 2004. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical issues**, 15(1): 03-17.

RIBEIRO, L.A., PUORTO, G., JORGE, M.T., Bites by the colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. **Toxicon**, 37: 943–948, 1999.

RIEPPPEL, O.; ZAHER, R. The intermandibular joint in squamates, and the phylogenetic relationships of the fossil snakes *Pachyrhachis problematicus* Hass. **Fieldiana Geology**, 43: 1-36, 2000.

RIEPPPEL, O. ; ZAHER, R. Re-building the bridge between mosasaurs and snakes. **N. Jb. Geol. Paläont. Abh.**, 221(1): 111-132, 2001.

RIEPPPEL, O. The classification of the Squamata. In: BENTON, M. editor. **The phylogeny and classification of Tetrapods. Vol. I Amphibians, Reptiles, Birds. Systematics Association Special Volume nº 35A**. Oxford: Claredon Press: 261-293, 1988a.

RIEPPPEL, O. A review of the origin of snakes. In: HECHT, M.K.; WALLACE, B.; PRANCE, G.T. (Eds.). **Evolutionary Biology**. Plenum Press: New York. Vol. 22: 37-130, 1988b.

ROBETO, P.G.; KASHIMA, S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S., NOMIZO, A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* venom. **Protein J.**, v. 23, p. 273-85, 2004.

ROCHA, M. M. T.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R. e SATO, C. Reports of Human Snake Accidents Caused by *Philodryas olfersii*. **Mem. Inst. Butantan**, 60:142, 2003.

ROCHA, M. L., VALANÇA, R. C., MAIS, M. B. S., GUARBIERI, M. C., ARAUJO, I. C., ARAUJO, D. A. M. Pharmacokinetics of the venom of *Bothrops erythromelas* labeled with ¹³¹I in mice. **Toxicon** 52:526-529, 2008.

ROCHA, I.C.A. **Estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos no estado do Ceará**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, 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.**, **156**: 261-273, 1949.

ROCHA, M. M. T. **Estudo comparado dos Peçonhas de *Philodryas offersii* (Lichtenstein, 1823) e *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (SERPENTES: COLUBRIDAE)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005. 144p.

ROCHA, M. M. T.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; TAMBOURGI, D. V.; FURTADO, M. F. D. Duvernoy's gland secretion os *Philodryas offersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). **Toxicon**, **47**: 95-103, 2006.

ROCHA, M.M.T. & FURTADO, M.F.D.. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas offersii* (Lichtenstein) e *Philodryas patagoniensis* (Girard) (Serpentes Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, **24(2)**: 410-418, 2007.

ROCHA, M. T., FURTADO, M.F.D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Dulmériil, Bibron & Dumeril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia** **22(2)**: 383-393, 2005.

ROSS, B. D. The isolated perfused kidney. **Clin. Sci. Mol. Ed. Suppl.**, v.55, n. 6, p.513-521, 1978.

SAADI, S.; WRENSHALL, L. E.; PLATT, J. L. Regional manifestations and control of the immune system. **Faseb J.** **16(8)**: 849-856, 2002.

SALOMÃO, M.G.; ALBOLEA, A.B.P.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. 2003. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpet. Review**, **34(4)**: 307-312, 2003.

SCOUBAS, P.; KING, G.F. Venomics as a drug discovery platform. **Proteomics**, v. 6, n. 2, p. 221-224, 2009.

SALOMÃO, M.G.; ALBOLEA, A.B.P.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. 2003. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpet. Review**, **34(4)**: 307-312.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; CHOW, T. K. V.; BOW, H.; YAP, E. H.; THONG, T. W. J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 150-159, 2007.

SAZIMA, I. ; HADDAD, C. F. B. Répteis da Serra do Japi: Notas sobre a história natural. In: MORELLATO, L. P. **História Natural da Serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma área Florestal no Sudeste do Brasil**. FAPESP, Campinas, p. 212-237, 1992.

SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brazilian reptiles list of species. Disponível em: <http://www/sbherpetologia.org.br>. Acessado em 07/06/2010.

SCANLON, J. D.; LEE, M. S. Y.; CALDWELL, M. D.; SHINE, R. The paleoecology of the primitive snake *Pachyrhachis*. **Hist., Biol.** **13**: 127-152, 2010.

SCHENOME, H. & REYES, H. 1965. Animales ponzonosos de Chile. **Bol. Chil. Parasitol.**, **20**: 104-108, 1965.

SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S; CUNHA, O.A.B. DE SOUZA, G.E.P. & GIGLO, J.R. 1990. Isolation and characterization of hemorrhagic, mynecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca Ilhoa) snake venom. **Toxicon** **28(3)**: 261-273.

SILVA, JR., N.J.; SITES, JR., J. W. 1999. Reviurus of the *Micrurus frontalis* complex (serpentes Elapidae). **Herpetological Monographs**. **13**:142-194, 1999.

SILVA, V. X.; RODRIGUES M. T. Taxonomic revisiono f the *Bothrops neuwiedi* complex (serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa** **7(1)**: 45-90, 2008.

SILVA, M. V. & BUONONATO, M. A. 1983/84. Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. **Mem. Inst. Butantan**, **47/48**: 121-126.

SILVEIRA, L. B. **Caracterização Funcional e Estrutural de uma Nova Fosfolipase A₂ Ácida de Bothrops Moojeni**. Ribeirão Preto, 98 p.:11; 30 cm, 2011.

SILVEIRA, P.V.P.; NISHIOKA, S.A. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in a brazilian teaching Hospital. Analysis of 91 cases. **Rev. Inst. Trop.** S. Paulo, **34**: 499-503, 1992.

SINAN – **Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Animais peçonhentos**. Acessível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo>. Consultado em 18/03/2011.

SINAN, Sistema de Informações de Agravos de Notificação. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idxt=21383. Acesso em 20 de março de 2011.

SITPRIJA, V. Snakebite nephropathy. **Nephrology** **11**:442-448, 2006.

SMITH, C.J., ZHANG, Y., KOBOLDT, C.M., MUHAMMAD, J., ZWEIFEL, B.S., SHAFFER, A., TALLEY, J.J., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., ISAKSON, P.C., 1998. Pharmacological analysis of cyclooxygenase- 1 in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **95**: 13313–13318.

SOARES, A. M. Toxinologia e Biossegurança : Aplicações Biotecnológicas de Toxinas Naturais e Modelos Sintéticos. 2005. Disponível em: http://sistemas.usp.br:8080/fenixweb/fex_disciplina?Sgldis=60458245. Acesso em: 19 fev. 2007.

SOARES, A. M. Toxinologia e Biossegurança. **Aplicações Biotecnológicas de Toxinas Naturais e Modelos Sintéticos**. 2005. Disponível em:

<http://sistemas.usp.br.8080/fenixweb/fexDisciplina?sgldis=6045824>. Acesso em: 19 de fev. 2007.

SOARES DE MOURA, R.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; CARVALHO, L.C.R.M. 1998. Pharmacological aspects of mouse hind paw edema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon** **36**: 771-780.

SOUSA, D.F.; BRITO, T.S., BATISTA-LIMA, F.J., JORGE, A.R.C., FERREIRA, J.M., CHAGAS, J. F., PRACIANO, T.P., NORÕES, T.B., XIMENES, R.M., ALVES, C.D., BORGES-NOJOSA, D.M.M MAGALHÃES, P. J. C., MONTEIRO, H.S.A. Bothrops lutzi venom promotes relaxation on isolated rat aorta. **XVI World Congress of the International Society on Toxinology**, 2009a.

SOUSA, D.F.; BRITO, T.S., BATISTA-LIMA, F.J., JORGE, A.R.C., FERREIRA, J.M., CHAGAS, J. F., PRACIANO, T.P., NORÕES, T.B., XIMENES, R.M., ALVES, C.D., BORGES-NOJOSA, D.M.M MAGALHÃES, P. J. C., MONTEIRO, H.S.A. Bothrops lutzi venom promotes relaxation on isolated rat aorta. **XVI World Congress of the International Society on Toxinology**, 2009b.

STABELI, R.G.; MARLUSSI, S. CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of na L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternates* Snake venom. **Bidorg. Med. Chem.**, v. 12, n. 11, p. 2881-2886, 2004.

STILES, B.G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. Antibacterial effects of different snakes venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, p. 1129-1141, 1991.

SUFKA, K. J.; SCHOMBURG, F. M; GIORDANO, J. 1992. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **41**: 53-6.

TAN, N. H. AND SAIFUDDIN, M. N. 1990. Comparative study of the edemainducing activity of snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **97C**: 293-296.

TAILOR, A.; TOMLINSON, A.; SALAS, A.; PANES, J.; GRANGER, D.N.; FLOWER, R.J. 1999. Dexamethasone inhibition of leukocyte adhesion to rat mesenteric postcapillary venules: role of intercellular adhesion molecule 1 and KC. **Gut**, **45**: 705-712.

TAUB, A. M. Ophidian cephalic glands. **J. Morphol.** **118(4)**: 529-542, 1966.

TEDGUI, A. MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circ Res.** v. 88, p. 877, 2001.

TEIXEIRA, C.F.P., CURY, I, OGA, S. and JANCAR, S. 1994. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activation factor (PAF). **Toxicon** **32(4)**: 419-426.

TCHERNOV, E.; RIEPPEL, O.; ZAHER, H.; POLCYN, M. J.; JACOBS, L. L. A fossil snake with limbs. **Science**, **287 (5460)**: 2010-2012.

THEAKSTON, R. D. G. ; A. S. KAMIGUTI. A list animal toxins and some other natural products with biological activity. **Toxicon**, 40: 579-651, 2002.

THEAKSTON, R. D. G; REID, H. A.; ROMER, J. D. Biological properties of the red-necked keel-back snake (*Rabdophis subminiatus*). **Toxicon**, 17: 190, 1979.

TORRES, A.F.C.; DANTAS, R.T.; TOYAMA, M.H.; FILHO, E.D.; ZARA, F.J.; DE QUEIROZ, M.G.R.; NOGUEIRA, N.A.P.; OLIVEIRA, M.R.; TOYAMA, D.O.; MONTEIRO, H.S.A.; MARTINS, A.M.C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p.795-804, 2010.

TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D. de O.; PASSERO, L.F.D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.S.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.S. Isolation os new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

UETZ, P. The TIGR Reptile Database. 2009. Acessível em <http://www.reptiledatabase.org>. **Reserch Center Karlsruhe**. Acessado em 7 de maio de 2009.

UNIVERSIDADE DE MADEIRA. Departamento de Química. Análise Estrutural. **Espectroscopia de RMN**. Duarte Paulo Correia, Fubnchal, abril de 2002.

VANE, J. R. and BOTTING, R. M. 1998. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, **38**: 97-120.

VARGAFITG, B. B.; BHARGAVA, N.; BONTA, I. L. Haemorrhagic and permeability increasing effects of *Bothrops jararaca* and other Crotalidae venoms as related to amine or kinin release. **Agents Actions**, **4**: 163-168, 1974.

VIDAL, N.; S.G. KINDL, A. WONG, S. B. HEDGES. Phylogenetic relationships of xenodontine snakes inferred from 12S and 16S ribosomal RNA sequences. **Molecular and Phylogenetic Evollution**, 14:389-402, 2000.

VISHWANATH , B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. 1987. Characterization of three edema inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoridis*) venom and their interaction with alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, **25**: 501-515.

VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American Rattlesnake venoms. **J. Formosan. Med. Assoc.**, **71**: 394-398, 1972.

VITAL BRAZIL, O. Os venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Méd. Brasil**, **26**: 212-218, 1980.

- VITT, L. J. Ecological observations on sympatric *Philodryas* (Colubridae) in northeastern Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 34:87-98. 1980.
- VITT, L. J.; COLLI, G. R. Geographical ecology of a neotropical lizard: *Ameiva ameiva* (Teiidae) in Brazil. *Can. J. Zool.*, n. 72, p.1986-2008, 1994.
- WANG J.M.; ROH S.H.; KIM S.; LEE C.W.; KIM J.I.; SWARTZ, K.J. Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels. **J Gen Physiol.** 123 (4):455-67, 2004.
- WINTER, C.A.; RISELY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan induced edema in the hind paw of the rats as an assay anti-inflammatory drugs. **Princ. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544-547. 1962.
- WANGSTAFF, L. et al. ADAMTS15 metalloproteinase inhibits breast cancer cell migration. **Breast Cancer Re.**, v. 12, p.15, 2010. Suppl. 1.
- WEINSTEIN, S.A. & KARDONG, K.V. 1994. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. **Toxicon**, **32(10)**: 1161-1185.
- WATSON, D. J.; MYERS, M. R.; CAUDY, A. A.; WITKOWSKI, A. J. **DNA recobiannte: genes e genomas**. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed., 2009.
- WALSER, M.; DAVIDSON, D. G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, 34:1520-1523, 1955.
- WARD, R.J. OLIVEIRA, A.H.; BORTOLETO, R.K.; ROSA, J.C.; FAÇA, V.M.; GREENE, L.J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif.**, v. 21, p. 134-40, 2001.
- YANG, T. Regulation of cyclooxygenase – 2 in renal medulla. **Acta Physiol Scand.** p. 177-413, 2003.
- ZAER, H.; GRAZZIOTIN, F. G.; CADLE, J.E.; MURPHY, R.W.; MOURA-LEITE, J. C.; BONATTO, S. L. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. **Papéis Avulsos de Zoologia**, 49 (11): 115-153. 2009.
- ZAER, H. Hemipenial morphology of the South American xenodontine snakes, with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenes. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 240: 1-168. 1999.
- ZAHER, R. The phylogenetic position of *Pachyrhachis* within snakes (Squamata, Lepidosauria). **J. Vertebrate Paleontol.**, **18(1)**: 1-3, 1998.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organism. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.

ZINGALI, R. B.; BIANCONI, M. L.; MONTEIRO, R. Q. Interaction of Bothrojaracin with prothrombin. **Haemostasis**, 31: 273-278, 2001. Disponível em: <http://www.cobrasbrasileiras.com.br/serpentes_classificacao.html>. Acesso em: 20 de março de 2011.

