



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DANIEL FROTA DE LIMA**

**INIBIÇÃO DOS EFEITOS LOCAIS DE VENENOS BOTRÓPICOS COM AGENTES  
ANTIOXIDANTES NA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE GALINHAS (HET-  
CAM)**

**FORTALEZA**

**2022**

**DANIEL FROTA DE LIMA**

**INIBIÇÃO DOS EFEITOS LOCAIS DE VENENOS BOTRÓPICOS COM AGENTES  
ANTIOXIDANTES NA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE GALINHAS (HET-  
CAM)**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

Coorientador: Me. Danilo Galvão Rocha

**FORTALEZA**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L697i Lima, Daniel Frota de.  
Inibição dos efeitos locais de venenos botrópicos com agentes antioxidantes na membrana corioalantóica de galinhas (HETCAM) / Daniel Frota de Lima. – 2022.  
62 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.  
Coorientação: Prof. Me. Danilo Galvão Rocha.

1. Antioxidantes. 2. Bothrops. 3. HET-CAM. 4. Toxicidade. 5. Veneno. I. Título.

CDD 570

---

**DANIEL FROTA DE LIMA**

**INIBIÇÃO DOS EFEITOS LOCAIS DE VENENOS BOTRÓPICOS COM AGENTES  
ANTIOXIDANTES NA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE GALINHAS (HET-  
CAM)**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Manuel Carlos Serra Azul Monteiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Priscilla Nascimento dos Santos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Eudes e Arileuda,  
a minha irmã, Gabriela.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Eudes e Arileuda, por todo apoio que sempre me deram, por sempre me incentivarem a estudar, por cada sacrifício que fizeram e por me possibilitarem seguir meus sonhos. Agradeço a minha irmã Gabriela pelo companheirismo e amizade, pelas brincadeiras que me ajudavam a ter dias mais leves. Obrigado também a todos os meus familiares que cada um à sua maneira contribuíram para minha formação, me incentivaram e apoiaram.

Agradeço aos meus amigos e colegas que conheci na UFC, em especial a Humberto Veras e Luís Henrique, por tornar esse tempo na universidade mais divertido. Agradeço as amigas que conheci durante meu período na UECE, Maria Julia Fonseca e Rebecca Eller, admiro muito as profissionais que se tornaram e agradeço por tudo que aprendi com vocês. A meu irmão de coração Artur Sotero, por sua amizade única e pelo apoio que sempre me forneceu. A minha amiga, Giovanna Mazza, por sempre me incentivar e dar apoio, por ser uma das minhas amizades mais antigas e desde que me lembro estar ao meu lado. Agradeço a Raquel Vale por me apoiar sempre que precisei, por sua amizade e companheirismo, e por me ajudar a desopilar sempre com os memes de baixíssima qualidade que eu tanto adoro. Vocês foram mais que essenciais nessa jornada, muito obrigado!

Agradeço também a Universidade Federal do Ceará, por me fornecer os meios para me tornar um profissional capacitado e de qualidade. Aos integrantes do Núcleo Regional de Ofiologia da UFC (NUROF-UFC), que me acolheram no início da faculdade e me ensinaram lições valiosas que vão além do profissional e me acompanharão por toda vida. Agradeço também aos integrantes do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LFAVET), por sempre serem gentis e dispostos a ensinar, por todo o apoio que tive durante o tempo que estagiei, assim como o NUROF, vocês têm papel importante na minha formação.

Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge, pelos ensinamentos, companheirismo, oportunidade e confiança desde o início no meu trabalho, muito obrigado professora, seu apoio foi fundamental para mim. Obrigado ao Me. Danilo Galvão Rocha por sempre estar disposto a ensinar e ajudar, por ser um excelente parceiro de trabalho e que me aturou nesse semestre no desenvolvimento do TCC sempre de uma maneira quase santa, muito obrigado pela sua paciência e vontade de ensinar, esse trabalho seria infinitamente mais difícil sem seu auxílio. Agradeço ao Dr. Manuel Carlos Serra Azul Monteiro por sempre estar disposto

a ajudar e ensinar, sempre buscando se engajar nos projetos, obrigado também pela companhia e conversas.

Agradeço aos órgãos financiadores PREX-UFC, FUNCAP e CNPQ pelo apoio financeiro e aprendizado que os projetos me proporcionaram ao longo do curso.

Agradeço aos membros da Banca, Prof<sup>a</sup> Dra Roberta Jeane Bezerra Jorge, Dr. Manuel Carlos Serra Azul Monteiro e Me. Priscilla Nascimento dos Santos por se disponibilizarem a avaliar meu trabalho e fazer parte desse encerramento de ciclo tão importante.

“*Sic Parvis Magna* – a grandeza em pequenos  
começos” (Uncharted)



## RESUMO

Os acidentes ofídicos são considerados uma doença tropical majoritariamente negligenciada. No Brasil, os acidentes ocorrem em sua grande maioria com animais do gênero *Bothrops*, apresentando baixas taxas de letalidade, porém com elevada morbidade. O soro antiofídico atua reduzindo a letalidade por meio da neutralização sistêmica do veneno, entretanto sua terapêutica possui baixa eficiência na ação local do veneno. O estudo em questão objetivou a análise dos efeitos inibitórios dos antioxidantes N-acetil-cisteína e ácido ascórbico nos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararacussu* através do método de ensaio na membrana corioalantoide de galinhas (HET-CAM). Este teste prioritariamente permite avaliar toxicidade/irritação por meio de escores para hemorragia, coagulação, e lise dos vasos, além de ser possível outras aplicações tais como angiogênese e vasoatividade. Em vista disto, o método foi selecionado para o presente trabalho, analisando 12 grupos amostrais: 1 grupo controle positivo com NaOH, 1 grupo controle negativo com PBS, 5 grupos com veneno de *B. jararacussu* dos quais 4 foram adicionados com antioxidantes em concentrações de 1:1 e 1:10; o mesmo foi feito com *B. erythromelas*. Os resultados indicaram redução no escore de irritação nos grupos tratados com 1:1, sendo ampliados com o aumento para concentração 1:10; os dois venenos reagiram bem com os compostos, entretanto quando exposto a maiores concentrações de ácido ascórbico (1:10) o veneno de *B.erythromelas* apresentou total inibição pelos padrões HET-CAM, enquanto o veneno de *B.jararacussu* demonstrou melhores resultados com N-acetil-cisteína.

**Palavras-chave:** Antioxidantes. *Bothrops*. HET-CAM. Toxicidade. Veneno.

## ABSTRACT

Snakebites are often considered a neglected tropical disease. In Brazil, accidents occur mostly with animals of the genus *Bothrops*, presenting low lethality rates, but with high morbidity. The antiophidic serum acts by reducing lethality through the systemic neutralization of the venom, however its therapy has low efficiency in the local action of the venom. This study aimed to analyze the inhibitory effects of the antioxidants N-acetyl-cysteine and ascorbic acid on the venoms of *Bothrops erythromelas* and *Bothrops jararacussu* snakes through the assay method on the chorioallantoic membrane of chickens (HET-CAM). This test primarily allows assessing toxicity/irritation through scores for hemorrhage, coagulation, and vessel lysis, in addition to being possible for other applications such as angiogenesis and vasoactivity. The method was selected for the present work due to the previous mentioned characteristics, analyzing 12 sample groups: 1 positive control group with NaOH, 1 negative control group with PBS, 5 groups with *B. jararacussu* venom, of which 4 were added with antioxidants in concentrations of 1:1 and 1:10; the same was done with *B. erythromelas*. The results indicated a reduction in the irritation score in the groups treated with 1:1, being expanded with the increase to concentration 1:10; the two poisons reacted well with the compounds, however when exposed to higher concentrations of ascorbic acid (1:10) *B.erythromelas* venom showed total inhibition by HET-CAM standards, while *B.jararacussu* venom showed better results with N-acetylcysteine.

**Keyword:** Antioxidants. *Bothrops*. HET-CAM. Toxicity. Venom.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupos no ensaio HET-CAM incubados com controle negativo (PBS) e positivo (NaOH) <i>versus</i> tempo(s) .....	43
Figura 2 – Grupos do ensaio HET-CAM com incubados veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (VBju) e ácido ascórbico(AA) <i>versus</i> tempo(s).....	44
Figura 3 – Grupos do ensaio HET-CAM incubados com veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> (VBju) e N-acetil-cisteina(NAC) <i>versus</i> tempo(s).....	46
Figura 4 – Grupos do ensaio HET-CAM com incubados com veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> (VBe) e ácido ascórbico(AA) <i>versus</i> tempo(s) .....	47
Figura 5 – Grupos do ensaio HET-CAM com veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> (VBe) e N-acetil-cisteina(NAC) <i>versus</i> tempo(s).....	49

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 – Discrepância entre os Escores de irritação do grupo controle x grupo tratado (VBju) .....	44
Gráfico 2 – Discrepância entre grupos por análise de Irritation Score (VBju) .....	45
Gráfico 3 – Discrepância entre os Escores de irritação do grupo controle x grupo tratado (VBe).....	47
Gráfico 4 – Discrepância entre os Escores de irritação do grupo controle x grupo tratado (VBe).....	48

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Principais substâncias gerais do veneno botrópico e seus efeitos.....	22
Tabela 2 – Composição do veneno comparando <i>B.jararacussu</i> versus <i>B.erythromelas</i> .....	26
Tabela 3 – Forma de classificação do Irritation Score.....	41
Tabela 4 - Comparativo do Irritation Score de todas as substâncias testadas (VBju).....	46
Tabela 5 - Comparativo do Irritation Score de todas as substâncias testadas (VBe).....	49

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AA	Ácido ascórbico
Asp-49	Refere-se a um subgrupo de PLA2s
CAM	Membrana corioalantoide
CLT	Lectininas do tipo C
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CIALNE	Companhia de Alimentos do Nordeste
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
GHS	Glutathiona
HET-CAM	Ensaio da membrana corioalantóide em ovo de galinha
IS	Irriation Score
LAAO	L-aminoácido oxidase
Lys-49	Refere-se a um subgrupo de PLA2s
NAC	N-acetil-cisteina
NIH	National Institue Health
NO	Oxido nítrico
NPDM	Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PBS	Tampão Fosfato-salino
ROS	Espécies reativas de oxigenio
SVMP	Metaloproteinases do veneno

SVSP	Serinoproteinases do veneno
SvgalL	Lectinas de ligação a galactosídeos do veneno
VBju	Veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>
VBe	Veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1	ASPECTOS GERAIS DAS SERPENTES <i>BOTHROPS</i> DE MAIOR RELEVÂNCIA MÉDICA NO BRASIL.....	17
1.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ENVENENAMENTO BOTRÓPICO E SEUS EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS .....	19
1.2.1	<i>O veneno da Bothrops erythromelas (VBe)</i> .....	22
1.2.2	<i>O veneno da Bothrops jararacussu (VBju)</i> .....	25
1.3	A TERAPÊUTICA DOS ACIDENTES OFÍDICOS.....	27
1.3.1	<i>O soro antiofídico</i> .....	27
1.3.2	<i>Eficiência local versus Eficiência sistêmica</i> .....	28
1.3.2.1	<i>Por que existem soro mono e polivalente? Uma breve história sobre a soroterapia</i>	29
1.3.3	<i>Outros medicamentos alternativos</i> .....	30
1.4	O EXPERIMENTO .....	31
1.4.1	<i>O que é HET-CAM?</i> .....	31
1.4.2	<i>O estresse oxidativo no acidente</i> .....	32
1.4.2.1	<i>N-acetil-cisteína</i> .....	34
1.4.2.2	<i>Ácido Ascórbico</i> .....	34
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>37</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>38</b>
4.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	38
4.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	38
4.3	REAGENTES.....	38
4.4	HET-CAM .....	39
4.4.1	<i>Grupos experimentais</i> .....	40
4.4.2	<i>Irritation Score (IS)</i> .....	41
4.4.3	<i>Análise estatística</i> .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1	INTERAÇÃO <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJU) + ÁCIDO ASCÓRBICO .....	43
5.2	<i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJU) + NAC .....	45
5.3	<i>BOTHROPS ERYTHROMELAS</i> + ÁCIDO ASCÓRBICO.....	46
5.4	<i>BOTHROPS ERYTHROMELAS</i> + NAC .....	48
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais das serpentes *Bothrops* de maior relevância médica no Brasil

Os acidentes ofídicos são uma doença tropical negligenciada (CHIPPAUX., 2017), possuindo uma média anual de 2,7 milhões acidentados, gerando uma média mundial alarmante de 81.000 a 138.000 óbitos (LONGBOTTOM *et al.*, 2018). Os animais do gênero *Bothrops*, popularmente conhecidos como jararacas, são serpentes peçonhentas, possuem o tipo de dentição denominada de solenóglifa que é extremamente especializada na inoculação do veneno e pertencem a família viperidea em conjunto com outros gêneros bastante conhecidos como as *Crotalus* e *Lachesis* (AMORIM *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2009). As *Bothrops* são extremamente diversas e bem distribuídas por todo território nacional (LONGBOTTOM *et al.*, 2018; CHIPPAUX., 2017). Essa ampla distribuição das serpentes e sua adaptabilidade às cidades próximas a florestas, assim como a expansão territorial das populações humanas contribuem para o maior contato entre os grupos (MONTEIRO *et al.*, 2020). A importância do gênero *Bothrops* nos acidentes ofídicos brasileiros é evidenciado por sua alta taxa nos envenenamentos registrados, cerca de 90% dos casos possuem envolvimento de alguma espécie botrópica (CHIPPAUX., 2017; MONTEIRO *et al.*, 2020). O veneno das jararacas é principalmente composto de metaloproteinases (SVMPS), fosfolipases A2 (PLA2s) e serinoproteases (SVSPs), substâncias essas que representam 90% da composição total do veneno e cuja predominância das mesmas varia de acordo com a espécie e em alguns casos a idade (PUCCA *et al.*, 2020; BERNAL *et al.*, 2020; CARDOSO *et al.*, 2003). O veneno botrópico em geral possui forte ação proteolítica, hemorrágica e coagulante, produzindo forte estresse oxidativo e propiciando o surgimento de graves lesões nos tecidos afetados, o que ocasiona o desenvolvimento de necroses (CARDOSO *et al.*, 2009; FÉLIX-SILVA *et al.*, 2017). Apesar da grande variedade, existem espécies que se destacam grandemente nos casos de acidentes do Brasil, variando sua prevalência nos casos regionalmente (JORGE *et al.*, 2015; CHIPPAUX., 2017; MONTEIRO *et al.*, 2020).

A principal *Bothrops* de interesse médico na região norte é a *Bothrops atrox* (DA SILVA *et al.*, 2019), a serpente apresenta coloração bastante variada e pode passar de 1,5m de comprimento (CARDOSO *et al.*, 2009), sendo extremamente relevante nos acidentes ofídicos brasileiros devido sua participação em cerca de 80-90% dos casos registrados na região rural amazônica, sobre a espécie sabe-se que é endêmica das florestas de mata úmida da Amazônia,

bem como em brejos de altitude na caatinga do nordeste brasileiro, e segundo elucida Monteiro *et al* (2020) essa amplitude de habitats se estendem abrangendo desde locais como as planícies tropicais ao leste do Andes, incluindo sudeste da Colômbia, até locais como o sul e leste da Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, leste do Equador e Peru, Panamá, até as regiões norte do Brasil e da Bolívia, demonstrando sua grande distribuição por toda América do Sul (MONTEIRO *et al.*, 2020).

A *Bothrops jararaca* é a serpente peçonhenta mais comum das regiões Sudeste e Sul, podendo ser encontrada também na região Nordeste, representa grande relevância medica sendo a espécie mais estudada do gênero (AMORIM *et al.*, 2018). Possui uma grande variedade de padrões de cores, desde tons castanhos até praticamente preto (CARDOSO *et al.*, 2009). A composição do veneno dessa serpente, assim como de algumas outras espécies de jararaca, varia de acordo com a idade, sexo do animal, dieta e localização geográfica, bem como as variações já existentes entre populações próximas (AMORIM *et al.*, 2018; ANTUNES *et al.*, 2010), é um animal bem adaptável, ágil e de porte normalmente entre 1 e 1,5 m (CARDOSO *et al.*, 2009), neste contexto, o trabalho de Lira-da-silva *et al* (2009) demonstra que a *B. jararaca* é capaz de se adaptar muito bem a diversos habitats, como florestas tipicamente tropicais, regiões antropomorfizadas, cerrado e até zonas urbanas. Essa grande adaptabilidade, e ampla distribuição da *B. jararaca* são fatores facilitadores no surgimento dos acidentes (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009).

Na região Nordeste, a *Bothrops erythromelas*, conhecida como jararaca-da-seca ou jararaca-malha-de-fogo é a serpente peçonhenta mais comum, principalmente na área mais interior e rural, sendo encontrada principalmente em regiões de floresta caatinga e áreas circunvizinhas (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009), ela é um dos alvos principais desse estudo. A espécie é endêmica da região e apresenta escamas castanho-avermelhadas, possui o habito de esconder-se em folhagens ou pedregulhos sendo dificilmente notada devido ao seu pequeno porte, normalmente atingindo 54 cm quando adulto (JORGE *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2009). A *B. erythromelas* possui a maior incidência nos casos de acidentes ofídicos do Nordeste (NERY *et al.*, 2016), entretanto o soro antiofídico polivalente utilizado para o tratamento do envenenamento não possui especificidade com a *B. erythromelas*, o que diminuia qualidade do tratamento e explica a baixa proteção contra a letalidade de 58% (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; FELIX-SILVA *et al.*, 2017; JORGE *et al.*, 2015).

Nas regiões supracitadas também é encontrada a outra serpente alvo do estudo, a *Bothrops jararacussu*. A espécie é considerada a maior entre as *Bothrops* podendo atingir em

média 2,5 metros de comprimento, possui glândulas venenosas muito desenvolvidas e as maiores quantidades de veneno do gênero (CARDOSO *et al.*, 2009; LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; CORREA-NETO *et al.*, 2010). A serpente é estruturalmente corpulenta, os exemplares adultos têm a cabeça muito grande e as fêmeas são maiores que os machos, possui variações de cores de acordo com o sexo e a idade do animal; quando são jovens eles apresentam coloração de tons castanhos, nos adultos o macho apresenta coloração de manchas pretas com fundo castanho enquanto nas fêmeas ocorre o mesmo padrão de mancha, alternando apenas para o fundo amarelo (CARDOSO *et al.*, 2009).

A *Bothrops moojeni* é uma espécie de grande relevância no cerrado brasileiro, anteriormente considerada erroneamente como *B.atrox*, a serpente é bem distribuída pela Região Centro-Oeste do país, podendo ser encontrada também no Nordeste (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2009). Esse animal possui comportamento agressivo, é bem adaptável e pode atingir mais que 1,5 m de comprimento, ao longo dos anos essa serpente tem crescido em relevância médica (CARDOSO *et al.*, 2009).

## **1.2 Características gerais do envenenamento botrópico e seus efeitos locais e sistêmicos**

O envenenamento com serpentes do gênero *Bothrops* progride da seguinte forma: Inicialmente, o local da lesão passará de uma ferida (causada pelas presas) com bordas avermelhadas para um inchaço no local e causará dor intensa, podendo ocorrer sangramentos no local em pelo menos metade dos pacientes (MONTEIRO *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2019). No decorrer do envenenamento, pode vir a ocorrer aumento dos linfonodos locais em um terço dos casos com poucas horas após a picada, com cerca de um dia, é possível verificar necrose local, o surgimento de bolhas no membro afetado também é comum (MONTEIRO *et al.*, 2020; MAMEDE *et al.*, 2020). Essas bolhas formadas devido a ação do veneno podem conter pus, originado de infecções secundárias, ou conteúdo sanguíneo e líquidos. Um exemplo dessa interação é a constatação de que 40% dos casos com infecções secundárias de acidente com *Bothrops atrox* em Manaus foram causadas pela bactéria *Morganella morganii*, o que demonstra que a problemática do acidentado vai além dos efeitos causados pelo veneno (MONTEIRO *et al.*, 2020). É possível ocorrer sangramentos na gengiva, necrose generalizada no membro afetado em casos de atendimento demorado, agravante muito

comum em acidentes com *B.atrox* devido à dificuldade de locomoção na região amazônica (DA SILVA *et al.*, 2019). Segundo demonstrado através do trabalho de Monteiro *et al* (2020) existem cinco reações sistêmicas graves que surgem nos pacientes em casos mais sérios e podem resultar no óbito do paciente acidentado com *B.atrox* , sendo os edemas pulmonares agudos registrados como causa de 37 % dos óbitos, falência renal aguda (29%) sepse (21,3%) e 15% em decorrência de hemorragia sistêmica (MONTEIRO *et al.*, 2020). Esses dados demonstram o potencial do veneno de *B.atrox* em causar danos sistêmicos.

No caso da *B. erythromelas* as reações tendem a ser mais locais, fato esse demonstrado através do trabalho de Oliveira *et al*, os casos registrados de acidentes dessa espécie na Paraíba, demonstram que os sintomas consistem principalmente na dor localizada na região de inoculação (95,9%), formação de edemas (87,1%) e equimose (25,9%); quanto ao surgimento das reações sistêmicas do veneno, foi constatado pelos autores que mais da metade dos pacientes, cerca de 57,1%, não desenvolveram nenhuma forma de reação sistêmica (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os dois trabalhos citados fornecem dados demonstrando a grande diferença de letalidade e prováveis sequelas do envenenamento entre as duas espécies de serpentes, sinalizando que a *B. erythromelas* aparentemente possui sua ação mais localizada.

As fosfolipases A2 (PLA2s) são enzimas de grande relevância na composição do veneno das *Bothrops* (GUTIÉRREZ *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2020; BICKLER., 2020). Sua importância para o quadro de envenenamento se dá por essa substância ser uma potente miotoxina capaz de interagir com células da musculatura esquelética, destruindo a integridade da membrana plasmática das mesmas, extravasando o seu conteúdo para o meio externo, e desempenhando um papel fundamental na indução da miotoxicidade sistêmica (Tabela 1), no dano aos tecidos, hemorragias e na inflamação, em conjunto com outros componentes do veneno (GUTIÉRREZ *et al.*, 2018; MAMEDE *et al.*, 2020). Esse extravasamento libera grandes quantidades de mioglobina sérica , creatinoquinase na corrente sanguínea, bem como o aumento significativamente alto de potássio no meio extracelular gerando hipercalemia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2018). Ao atingir os túbulos renais, a mioglobina causa danos severos aos rins, dada a sua toxicidade (GUTIÉRREZ *et al.*, 2018). Além disso, essas ações geram respostas sistêmicas, uma vez que o conteúdo extracelular é importante para a regulação de diversos órgãos, a alteração ocasionada nesse meio pode afetar o coração e os pulmões (SCHILLER *et al.*, 2015).

A inflamação ocasionada pelo envenenamento possui potencial para afetar qualquer órgão do corpo, no caso dos pulmões, a formação de edemas induzido por inflamação é comum, bem como hemorragias pulmonares, causadas geralmente por TNF-alfa ou metaloproteinases

além de paradas respiratórias (BICKLER., 2020). Ademais, a formação de coágulos, a destruição de vasos sanguíneos, hemorragias, alterações na taxa de potássio e cálcio, formação de edemas, além de função pulmonar prejudicada pode exercer grande estresse sobre o coração.

O surgimento de lesões renais agudas geradas pelo veneno ocorre com bastante frequências acidentados, sendo responsável pela maior causa de morte entre os pacientes que sobreviveram aos estágios iniciais do envenenamento (PUCCA *et al.*, 2020) apesar de as causas dessas lesões ainda não serem totalmente conhecidas sabe-se que elas ocorrem principalmente por meio da ação direta do veneno nos rins e seu efeito hemodinâmico, por depósitos de microtrombos glomerulares graças a anormalidades de coagulação, e por mecanismos imunológicos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; PUCCA *et al.*, 2020). As serinoproteases (SVSPs) desempenham um papel importante na lesão renal aguda, sua alta expressividade ocorre devido sua ação similar a trombinas aliada a atividade fibrinolítica, aumentando a formação de trombos e causando grandes distúrbios na coagulação sanguínea, além de causar outros impactos como a vaso dilatação e hipotensão (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; MAMEDE *et al.*, 2020).

As metaloproteinases do veneno (SVMPs) e as fosfolipases A2 (PLA2s) também podem causar danos graves nos tecidos renais (PUCCA *et al.*, 2020). No caso das metaloproteinases, a lesão ocorre devido a sua ação proteolítica que pode atuar na lâmina basal e ocasionar a destruição da adesão celular por meio da sua degradação, rompendo vasos e ocasionando hidrolise da matriz extracelular (Tabela 1). Já importância das fosfolipases se dá as lesões teciduais causadas na membrana por meio de hidrolise ou seu rompimento não catalítico levando a necrose dos túbulos renais, sendo também responsáveis por formação de edemas e mionecrose (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; PUCCA *et al.*, 2020; BERNAL *et al.*, 2020). Além dos efeitos supracitados, a ação conjunta das PLA2s e SVMPs têm efeitos pró-inflamatórios no sistema por meio da expressão de mediadores, causando ainda mais danos aos tecidos afetados (BERNAL *et al.*, 2020).

As lesões hepáticas, diferentemente das renais, são extremamente raras em humanos acidentados com veneno botrópico e de difícil diagnóstico. No seu trabalho, Cunha *et al* (2015) sobre o primeiro caso de hemorragia hepática documentada devido a um envenenamento com *Bothrops*, cujo paciente idoso de 66 anos também apresentou lesão renal aguda, edema local, coagulopatia após uma picada na perna esquerda, o autor do trabalho não descartou a possibilidade de que esses efeitos tenham ocorrido por consequência de outras doenças ou fatores prévios poderiam estar presentes no paciente, como a diabete ou hipertensão que tem grande influência sobre a saúde do fígado (CUNHA *et al.*, 2015).

Trabalhos feitos com ratos em laboratório demonstraram evidências de que o dano ao fígado é um efeito colateral do envenenamento, e que as PLA2s podem ter influência em danos hepáticos, apesar de os mecanismos de como as lesões ocorrem ainda não serem conhecidos (TEXEIRA *et al.*, 2018). No trabalho com ratos de Texeira e colaboradores (2018) uma análise histológica dos tecidos testados demonstrou que houve necrose; mudanças nucleares e citoplasmáticas, congestão de vasos sanguíneos, trombose da veia portal, amiloidose e atrofia dos hepatócitos; além de ativação das células de Kuffer (TEXEIRA *et al.*, 2018).

**Tabela 1 – Principais substâncias gerais do veneno botrópico e seus efeitos.**

<b>Fosfolipases (PLA2s)</b>	Miotoxicidade sistêmica, hemorragia, edemas, mionecrose, influencia na hipercalemia e lesão renal aguda. Interege com as SVMPs estimulando ações pró-inflamatórias.
<b>Metaloproteinases (SVMPs)</b>	Lesão tecidual por ação proteolítica, atuando na lâmina basal e rompendo vasos sanguíneos. Interege com PLA2s estimulando ações pró-inflamatórias.
<b>Serinoproteinases (SVSPs)</b>	Ação fibrinolítica, distúrbios de coagulação, grande influência na lesão renal aguda.
<b>L-aminoácido oxidase (LAAO's)</b>	Atua formando peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), amônia e alfa cetoácidos via desaminação de L-aminoácidos gerando citotoxicidade e potencialização dos danos no envenenamento. Sendo importante devido sua multifuncionalidade em diversos venenos
<b>Lectinas do tipo C (CTL)</b>	Atua na potencialização da inflamação, estimulando a produção das citocinas TNF-alfa, IL-beta e IL-6 via ligação de galactosídeos (SVgalL).

Fonte: Elaborado pelo autor, por meio de dados obtidos nos trabalhos de WANDERLEY *et al.*, 2014; CEZZARETI *et al.*, 2019; BERNAL *et al.*, 2020; PUCCA *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2015.

### 1.2.1 O veneno da *Bothrops erythromelas* (VBe)

O veneno de *B. erythromelas* exibe diversas características observáveis diferentes quando comparado com outros do gênero, e sua composição geral consiste principalmente de

PLA2s , SVMPs , SVSPs, lectinas do tipo C (CTL), peptídeos potenciadores de bradicinina e desintegrinas(Tabela 2) (JORGE *et al.*, 2015; CAVALCANTE *et al.*, 2021). Segundo NERY *et al.*, 2016, em sua análise do veneno da *B.erythromelas*, a ação nos órgãos internos do acidentado ocorre provavelmente por influência indireta dos efeitos sistêmicos do envenenamento (NERY *et al.*, 2016), além disso , como observado por meio dos trabalhos de MOURA-DA-SILVA *et al* (1990) e MOURA-DA-SILVA *et al* (1991), também abordados no estudo supracitado, foi detectado uma provável causa para sua baixa miotoxicidade; os experimentos em questão não detectaram nenhuma função de miotoxina ou fosfolipase nas proteínas básicas do veneno, ademais foi detectado que a espécie possui o maior nível de fator X e ativadores de protrombina sem possuir nenhuma atividade de enzimas do tipo trombinas de todas as *Bothrops* verificadas pelo experimento, sendo essa atividade sensitivamente maior em serpentes jovens enquanto nas adultas a prevalência da composição do veneno demonstra um maior teor de proteínas (NERY *et al.*, 2016; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1990; MOURA-DA-SILVA *et al.*,1991). Entretanto a *B. ery* não é a única *Bothrops* ou serpente viperidae que apresenta mudanças na composição do veneno durante o crescimento do indivíduo, uma das explicações para esse fenômeno pode ser a influência da dieta disponível para a população durante sua vida, bem como o isolamento geográfico das populações, que evolutivamente moldou ou molda essa variação nas espécies, tendo em vista que o objetivo principal do veneno é a captura, obtenção e ,no caso das *Bothrops*, auxiliar também na digestão da presa, o veneno tende a ter eficácia diferente de acordo com o tipo presa que o animal tem disponível na região e sua capacidade de obtê-la, isso explicaria o motivo pelo qual diferentes populações de *B. erythromelas* possam ter modificações pontuais no veneno e efeitos levemente diferentes no envenenamento de acordo com a localização geográfica do animal, bem como essa mudança de composição entre os indivíduos jovens e adultos, além disso essa variação pode ter um impacto significativo no tratamento de acidentados (DALTRY *et al.*, 1996; MONTEIRO *et al.*, 2020).

Apesar de sua grande importância nos acidentes botrópicos do Nordeste brasileiro, a espécie endêmica da caatinga *B. erythromelas* ainda é pouco estudada, o que compõe o seu veneno e suas variações entre populações é minimamente compreendido, ademais sabe-se pouco sobre seus mecanismos de ação e seus efeitos nos acidentados (NERY *et al.*, 2016; JORGE *et al.*, 2015). A berythrativase é uma metaloproteinase (SVMP) não hemorrágica do tipo P-III encontrada no veneno de *B. erythromelas* e que possui a peculiaridade consideravelmente rara de atuar como um ativador de protrombinas causando efeitos de

coagulação na área em que interage, além disso ela é capaz de causar respostas que favorecem a inflamação, essas características fogem do convencional tendo em vista que a ação biológica das SVMP encontradas no veneno das *Bothrops* normalmente é atuar na função hemorrágica do envenenamento, sendo principalmente responsáveis por danos nos vasos sanguíneos, como no caso das citadas nos acidentes por *B.atrox* (SILVA *et al.*, 2003; NERY *et al.*, 2016; BALDO *et al.*, 2010). Além disso, a berythrativase em conjunto com os peptídeos potenciadores de bradicina interagem com as células endoteliais estimulando a produção de óxido nítrico (NO), um importante radical livre e neurotransmissor, e a liberação de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), um inibidor de coagulação via plaquetas, o efeito dessa reação em conjunto com o rompimento das matrizes celulares ocasionado pela ação proteolítica do veneno influencia fortemente no estresse oxidativo e nos efeitos de hipotensão no acidentado (SCHATTNER *et al.*, 2005).

O VBe também possui a capacidade de estimular a resposta inflamatória, recrutando macrófagos e neutrófilos, induzindo-os a produzir citocinas como a TNF-alfa, IL-6 e IL1-beta ocasionando picos dessas substâncias nas primeiras horas do envenenamento e intensificando a inflamação, ademais essas células imunes desempenham papel importante na produção de ânions superóxidos e portanto influenciam diretamente no estresse oxidativo (NERY *et al.*, 2020). Segundo LOTTO *et al.*, 2021, foi verificado que o veneno da *B.erythromelas* não possui a capacidade de causar a coagulação do fibrinogênio diretamente, não possuindo a atividade de trombinas como é comum as outras espécies do gênero, o autor do estudo acredita que a principal razão da ausência de uma substância coaguladora de fibrinogênio foram mutações que ocasionaram a deleção desse gene na *Bothrops erythromelas*, levando em consideração a não existência dessa substância no veneno, a principal responsável pela ativação das protrombinas durante o envenenamento é a berythrativase (CAVALCANTE *et al.*, 2022; LOTTO *et al.*, 2021; NERY *et al.*, 2016). O trabalho evidencia que o veneno possui grande eficiência na coagulação plasmática, apresentando máximo de coagulação entre as espécies de *Bothrops* registradas no estudo e atuando em diversos níveis do plasma, outrossim foi observada variação nesse efeito de acordo com a região das serpentes analisadas, sendo as do Rio Grande do Norte e Bahia menos expressivas no plasma que as de Pernambuco, esse tipo de variação pode ter grande influência na eficácia e tratamento dos acidentes (LOTTO *et al.*, 2021; JORGE *et al.*, 2015; DALTRY *et al.*, 1996).



### 1.2.2 O veneno da *Bothrops jararacussu* (VBju)

A *Bothrops jararacussu* é capaz de produzir e injetar as maiores quantidades de veneno de todas as *Bothrops* brasileiras e, assim como em outras do gênero, o composto possui efeitos hemorrágicos, coagulatórios e proteolíticos, sendo constituído de primariamente de PLA2, SVMP, SVSP's, lectinas não enzimáticas do tipo C dependentes de cálcio, fator de crescimento nervoso, e L-Amino-ácido oxidases (LAAO) (Tabela 2) (CORREA-NETO *et al.*, 2010; PIRES *et al.*, 2017). Existem dois subtipos de PLA2 identificados no veneno botrópico: as Asp49, sendo as versões cataliticamente ativas, e as Lys49, versões que não apresentam função enzimáticas e são homologas das anteriores; os dois subtipos desempenham papéis extremamente importantes na miotoxicidade (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; MORA-OBANDO *et al.*, 2014).

A principal característica marcante do acidente com *B. jararacussu* é a grande eficiência do veneno na ação local e mionecrotica, situação compreensível dada a sua composição, no qual aproximadamente 36 % do veneno são fosfolipases A2, sendo 30% destas do tipo Lys49-PLA, das quais a mais conhecida é a Bothropstoxina-I (NAVES *et al.*, 2021; PUCCA *et al.*, 2020; AGUIAR *et al.*, 2020). O intenso efeito miotóxico ocasiona o acúmulo de mioglobinas nos rins, gerando maior tendência para evolução de danos renais como lesão renal aguda e mioglobinúria (CORREA-NETO *et al.*, 2010; LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; AGUIAR *et al.*, 2020). O veneno também possui grande quantidade de SVMP's, cerca de 16% do total, que em conjunto com as PLA2, como foi citado anteriormente, potencializa o efeito inflamatório (BERNAL *et al.*, 2020), além disso segundo verificou AGUIAR *et al.* (2020), a quantidade das PLA2 no veneno varia de acordo com a idade do animal e ocasiona variações nos efeitos, os adultos produzem mais dessa substância e apresentam maior miotoxicidade no envenenamento, enquanto os jovens possuem mais efeitos hemorrágicos.

A grande diversidade do gênero *Bothrops* também é percebida ao observar a variedade das interações patofisiológicas de cada veneno, ao analisar o estresse oxidativo dos acidentes é notório que o sistema imune do acidentado tem participação fundamental no efeito e que cada espécie desenvolveu uma maneira particular de potencializar essa ação (WANDERLEY *et al.*, 2014; NERY *et al.*, 2020). O VBju possui inicialmente grande similaridade com os estágios iniciais que geram estresse oxidativo comuns a outras espécies do gênero, como a sua capacidade de recrutar neutrófilos, o que no caso da *B. jararacussu* ocorre por meio de lectinas de ligação a galactosídeos (SVgalL), e estimular essas

células a produzir TNF-alfa, IL-beta e IL-6; entretanto o que realmente se destaca é a ocorrência de uma grande imunexpressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que gera no tecido afetado vasodilatação e formação de edemas, potencializando a inflamação e sua ação nas células endoteliais e locais (WANDERLEY *et al.*, 2014; CEZZARETI *et al.*, 2019).

**Tabela 2 – Composição do veneno comparando *B.jararacussu* versus *B.erythromelas***

<b>Principais substâncias presentes no veneno</b>	<b>Porcentagem verificada no veneno de <i>Bothrops jararacussu</i></b>	<b>Porcentagem verificada no veneno de <i>Bothrops erythromelas</i></b>
<b>Total de Fosfolipases (PLA2s)</b>	<b>25,7%</b>	<b>10,1~15,1%</b>
<b>PLA2s do tipo Asp-49</b>	<b>16,7% das PLA2s</b>	<b>10,1~15,1%</b>
<b>PLA2s do tipo Lys-49</b>	<b>83,3% das PLA2s</b>	<b>Ausente (0%)</b>
<b>Metaloproteinase (SVMP)</b>	<b>26,2%</b>	<b>32,5~59,9%</b>
<b>Serinoproteinase (SVSP)</b>	<b>12,3%</b>	<b>4~9,7%</b>
<b>L-aminoácido oxidases (LAAO)</b>	<b>15%</b>	<b>Não detectado (0%)</b>
<b>Lectinas do tipo C (CTL)</b>	<b>9,7%</b>	<b>8,4-21,6%</b>

Fonte: Elaborado pelo autor por meio de dados fornecidos pelos trabalhos de AGUIAR *et al.*, 2020; JORGE *et al.*, 2015; TASOULIS *et al.*, 2017.

### 1.3 A terapêutica dos acidentes ofídicos

#### 1.3.1 O soro antiofídico

O soro antiofídico é um medicamento formado a partir de anticorpos de origem animal utilizado mundialmente no tratamento principal para acidentes ofídicos, na soroterapia a atuação desse composto ocorre devido a neutralização gradual do veneno por meio da ação dos anticorpos, sendo uma maneira eficiente de redução da mortalidade os acidentados (DA SILVA *et al.*, 2009; MORAIS., 2018). Fatores como gênero da serpente, local de origem da espécie e o tipo do soro exercem grande influência no desempenho do tratamento (CHIPPAUX., 2017), e apesar de sua criação ter ocorrido há mais de um século, o soro ainda é o medicamento mais eficiente em casos de envenenamento, existindo diversas pesquisas com o foco em desenvolver novos medicamentos que possam auxiliar ou substituir o soro na terapêutica dos acidentes ofídicos, esse processo é importante devido as dificuldades como o alto custo de produção e transporte do soro, situação comum para muitos países, bem como a necessidade de alternativas para quadros onde somente o soro não é o suficiente (LAUSTSEN *et al.*, 2018; GUTIÉRREZ *etal.*, 2021).

A qualidade da ação farmacodinâmica do soro durante o tratamento depende de diversos fatores, um deles conhecido como afinidade caracteriza a preferência de ligação que os anticorpos possuem pelas moléculas do veneno que ele está combatendo, em uma situação onde a relação fosse uma toxina para um anticorpo, quanto maior a afinidade melhor seria a capacidade de neutralização do veneno, entretanto os venenos são compostos extremamente complexos e ricos em substâncias com ações diferentes (FRY *et al.*, 2003).

Essa complexidade dificulta a avaliação dos efeitos, assim como a própria complexidade dos anticorpos do soro pode ser um empecilho, em conformidade com o que foi elucidado por Laustsen *et al* (2018). Existem vários fatores que dificultam as medições de eficiência de um antiveneno, dos quais se destacam três problemas principais, a saber: a competição dos mesmos epítomos de uma toxina pelos anticorpos diferentes de um antiveneno; a possibilidade de um anticorpo reconhecer mais de uma toxina semelhante a substância alvo inicial e possua afinidades diferentes entre as duas; e a concentração que cada anticorpo é capaz de interagir (LAUSTSEN *et al.*, 2018).

Muito se discute a importância de mitigar os efeitos colaterais do soro, visto ser comuns casos de reações adversas ao tratamento nas primeiras 24 horas de soroterapia, ocasionando desde reações simples, como dores de cabeça e urticária até ocorrência de choques anafiláticos nas situações mais graves, fator esse que pode surgir em até 40% dos casos (DE SILVA *et al.*, 2015). A doença do soro também é um dos efeitos negativos que pode ocorrer ao paciente, ela é causada pela resposta imune tardia a exposição dos anticorpos que compõem o soro, ocorrendo após 5-14 dias da soroterapia e sendo caracterizada por: febre, irritações de pele, dores de cabeça, mialgia, problemas gastrointestinais e dores nas articulações (RYAN *et al.*, 2016; MORAIS., 2018). A problemática das reações adversas aumenta principalmente quando ela ocorre potencializando a complicação dos quadros de envenenamento, visto que em situações como essa a equipe médica precisará mitigar os efeitos do veneno e os colaterais do soro, o que pode ocasionar diversas complicações para o paciente, resultando em redução da qualidade do tratamento e posterior recuperação (DE SILVA *et al.*, 2015; RYAN *et al.*, 2016; CARDOSO *et al.*, 2009).

### ***1.3.2 Eficiência local versus Eficiência sistêmica***

O soro antiofídico demonstra grande eficiência em reduzir os efeitos sistêmicos do envenenamento, visto que as imunoglobulinas são proteínas especializadas que interagem de maneira muito específica com a toxina alvo, por esse motivo agem com precisão na neutralização dos compostos do veneno, sendo uma ótima resposta para evitar que novos danos aconteçam ao acidentado e melhorando sua chance de recuperação (LAUSTSEN *et al.*, 2018; MORAIS., 2018). Sendo assim, percebe-se que a ação do soro é prioritariamente atuante na neutralização sistêmica, por consistir somente em anticorpos. a qualidade da sua ação é limitada pela complexidade e variedade das toxinas presentes no veneno, além de se restringir apenas a esses compostos, o que impacta na eficiência dos seus efeitos locais, já que as regiões afetadas, normalmente o local da picada e locais próximos, interagiram com o veneno e sofreram diversos danos celulares em consequência disto, ocasionando reações endógenas que podem atuar de maneira progressiva após a atuação direta do veneno como estresse oxidativo, necroses, mionecroses, edemas, hemorragias, infecções e outras consequências oriundas da ação inicial do envenenamento que mesmo tratadas podem deixar sequelas no paciente por toda

vida, o que explica as taxas de morbidade dos acidentes ofídicos, em especial com o gênero *Bothrops* devido sua ação local bem característica.

Neste mesmo contexto, é importante ressaltar que a aplicação do soro requere equipes treinadas e um ambiente hospitalar de qualidade para que a terapêutica possa ser feita de forma segura e eficiente, a distância do acidente para o local de tratamento também é um fator chave na piora do quadro clínico por sua influência na demora do atendimento, sendo assim ressaltada a importância do desenvolvimento de novos medicamentos que atuem principalmente no tratamento ou redução dos efeitos locais (DA SILVA *et al.*, 2007; STRAPAZZON *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2009; FRY *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2021).

### ***1.3.2.1 Por que existem soro mono e polivalente? Uma breve história sobre a soroterapia***

O tratamento com soro antiofídico, bem como o desenvolvimento do primeiro soro ocorreu no final do sec.20, criado pelos cientistas Albert Calmette, Césaire Auguste Phisalix e Gabriel Bertrand, a partir da imunização de animais em geral, visando extrair os anticorpos formados durante o envenenamento do animal e os aplicar no tratamento de seres humanos acidentados (FRY *et al.*, 2003; LAUSTSEN *et al.*, 2018). O uso de cavalos para fornecer os anticorpos como é popularmente conhecido se tornou padrão apenas após a criação do método que serve de base para produção do soro até os dias atuais pelo cientista brasileiro Vital Brazil, a sua participação na criação foi de grande relevância, principalmente por sua percepção da necessidade de diversos reajustes no soro devido a especificidade de cada veneno, bem como as variações entre espécies, cuja diversidade impactava grandemente na qualidade do tratamento, algo que Calmette inicialmente discordava (FRY *et al.*, 2003). Nesse sentido, os estudos de Vital Brazil culminaram desenvolvimento dos primeiros soros monovalentes, que atuavam combatendo o veneno de uma espécie ou do seu gênero, para os gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. O cientista brasileiro também utilizou combinações de soros específicos que em conjunto pudessem ser usados para o tratamento de outras serpentes de menor incidência, pensando nos casos em que não possuíam soros específicos, não existia a produção do soro ou não era possível identificar o animal envolvido no envenenamento, motivando assim a criação do soro polivalente (CARDOSO *et al.*, 2009).

### 1.3.3 Outros medicamentos alternativos

A necessidade de novos medicamentos para acidentes ofídicos é um problema real e pauta de muitas pesquisas da comunidade científica, essa situação têm impulsionado o desenvolvimento de diversas estratégias promissoras que visam modernizar e potencializar a qualidade do tratamento dos acidentados. (WILKEL *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ *et al.*, 2021). O desenvolvimento de novas terapêuticas que aparentemente possuem mais destaque são: a utilização de anticorpos monoclonais , recombinantes sintéticos e inibidores naturais submetidos a testes conhecidos através da cultura local e povos tradicionais (WILKEL *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2021).

Os anticorpos monoclonais e versões recombinantes são atualmente uma boa alternativa para o desenvolvimento de uma terapêutica nova, a forma de obtenção dos monoclonais ocorre por meio da fusão de células mielomatosas com linfócitos B, criando híbridos capazes de viver indefinidamente e produzir anticorpos específicos ao antígeno exposto sem a utilização de animais (CARDOSO *et al.*, 2009), existe também o trabalho de Roncolato *et al* (2015), no qual descreve uma técnica clássica em que é utilizado um vírus bacteriófago para alterar o material genético no plasmídeo de uma bactéria, modificando-a para produção dos anticorpos monoclonais desejados (RONCOLATO *et al.*, 2015). As células híbridas podem ser utilizadas tanto para produção de medicamentos como para criação de uma biblioteca biológica, ou seja , com um número suficiente de células B produzindo anticorpos específicos para cada substância conhecida do veneno seria possível em ,um futuro próximo otimista, sintetizar um soro com máximo de eficiência e mínimo de efeitos colaterais (CARDOSO *et al.*, 2009; LAUSTSEN *et al.*, 2018).

Os anticorpos recombinantes são obtidos por técnicas de clonagem molecular e sua importância se dá por sua grande versatilidade e capacidade de neutralizar a toxina causando o mínimo possível de reações adversas, esses anticorpos podem ser completamente construídos ou ser fragmentos, o caso os fragmentos ocorre para que possam haver combinações entre as porções artificiais e humanas durante sua construção, mantendo a porção constante do anticorpo de origem humana produzido por células murinas modificadas e a porção de ligação artificial é possível ocasionar a neutralização da toxina enquanto ocorre a redução dos efeitos adversos, fornecendo uma alternativa mais segura a atual soroterapia, entretanto a redução dos altos custos de produção e melhores conhecimentos da complexidade do veneno são necessários para

que a técnica seja eficiente e utilizável a nível mundial (KNUDSEN *et al.*, 2015; LAUTSTESSEN *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

O conhecimento de inibidores de origem natural é um fator comum em diversas culturas, normalmente eles são utilizados por meio dos extratos de diversas plantas medicinais em tratamentos criados antes da existência da medicina moderna e conservado na memória coletiva da população ou em locais onde essa medicina tem acesso limitado, entretanto é preciso analisar de maneira científica a sabedoria popular e cultural, extraíndo o que pode ser útil para os tratamentos modernizados (GUTIÉRREZ *et al.*, 2021; WILKEL *et al.*, 2006; OMARA., 2020). Os estudos de plantas com capacidades de inibidores naturais são viáveis devido as diversas maneiras que os extratos atuam no tratamento e por demonstrarem ser alternativas viáveis de baixo custo e acessíveis para tratamento inicial do envenenamento; o processo de identificação se dá inicialmente utilizando o extrato da forma que é utilizado tradicionalmente, buscando identificar as interações que ocorrem durante o envenenamento, após verificado o provável inibidor, a substância é purificada e submetida a diversas testagens para garantia da sua eficácia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2021; OMARA., 2020).

O presente estudo utilizou antioxidantes por dois motivos principais: sua potencial ação de redução do estresse oxidativo, que a longo prazo pode ser utilizado para auxiliar o tratamento com o soro antiofídico e por ser um aspecto do envenenamento com muitas lacunas no conhecimento que apenas recentemente passou ter maior atenção dos pesquisadores (SHARMA *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 2021).

## **1.4 O Experimento**

### ***1.4.1 O que é HET-CAM?***

A técnica do ensaio com membrana corioalantóide de galinhas (HET-CAM), tradução livre do termo original “Hen’s Egg Test - Chorioallantoic Membrane”, cresceu em uso nas últimas décadas como uma alternativa promissora para substituição de diversos tipos de experimentação animal, essa expressiva preferência ocorre principalmente devido a maior pressão na comunidade científica em relação aos aspectos éticos envolvendo experimentação

animal, o baixo custo da técnica e sua simplicidade, tornando-o fácil de ser reproduzido e reduzindo em grande quantidade o uso desnecessário de animais (SCHRAGE *et al.*, 2010).

O teste, que será demonstrado em toda sua extensão no tópico “Metodologia”, simplificada consiste na utilização de ovos da espécie de ave *Gallus gallus* no seu décimo dia de desenvolvimento embrionário, que durante o experimento tem a porção da casca imediatamente superior a câmara de ar removida expondo a membrana interna do ovo, após a remoção cautelosa dessa estrutura a membrana corioalantóide (CAM) estará pronta para ser utilizado na testagem de substâncias (LUEPKE *et al.*, 1986). O experimento possui diversos pontos positivos para obtenção de informações por ser um modelo vivo, pela grande quantidade de vasos sanguíneos presentes na CAM e sua grande similaridade de reação fisiológica com outras técnicas (teste de Draize), sendo um ótimo modelo para estudo de reações inflamatórias e efeitos atuantes na corrente sanguínea (CAZALDEY *et al.*, 2009; SCHRAGE *et al.*, 2010). No seu trabalho sobre HET-CAM, Luepke *et al.* (1986) elucida que essa técnica possui grande potencial em fornecer de informações de diversas áreas, sendo uma delas a toxicidade sistêmica. O HET-CAM oferece maneiras viáveis para testagem dos efeitos de inibição por antioxidantes do veneno botrópico e seus dados obtiveis são relevantes, sendo assim o modelo foi selecionado para o presente estudo (LUEPKE *et al.*, 1986).

#### **1.4.2 O estresse oxidativo no acidente**

O estresse oxidativo consiste em um desequilíbrio biológico manifestado quando a proteção fornecida pelos agentes antioxidantes presentes no local não são capazes de remover as espécies reativas de oxigênio (ROS), permitindo que ocorra a ação oxidante devido a esse excesso, ocasionando danos as células e conseqüentemente afetando os tecidos da região (STRAPAZZON *et al.*, 2014). O estresse oxidativo no envenenamento botrópico é principalmente perceptível nos efeitos locais, nos quais têm sua ação potencializada pela inflamação e pelos danos causados as estruturas teciduais do acidentado através das PLA2's, SVMP's e SVPS's como abordado anteriormente, entretanto durante muito tempo foi um fenômeno pouco estudado na terapêutica dos acidentes ofídicos, tendo sua grande importância elucidada pela comunidade científica em estudos mais recentes publicados nas últimas décadas (SUNITHA *et al.*, 2015; STRAPAZZON *et al.*, 2014).



O papel da inflamação no incremento desse efeito está relacionado ao aumento do fluxo sanguíneo por meio da formação de edemas aliado ao grande recrutamento de neutrófilos que ocorre no local inicial da picada, essa grande quantidade de células de defesa é estimulada a maturar em macrófagos que produzem mais citocinas, aliando-se com as já presentes no veneno e aumentando ainda mais esse recrutamento, as células então serão estimuladas a produzir espécies reativas de oxigênio (NERY *et al.*, 2020; SUNITHA *et al.*, 2015), além disso segundo Strapazon e colaboradores(2014), também terá a ação das LAAOS produzindo diversos ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, o  $H_2O_2$  então irá danificar a membrana celular e mitocondrial das células locais (HIU *et al.*, 2020), potencializando ainda mais o estresse oxidativo, entretanto ainda não é conhecido com clareza o mecanismo pelo qual as L-aminoxidases realizam esse efeito, vale ressaltar que a informação contida no estudo de Strapazon é bem referenciada em diversos estudos (HIU *et al.*, 2020 ;SUNITHA *et al.*, 2015). As PLA2s também desempenham papel crucial no estresse oxidativo, os danos causados a musculatura esquelética contribuem para grande liberação de conteúdo intracelular no meio extracelular e conseqüentemente o aumento de ROS, ademais, o influxo de potássio e ATP liberados após a destruição inicial das células musculares, bem como os danos ao DNA ocasionados pelas PLA2s têm relevante participação na citotoxicidade e inflamação, prolongando e potencializando os seus efeitos, que em conjunto com a necrose e a rhabdomiólise produzida no decorrer do envenenamento possuem elevada relevância no estresse oxidativo e inflamação (SUNITHA *et al.*, 2015). Além disso, o estresse oxidativo possui papel nos danos ao tecido renal, fator esse que segundo exposto no trabalho de Junior *et al* (2019) provavelmente é potencializado pela resposta inflamatória das células renais ao veneno, entretanto a forma como o estresse acontece na progressão e eventual lesão renal ainda não é bem documentada (JÚNIOR *et al.*, 2019).

Visto a importância desse fenômeno na terapêutica dos acidentes botrópicos e a percepção de diversos estudos sobre a provável inibição ou redução de danos pelo uso de antioxidantes (SANTHOSH *et al.*, 2013), selecionamos dois antioxidantes de fácil acesso que foram brevemente abordados nos tópicos a seguir, eles são a N-acetil-cisteína (NAC) e o ácido ascórbico (AA).

#### 1.4.2.1 *N-acetil-cisteína*

O NAC consiste basicamente na versão que foi acetilada do aminoácido L-cisteína, sendo um antioxidante muito estudado, com baixo custo de produção e boa estabilidade química, o que provavelmente justifica o fato de ser o mais utilizado em estudos atualmente (ALDINI *et al.*, 2018; ZHITKOVICH., 2019). Um dos motivos da grande relevância do NAC se dá pela sua capacidade de conferir proteção química indireta por meio da sua atuação como um precursor de glutathione (GSH), um tripeptídeo de elevada importância na resposta inflamatória e no estresse oxidativo por seu efeito antioxidante; esse processo ocorre após o NAC sofrer uma desacetilação, fornecendo sua cisteína para a célula, que a utiliza na biossíntese da glutathione (MILLEA., 2009;ALDINI *et al.*, 2018; ZHITKOVICH., 2019). Apesar de existirem inúmeras aplicações com dados robustos nas diversas áreas da saúde desde sua síntese em 1961 (ZAFARULLAH *et al.*, 2003), poucos estudos parecem explorar as possíveis interações do NAC com o veneno botrópico, o que reflete na carência de informações mais detalhadas sobre os seus efeitos nesse aspecto.

#### 1.4.2.2 *Ácido Ascórbico*

O AA é um antioxidante extremamente eficiente utilizado como um mecanismo de defesa celular contra o estresse oxidativo, sua importância nesse aspecto ocorre por sua capacidade de doar seu átomo de hidrogênio via ascorbato, esse ânion interage com radicais livres reduzindo-os, ademais a atuação da vitamina C é crítica para síntese de colágeno nos seres humanos e, apesar de sua grande relevância para saúde humana, os seus mecanismos químicos ainda não são bem compreendidos (OLIVEIRA *et al.*, 2015; NJUS *et al.*, 2020; RAGHU *et al.*, 2021).

O estudo realizado por OLIVEIRA e colaboradores (2015), utilizou a vitamina C, vitamina E e complexo B para testar a inibição de diversas funções biológicas desencadeadas pelo veneno botrópico e verificou que os complexos foram extremamente eficientes na inibição dos efeitos do envenenamento, a análise por atividade individual do ácido ascórbico demonstrou sua melhor inibição foi na ação proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni*, reduzindo seu efeito em 100%, além disso foi capaz de inibir significativamente as ações das PLAS da *B.*

*jararacussu*, sendo capaz de reduzir grandemente os efeitos hemorrágicos, proteolíticos e de coagulação, os cenários obtidos no estudo supracitado tem similaridades com os dados apresentados por esse projeto.

## 2 JUSTIFICATIVA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os acidentes ofídicos são considerados doença tropical negligenciada, devido à quantidade e às consequências de morbidade e de mortalidade que ocasionam. O gênero *Bothrops* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil e dependendo do agravamento o envenenamento por esta serpente pode levar a importantes sequelas, principalmente no local do acidente. O veneno botrópico possui o estresse oxidativo como uma característica marcante do seu efeito local, o que sugere a possibilidade de que o uso dos antioxidantes tenha potencial na redução dos danos teciduais, todavia o efeito de estresse oxidativo do envenenamento e a própria terapêutica com os antioxidantes ainda são pouco conhecidos.

A necessidade do desenvolvimento de novos estudos a procura de alternativas ou complementos a terapêutica do soro, tem sido um tema de grande importância na área de doenças tropicais, tendo em vista as consequências do envenenamento para as vítimas. Sendo assim, objetivamos analisar os possíveis efeitos inibitórios dos antioxidantes de baixo custo e fácil acesso: N-acetil-cisteína e ácido ascórbico frente aos efeitos tóxicos de duas serpentes de importância médica no Nordeste e Sudeste do País, respectivamente, a serpente de *B. ery* e de *B. jarar*. Além disso, utilizando como modelo de estudo o testada membrana corioalantóica em ovos embrionados de galinha (HET-CAM) que também é de fácil reprodução e baixo custo, o que facilita a continuidade de outros estudos e sua reprodutibilidade por outros pesquisadores, bem como sua utilização para pesquisas com compostos similares.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos tóxicos do veneno das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops erythromelas* e sua provável inibição, através do ensaio HET-CAM (Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Determinar o potencial de irritação dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops erythromelas* utilizando o Irritation Score como método de avaliação dos efeitos de lise vascular, hemorragia e coagulação.

Estudar o efeito inibidor da N-acetilcisteína frente a atividade dos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararacussu*, utilizando os testes em membrana corioalantóide HET-CAM.

Estudar o efeito inibidor do Ácido ascórbico frente a atividade dos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararacussu*, por meio dos testes em membrana corioalantóide HET-CAM.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Aspectos éticos**

A legislação brasileira realiza nenhuma menção a aspectos éticos em embriões de galinha, não obstante a maioria dos países não considera o embrião de galinha um animal vivo até o 17º dia de desenvolvimento embrionário (RIBATTI, 2016; CORRADO.,2007). Nos Estados Unidos, o *National Institute of Health* (NIH) estabeleceu que o embrião de galinha não tem sensações de dor até o 14º dia de desenvolvimento embrionário e, por isso, podem ser utilizados em experimentos sem qualquer restrição ética ou necessidade de aprovação prévia (National Institute of Health, 1991).

### **4.2 Local de realização do estudo**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica e o Laboratório de Toxinologia, ambos integrantes do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM-UFC).

### **4.3 Reagentes**

Todos os reagentes foram adquiridos por meio de compra na empresa Sigma-Aldrich®.

#### 4.4 HET-CAM

O HET-CAM foi o método escolhido para avaliar a interação do VBe e VBju devido seus aspectos éticos, simplicidade, baixo custo e por sua metodologia permitir a observação dos efeitos de forma eficiente (SCHRAGE *et al.*, 2010; LUEPKE *et al.*, 1986). Neste ensaio os ovos fecundados foram adquiridos na Companhia de Alimentos do Nordeste CIALNE S.A., localizada na avenida Presidente Costa eSilva, nº 2067 na cidade de Fortaleza no estado do Ceará, inscrita no CNPJ:07.220.874/0001- 01.

Os ovos fecundados da espécie *Gallus gallus domesticus* foram higienizados individualmente em água corrente e com leves esfregões com a parte mais delicada de uma esponja dupla-face, em seguida foram secados com papel toalha e feita antissepsia com álcool 70% e gazes estéreis, sendo então encaminhadas para uma chocadeira (Modelo IP35D, Premium Ecológica®) com sua temperatura controlada a 37 °C, com 60% de umidade. No quarto dia, os ovos foram retirados individualmente e expostos contra uma luz focal branca, possibilitando a confirmação visual do desenvolvimento embrionário e permitindo a marcação da câmara de ar com um círculo feito na casca imediatamente acima do centro da câmara com auxílio de um lápis comum, após a verificação os ovos embrionados eram encaminhados para uma incubadora de CO<sub>2</sub> (Modelo MCO-17AC, Sanyo Scientific®) dentro de copos plásticos de 50 mL em posição de abertura, com a demarcação do lápis de face para cima. No décimo dia, os ovos embrionados eram retirados individualmente para realização do experimento.

O ensaio foi realizado da seguinte forma: com o manuseio delicado de uma tesoura de castroviejo foi feita uma pequena abertura na parte demarcada e partindo desta incisão foi possível expandir a abertura, até que toda a câmara de ar se tornasse totalmente exposta e permitisse a remoção da membrana coquilífera e a objetivada exposição da membrana corioalantóide. Após a exposição da mesma, foi administrado o composto teste, sendo observado e gravado durante 5 minutos, verificando qualquer ação classificada como potencial irritante (hemorragia, coagulação ou lise de vasos). Dado o início do tempo marcado, qualquer manifestação de algum desses eventos supracitados foi registrada para posterior medição do irritation score e ao atingir as marcas de tempo de 0,30,120 e 300 segundos foram tiradas fotos, após o experimento ser encerrado foi feita a eutanásia dos ovos por meio de cortes nos vasos sanguíneos, possibilitando o descarte seguro do material biológico.

#### 4.4.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram classificados em 12 categorias, com 6 ovos por seção de um total de 72 ovos, sendo elas:

- Controle negativo: consiste em ovos inoculados com o tampão fosfato-salino (PBS), classificado como não irritante.
- Controle positivo: Consiste em ovos inoculados com NaOH, uma substância classificada como extremamente irritante.
- VBju: 6 ovos inoculados somente com veneno de *B. jararacussu*.
- VBju+AA 1:1: 6 ovos inoculados com VBju e ácido ascórbico na relação 1:1.
- VBju+AA 1:10: 6 ovos inoculados com VBju e ácido ascórbico na relação 1:10.
- VBju+NAC 1:1: 6 ovos inoculados com VBju e N-acetil-cisteína na relação 1:1.
- VBju+NAC 1:10: 6 ovos inoculados com VBju e N-acetil-cisteína na relação 1:10.
- VBe: 6 ovos inoculados somente com veneno de *B. erythromelas*.
- VBe+AA 1:1: 6 ovos inoculados com VBe e ácido ascórbico na relação 1:1.
- VBe+AA 1:10: 6 ovos inoculados com VBe e ácido ascórbico na relação 1:10.
- VBe+NAC 1:1: 6 ovos inoculados com VBe e N-acetil-cisteína na relação 1:1.
- VBe+NAC 1:10: 6 ovos inoculados com VBe e N-acetil-cisteína na relação 1:10.

O grupo controle negativo recebeu 200  $\mu$ L de PBS e o controle positivo, 200  $\mu$ L de NaOH 0,1M. Os venenos utilizados foram incubados anteriormente a realização do experimento em um tratamento no banho maria a temperatura de 37 °C por 30 minutos. No grupo tratado com VBe, foram diluídos 5 $\mu$ g do veneno em 200 microlitros de PBS para aplicação no início do experimento, o mesmo foi feito com o grupo de VBju. Os grupos contendo as substâncias antioxidantes de concentração 1:1 e 1:10 foram incubados previamente com 200  $\mu$ L de PBS, sendo combinados com 5 $\mu$ g do veneno alvo apenas antes da aplicação na CAM.



#### 4.4.2 Irritation Score (IS)

O *Irritation Score* (IS) foi demonstrado por Luepke e Kemper no ano de 1986 em seu artigo sobre o método de HET-CAM, sua aplicação era de analisar o grau de irritabilidade de uma substância baseado em três efeitos observáveis na membrana: Hemorragia, Lise de Vasos e Coagulação. O Irritation Score possui 4 classificações para caracterizar o potencial de irritação análogas ao teste de Draize(Tabela 3), sendo calculado por meio da seguinte fórmula:

$$IS = 5 \left( \frac{301 - secH}{300} \right) + 7 \left( \frac{301 - secL}{300} \right) + 9 \left( \frac{301 - secC}{300} \right)$$

**H:** Denotando Hemorragia

**L:** Denotando Lise de Vasos

**C:** Denotando Coagulação

**Sec:** Expressa o tempo inicial em segundos

**5:** Constante de Hemorragia que deve multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito.

**7:** Constante de Lise vascular que multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito.

**9:** Constante de Coagulação que multiplicar o tempo em segundos em que ocorreu o efeito.

**300:** Tempo total do experimento que deve dividir cada fração

**Tabela 3 – Forma de classificação do Irritation Score**

Intervalo de Escore de Irritação	Classificação
0,0 – 0,9	Não Irritante
1,0 – 4,9	Irritante Leve
5,0 – 8,9	Irritante Médio
9,0 – 21	Irritante Severo

Fonte: Adaptado pelo autor baseado no trabalho de Luepke e Kemper,1986.

#### ***4.4.3 Análise estatística***

Inicialmente realizou-se a análise descritiva das variáveis quantitativas (média e desvio padrão) e, posteriormente, tais variáveis foram analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Tendo em vista que os resultados obtidos são considerados escores e, por isso, diversos grupos não seguiram uma distribuição normal, as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn.

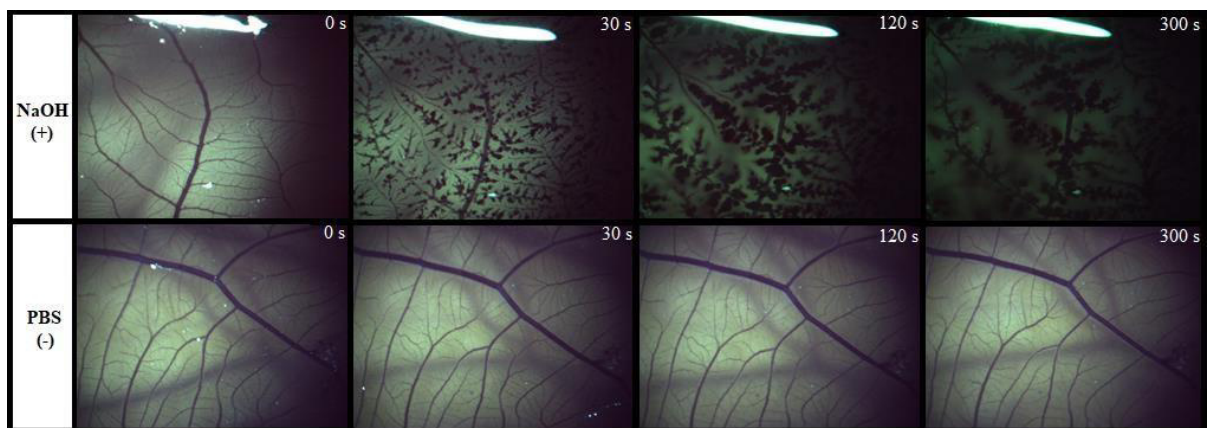
Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), ou seja, consideraram-se estatisticamente significantes valores de P menores que 0,05. O software GraphPad Prism® versão 8.01 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA) foi utilizado para a realização dos procedimentos estatísticos e elaboração dos gráficos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Interação *Bothrops jararacussu* (VBju) + Ácido ascórbico.

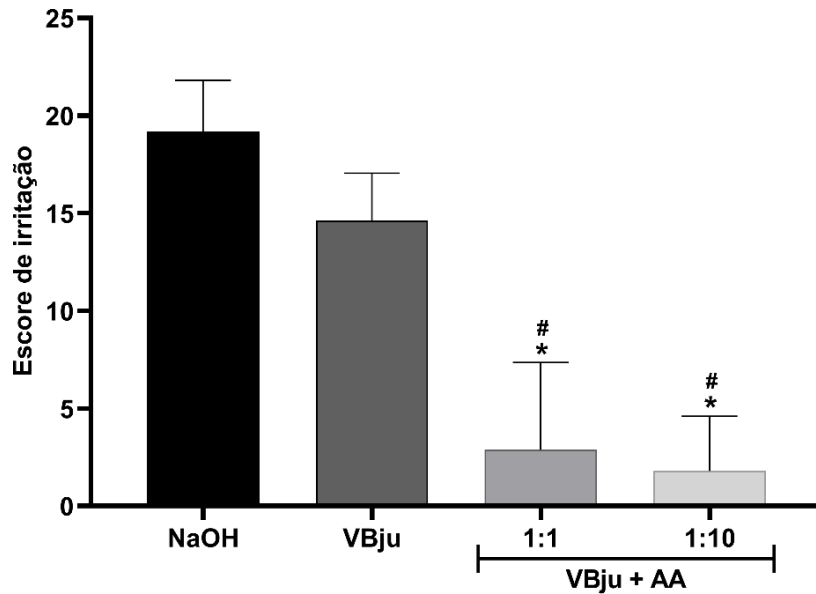
A avaliação por critérios de Irritation Score no HET-CAM demonstrou que o NaOH (Figura 1) pode ser classificado como Irritante Severo, apresentando o maior Irritation Score entre as misturas/substancias testadas. O VBju ocupou o segundo lugar no nível de irritação demonstrado pela tabela, também sendo classificado como Irritante Severo. O conjunto VBju +AA 1:1 e o VBju +AA 1:10 apresentou diferença na irritação quando comparado aos grupos tratados com NaOH e somente veneno, demonstrando uma queda no escore de irritação ambos sendo classificados como Irritante Leve (Gráfico 1). Ademais, houve diferença na redução do escore de irritação em 1,67 pontos quando comparado os dois grupos (AA 1:1 e AA 1:10). Os quadros típicos locais do envenenamento se manifestavam por volta de 37 - 40 segundos de experimento somente com VBju, tendo seus efeitos atingindo “pico” entre 117-300. No caso dos tratados com AA, poucas alterações visíveis foram observadas e em especial no grupo AA 1:10 não foram percebidas mudanças no tecido (Figura 2).

**Figura 1 – Grupos no ensaio HET-CAM incubados com controle negativo (PBS) e positivo (NaOH) versus tempo (s).**



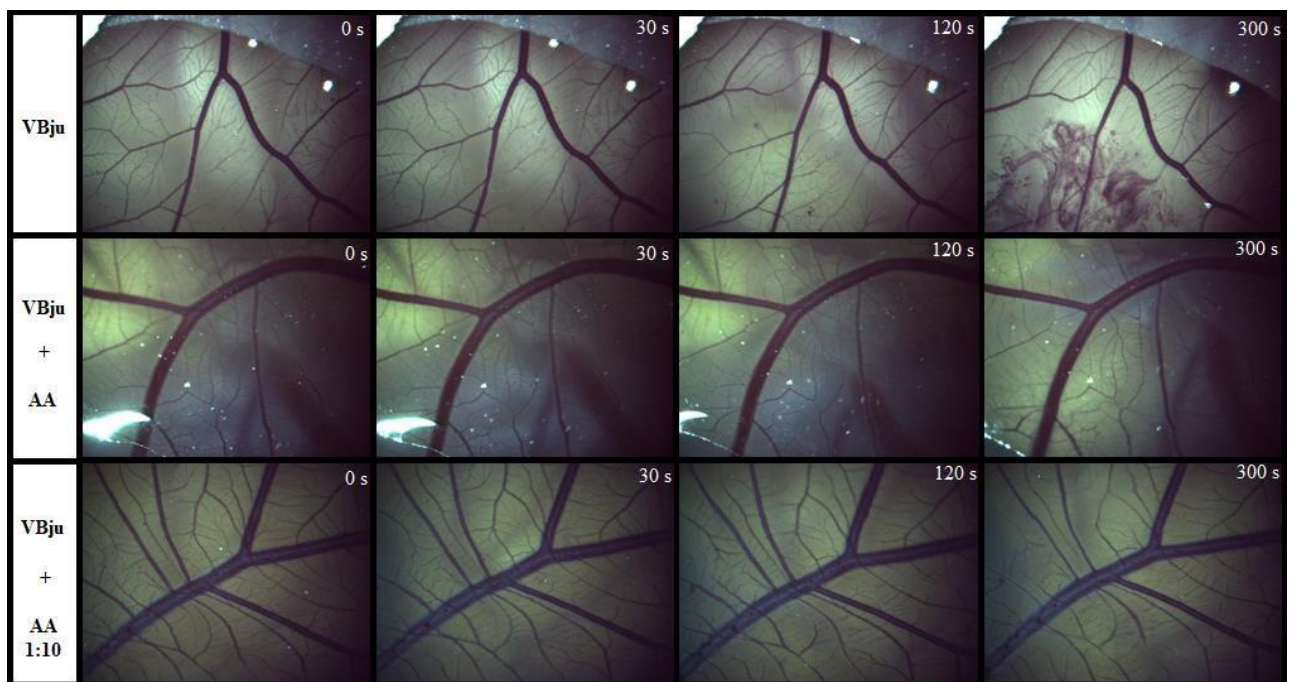
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Gráfico 1 – Discrepância entre os Escores de irritação do grupo controle x grupo tratado (VBju).**



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \* denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NaOH ( $P < 0,05$ ); # denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VBju ( $P < 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 2 – Grupos do ensaio HET-CAM com incubados veneno de *Bothrops jararacussu* (VBju) e ácido ascórbico (AA) versus tempo (s).**

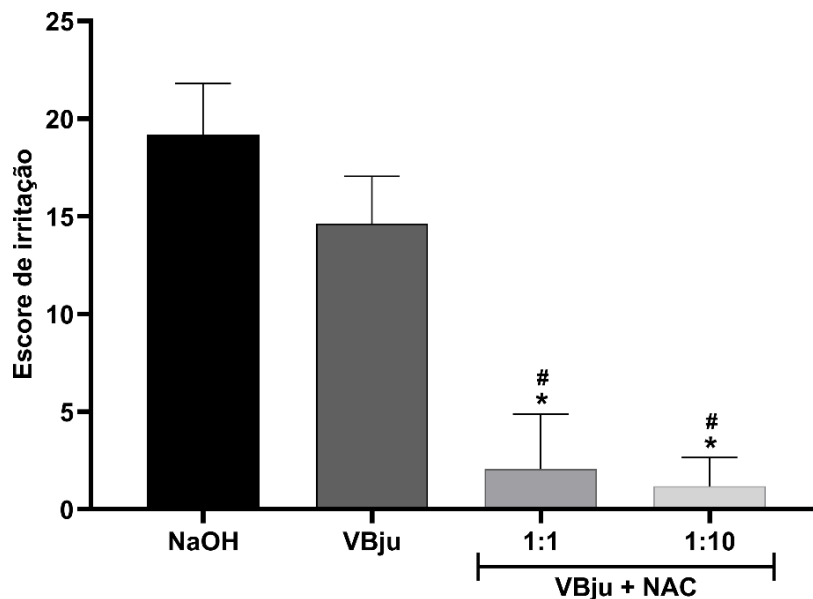


Fonte: Elaborado pelo Autor

## 5.2 Bothrops jararacussu (VBju )+ NAC

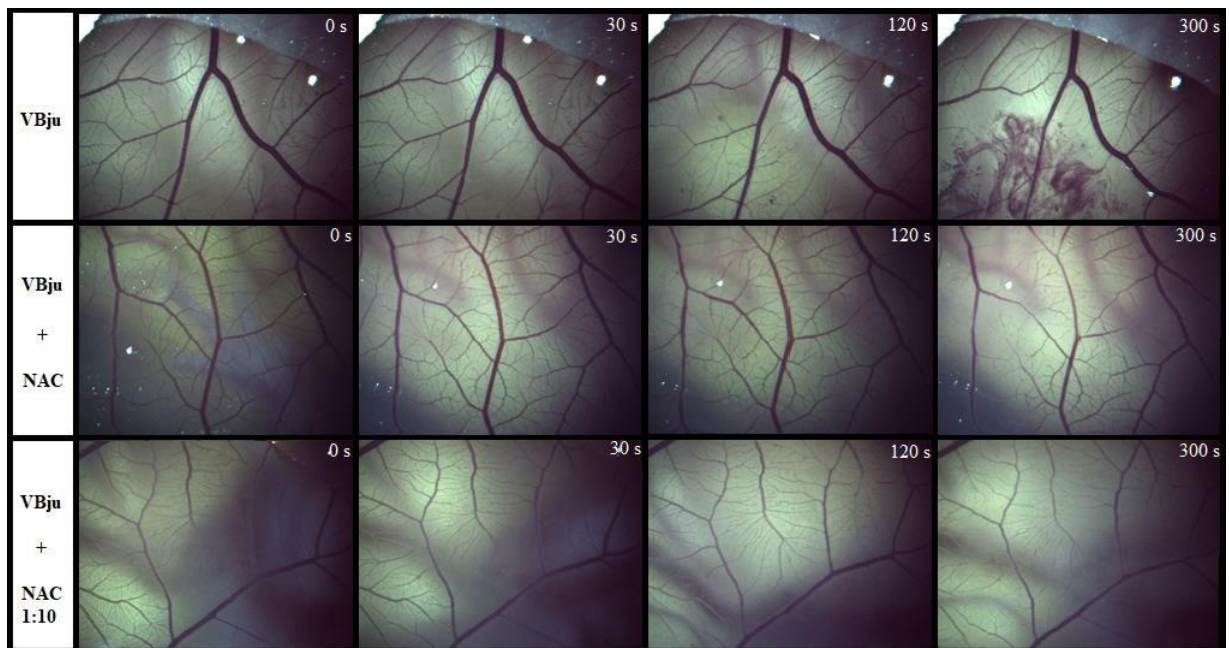
O conjunto VBju + NAC e VBju + NAC 1:10 apresentou grande diferença na irritação quando comparado aos grupos tratados com NaOH e somente veneno (Figura 3), demonstrando uma queda significativa no escore de irritação e sendo classificado como Irritante Leve (Gráfico 2). Assim como no exibido no primeiro grupo apresentado as imagens da Figura 3 demonstrando a progressão da irritação ao longo dos tempos 0,30,120,300 segundos. Os grupos tratados com NAC apresentaram melhor eficiência na redução dos efeitos de VBju, entretanto as dosagens diferentes de NAC 1:1 e NAC 1:10 apresentaram uma discrepância mínima no irritation score.

**Gráfico 2 – Discrepância entre grupos por análise de Irritation Score (VBju)**



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \* denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NaOH ( $P < 0,05$ ); # denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VBe ( $P < 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 3 - Grupos do ensaio HET-CAM incubados com veneno de *Bothropsjararacussu* (VBju) e N-acetil-cisteína (NAC) versus tempo (s).**



Fonte: Elaborado pelo Autor.

**Tabela 4 - Comparativo do Irritation Score de todas as substâncias testadas (VBju)**

Grupo Experimental	Escore de irritação	Classificação
Controle	0,00 ± 0,00	Não Irritante
NaOH	19,18 ± 2,64	Irritante Severo
VBju	14,64 ± 2,42	Irritante Severo
VBju+NAC 1:1	2,06 ± 2,83 <sup>a,b</sup>	Irritante Leve
VBju+NAC 1:10	1,18 ± 1,48 <sup>a,b</sup>	Irritante Leve
VBju+AA 1:1	2,88 ± 4,48 <sup>a,b</sup>	Irritante Leve
VBju+AA 1:10	1,79 ± 2,81 <sup>a,b</sup>	Irritante Leve

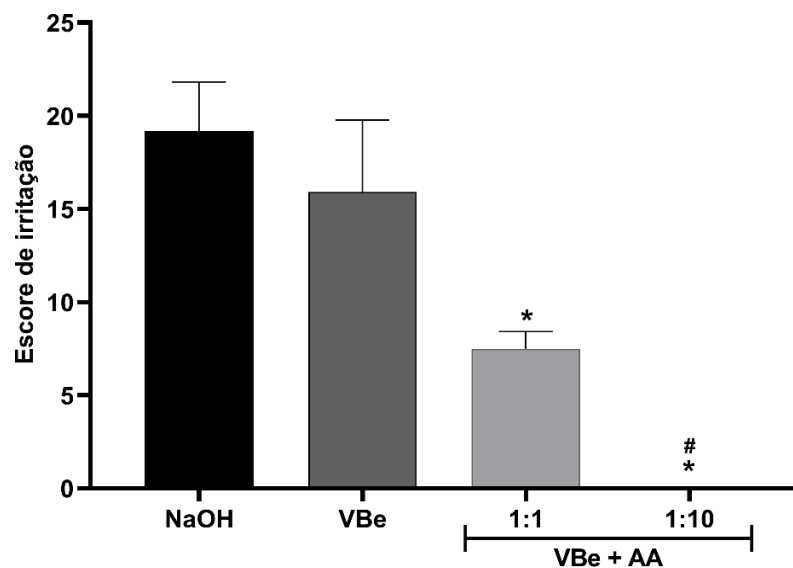
Valores de escore de irritação expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NaOH ( $P < 0,05$ ); <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VBe ( $P < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3 *Bothrops erythromelas* + Ácido ascórbico

O VBe foi classificado com Irritante Severo, ficando abaixo apenas do controle positivo. O complexo VBe + AA 1:1 apresentou redução na classificação quando comparado com o grupo tratado apenas com veneno sendo posicionado com Irritante Moderado, já VBe + AA 1:10 demonstrou eficiência no irritation score reduzindo a classificação para Não Irritante

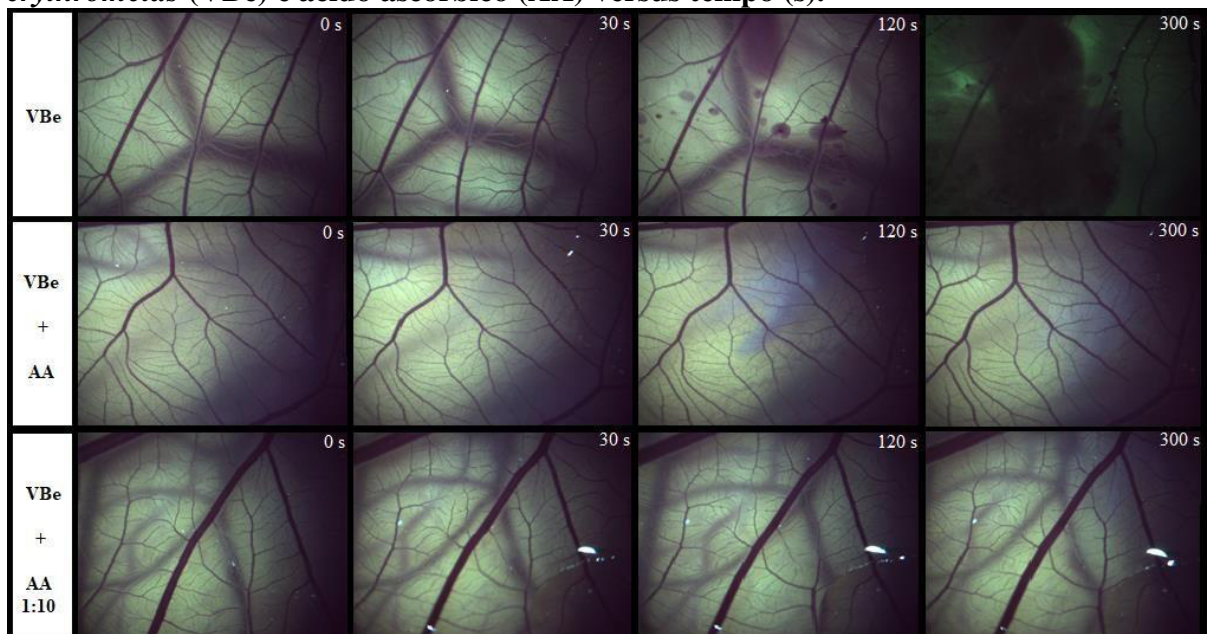
(Tabela 5, Figura 4). Os quadros típicos locais do envenenamento se manifestavam por volta de 37 - 40 segundos de experimento no grupo apenas com VBe, tendo seus efeitos atingindo “pico” entre 117-300. No caso dos tratados com AA, poucas alterações visíveis foram observadas e em especial no grupo AA 1:10 não foram percebidas mudanças no tecido.

**Gráfico 3 – Discrepância entre os Escores de irritação do grupo controle x grupo tratado (VBe).**



Resultados expressos como média ± desvio padrão. \* denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NaOH ( $P < 0,05$ ); # denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VBe ( $P < 0,05$ ). Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 4 - Grupos do ensaio HET-CAM com incubados com veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) e ácido ascórbico (AA) versus tempo (s).**

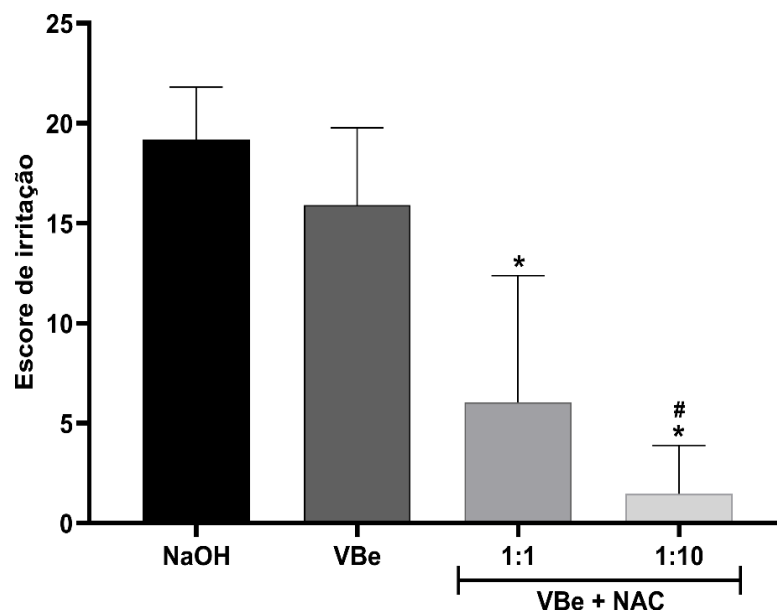


Fonte: Elaborado pelo Autor.

#### 5.4 Bothrops erythromelas + NAC

O VBe, assim como no experimento anterior, foi classificado como segundo colocado no Irritation Score nesse ensaio, sendo classificado como Irritante Severo. O grupo VBe + NAC 1:1 recebeu a classificação de Irritante Médio, enquanto o complexo VBe + NAC 1:10 potencializou mais essa redução e foi classificado como Irritante Leve (Gráfico 4; Tabela 5). Nos casos tratados com NAC, a manifestação dos sintomas variava com os indivíduos ao longo do tempo e poucas alterações visíveis foram observadas ( Figura 5).

**Gráfico 4 – Discrepância entre os Escores de irritação do grupo controle x grupo tratado (VBe).**



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \* denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NaOH ( $P < 0,05$ ); # denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VBe ( $P < 0,05$ ).

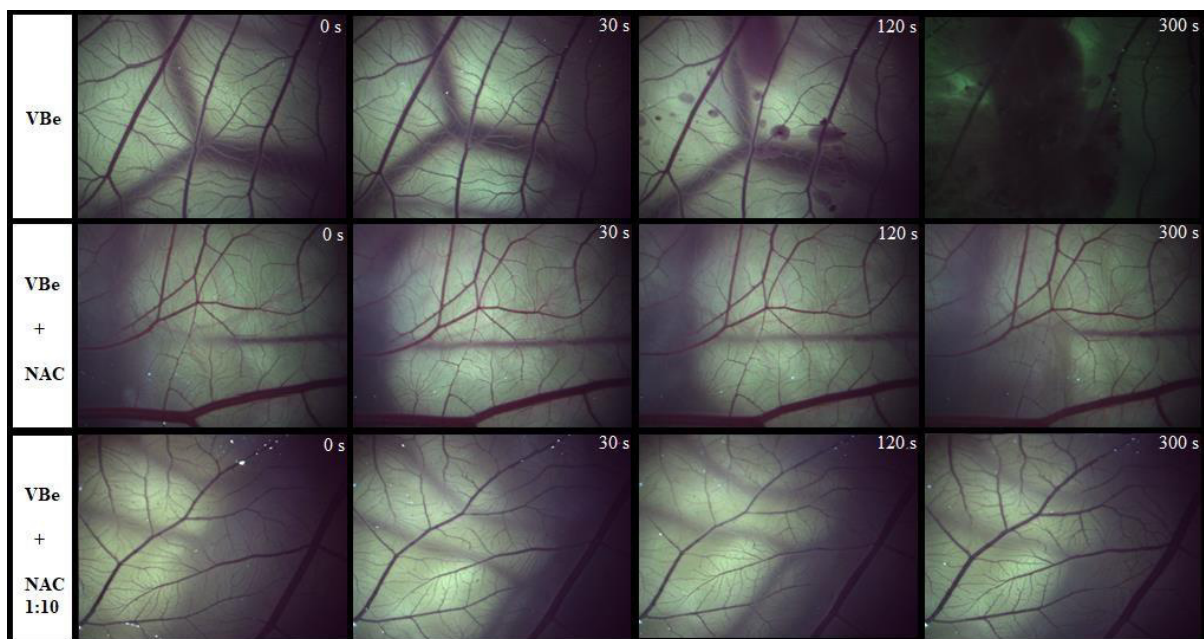


**Tabela 5 - Comparativo do Irritation Score de todas as substâncias testadas (VBe)**

Grupo Experimental	Escore de irritação	Classificação
Controle	0,00 ± 0,00	Não Irritante
NaOH	19,18 ± 2,64	Irritante Severo
VBe	15,90 ± 3,87	Irritante Severo
VBe+NAC 1:1	6,04 ± 6,34 <sup>a</sup>	Irritante Moderado
VBe+NAC 1:10	1,47 ± 2,43 <sup>a,b</sup>	Irritante Leve
VBe+AA 1:1	7,50 ± 0,92 <sup>a</sup>	Irritante Moderado
VBe+AA 1:10	0,00 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	Não Irritante

Valores de escore de irritação expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NaOH ( $P < 0,05$ ); <sup>b</sup> denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo VBe ( $P < 0,05$ ).

**Figura 5 - Grupos do ensaio HET-CAM com veneno de *Bothrops erythromelas* (VBe) e N-acetil-cisteína (NAC) versus tempo (s).**



Fonte: Elaborado pelo Autor.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados do experimento demonstram que VBe apresentou um escore de irritação maior que VBju, ambos sendo classificados como Irritantes Severos. O VBju respondeu melhor ao tratamento com antioxidantes, exceto no caso de VBe + AA 1:10 em que a inibição foi completa pelos parâmetros do HET-CAM, ou seja, não demonstrou sinais visíveis de coagulação, hemorragia ou lise de vasos. Existem algumas características, situações e hipóteses que podem justificar essa diferença, elas serão exploradas nos parágrafos abaixo.

O teste HET-CAM foi feito com uma dosagem de veneno padronizada para todos os grupos (5µg), ou seja, a *B. erythromelas* que é um animal pequeno e que injeta poucas quantidades de veneno quando comparado a *B. jararacussu*, teve o mesmo número amostral testado, o que pode levantar a hipótese que esse valor expresse uma percentual maior do veneno total de uma *B. erythromelas* em relação a outra serpente testada, visto que a *B. jararacussu* é um animal de grande porte e com a maior capacidade de injetar venenos dentre todas as *Bothrops* brasileiras, além disso, a ideia de volume compensar a eficiência do veneno é algo que pode ser observado em outras serpentes, como a mais venenosa do mundo, *Ophiophagus hannah*, pertencente à família dos Elapideos e sendo popularmente conhecida como cobra real, tem sua alta letalidade como consequência parcial da grande quantidade de veneno que é capaz de injetar, apesar de o mesmo ser moderadamente tóxico (TAN *et al.*, 2022; CARDOSO *et al.*, 2009; LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009). Deste modo, seria possível que os venenos possam ter potenciais de dano diferentes quando considerado o volume utilizado em um envenenamento natural? Vale observar que as duas serpentes foram expostas a pressões seletivas diferentes em relação as presas, enquanto a *B. erythromelas* caça animais de pequeno porte, a *B. jararacussu* preda animais maiores (CARDOSO *et al.*, 2009), o que não tornaria descartável a influência de uma dieta específica como pressão seletiva na eficiência do veneno (DALTRY *et al.*, 1996).

A diferença na composição do veneno pode exercer grande influência nos casos e por esse motivo ela será explorada em seguida. O VBju apresenta cerca de 25.7% do seu volume total composto por PLA2s, dos quais 83,3% delas são Lys-49, enquanto o veneno da *Bothrops erythromelas* apresenta de 10,1 a 15% do seu total de PLA2s, sendo todas do tipo Asp-49 (NAVES *et al.*, 2021; TASOULIS *et al.*, 2017; JORGE *et al.*, 2015). Dentre os diversos compostos dos venenos, as PLA2s são uma das que se destacam em causar danos nos tecidos, em especial por seus efeitos miotóxicos, sua ação se dá por meio da degradação da membrana, sendo subdivididas em dois subgrupos principais, as Asp-49 e Lys-49, possuindo a capacidade

de realizar ações conjuntas com as metaloproteinases dependentes de zinco(SVMPS) e potencializar o estresse oxidativo (MARINHO *et al.*,2021; BERNAL *et al.*, 2020;MONTEIRO *et al.*,2016) .

Neste mesmo contexto, apesar de VBe também conter grandes quantidades de PLA2 em seu veneno, ela apresenta esta característica não convencional de possuir apenas o tipo Asp - 49, que atua de forma cataliticamente ativa, o que pode ter relação com essas diferenças encontradas nos grupos. Ademais é provável que o fato de VBe possuir mais SVMPS na composição total do veneno que *B. jararacussu*, 32,5~59,9% e 26,2%, respectivamente, bem como o fato de elas serem não hemorrágicas do tipo P-III, como a berythrativase, influenciem nesses dados, visto que essas substâncias também atuam de maneira não convencional, assumindo a função principalmente de ativadores de protrombinas, sendo capazes de causar respostas que favorecem a inflamação por meio da liberação de óxido nítrico via estímulo das células endoteliais (SILVA *et al.*,2003; NERY *et al.*,2016;BALDO *et al.*,2010) e, portanto, desempenham papel importante no estresse oxidativo. Essas interações podem ser cruciais na maneira como os antioxidantes testados atuaram nos venenos, em especial no caso da grande discrepância entre os mesmos em relação a quantidade das SVMPS, as quais seriam supostamente combatidas com mais eficiência pelo ácido ascórbico devido à sua provável capacidade de inibição de proteases, fator esse notado por ROMMI *et al* (2006) ao perceber que pacientes com câncer tinham baixas taxas de vitamina C e verificaram que essa situação ocorria pela sua interação com as metaloproteases dependentes de zinco da matriz celular (ROOMI *et al.*,2006).

Sendo assim , ao analisar os grupos de VBe , foi demonstrado que o NAC 1:1 e AA 1:1 tiveram efeito de redução de uma categoria, de “Iritante Severo” para “Iritante Leve”, no potencial de irritação do veneno, e corroborando com as hipóteses recém elucidadas, os resultados apresentados nas dosagens 1:10 reduziram o escore de irritação para levemente irritante o NAC 1:10 e não irritante para AA 1:10, o que implica dizer que para os padrões do HET-CAM o VBe foi inibido.

Em concordância com a questão da variabilidade dos venenos, é importante elucidar que a presença de LAAO na composição dos mesmos pode ocasionar diferenças, principalmente neste caso visto que elas não foram detectadas no VBe, enquanto são cerca de 15% do veneno total de VBju (TASOULIS *et al.*, 2017). As LAAO atuam principalmente na formação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), amônia e alfa cetoácidos via desaminação de L-aminoácidos, gerando citotoxicidade e potencialização dos danos no envenenamento via estresse oxidativo, sendo assim um fator crucial para manutenção da

inflamação (PUCCA *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2015). Essa discrepância nas composições pode ser uma das razões pelo qual o ácido ascórbico, com sua ação de inibição de proteases previamente citada, foi capaz de inibir parcialmente VBe + AA 1:1 e totalmente VBe + AA 1:10, mas apresentou pouca alteração quando comparado VBju + AA 1:1 e VBju + AA 1:10, sugerindo a ideia de que isso possa ter ocorrido devido a VBju possuir esse mecanismo extra em alternativa as SVPS, PLA2s e SVMP, enquanto a *B.erythromelas* aparenta depender mais das suas SVMP.

As reações com NAC 1:1 demonstraram ser bem mais efetivas quando utilizadas com o VBju, enquanto as com NAC 1:10 não realizaram grandes mudanças no irritation score, o que pode indicar que ação que o NAC desempenhou no grupo 1:1 já estava perto de sua interação máxima com esse veneno e provavelmente se deve a sua capacidade de regeneração da glutathiona, sendo possível que a dosagem já seja suficientemente próxima do necessário para esse efeito ocorrer ou o NAC interagiu de alguma forma antes de essa degradação ocorrer? indagação essa que requer testes futuros para analisar se a inibição ocorreu durante a mistura com a interação dos compostos ou durante a ação do veneno no tecido, também é relevante novos testes com dosagens intermediarias que possam traçar o limite útil da interação do NAC (LAUSTSEN *et al.*, 2018). O mesmo fenômeno ocorreu com os grupos de AA 1:1 e AA 1:10, que no caso da VBju variou menos entre as dosagens, demonstrando menor efetividade que os grupos tratados com NAC. Além disso, um estudo feito por Marinho *et al* (2021) demonstra que as PLA2s Lys-49 de *Bothrops pauloensis* aumentaram a expressão de glutathiona nos rins, e que isso provavelmente ocorreu como uma tentativa de proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) que foram liberadas durante o envenenamento, tendo em vista que o NAC atua justamente nessa regeneração de glutathiona, é provável que essa seja a causa mais provável dessa diferença de eficiência no caso de VBju.

Salienta-se também que ao analisar trabalhos como os de Oliveira *et al* (2010), Jorge *et al* (2015), Tasoulis *et al* (2017), e Gutiérrez *et al* (2018) foi possível observar que a *Bothrops erythromelas* aparenta ter efeitos mais localizados quando comparada com os apresentados pelo envenenamento com *Bothrops jararacussu*, o que pode ter relação com a maior concentração de lectinas de VBe(8a 21,6%) em relação a VBju(9,7%), tendo em vista que essas substâncias agem na inflamação, estimulando a produção das citocinas TNF-alfa, IL-beta e IL-6 via ligação de galactosídeos (SVgalL), ou seja, são capazes de intensificar a inflamação localizada gerada pelo veneno, o que pode indicar a razão pela qual o grupo tratado somente com VBe tem um escore de irritação maior que VBju, apontando o questionamento sobre uma provável ação efetivamente mais

localizada da *B.erythromelas*, entretanto são necessários mais estudos que correlacionem a sintomatologia dos acidentados, bem como relações de composição dos veneno, que possa fornecer dados que confirmem essa ideia, além disso o objetivo do HET-CAM como experimento não é avaliar as ações completas do veneno, já que a proposta do mesmo é ser um ensaio inicial (LUEPKE *et al.*,1986).

## 7 CONCLUSÃO

O referente estudo fornece dados e meios suficientes para comprovar inicialmente a eficácia dos antioxidantes N-acetil-cisteína (NAC) e ácido ascórbico (AA) na inibição local dos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararacussu*, demonstrando redução significativa nas funções de coagulação, hemorragia e lise vasos, em todos os grupos e concentrações testados com NAC e AA, bem como inibição total de um destes, VBe + AA 1:10, de acordo com os parâmetros de Irritation Score do HET-CAM. Os principais efeitos inibidos nos grupos testados foram a hemorragia e a coagulação, sendo estes totalmente inibidos nos grupos de VBju + antioxidante em ambas as concentrações (1:1 e 1:10) e parcialmente inibidos no VBe + antioxidantes 1:1, sendo completamente inibidos quando expostos a concentração 1:10. O efeito em que foi observado menos alterações foi na lise de vasos, sendo totalmente inibida apenas no VBe + AA 1:10. Estudos posteriores em modelos animais mais complexos *in vivo* são necessários e incentivados para melhor compreensão dos efeitos demonstrados, todavia o trabalho cumpriu seu objetivo e obteve dados positivamente promissores, principalmente em relação ao ácido ascórbico.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Polianna Lemos Moura Moreira et al. Clinical assessment and pathophysiology of Bothrops venom-related acute kidney injury: a scoping review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, 2020.
- ALDINI, Giancarlo et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **Free radical research**, v. 52, n. 7, p. 751-762, 2018.
- ANTUNES, Thatiane C. et al. Comparative analysis of newborn and adult Bothrops jararaca snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1443-1458, 2010.
- ANDRIÃO-ESCARSO, Silvia H. et al. Myotoxic phospholipases A2 in Bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.
- AMORIM, Fernanda Gobbi et al. Proteopeptidomic, functional and immunoreactivity characterization of Bothrops moojeni snake venom: Influence of snake gender on venom composition. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 177, 2018.
- DA SILVA AGUIAR, Wesley et al. Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, v. 186, p. 67-77, 2020.
- BICKLER, Philip E. Amplification of snake venom toxicity by endogenous signaling pathways. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 68, 2020.
- BERNAL, Jorge Carlos Contreras et al. “Bad things come in small packages”: predicting venom-induced coagulopathy in Bothrops atrox bites using snake ontogenetic parameters. **Clinical toxicology**, v. 58, n. 5, p. 388-396, 2020.
- BALDO, Cristiani et al. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 6, p. e727, 2010.

BARBOSA, P. S. F. et al. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 376-386, 2005.

CORRADO, Márcia da Conceição et al. **Uso do método HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial**. 2007. Tese de Doutorado.

CORREA-NETTO, Carlos et al. Immunome and venom of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, 2010.

CEZARETTE, Gabriel Neves; SARTIM, Marco Aurélio; SAMPAIO, Suely Vilela. Inflammation and coagulation crosstalk induced by BJcuL, a galactose-binding lectin isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **International journal of biological macromolecules**, v. 144, p. 296-304, 2020.

CALIL-ELIAS, S. et al. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1233-1235, 2002.

CINTRA, A. C. O. et al. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **Journal of protein chemistry**, v. 12, n. 1, p. 57-64, 1993.

CHIPPAUX, Jean-Philippe. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 23, n. 1, p. 1-2, 2017.

CHIPPAUX, Jean-Philippe. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, p. 1-17, 2015.V

CUNHA, Fernanda Cristina et al. First report of hepatic hematoma after presumed *Bothrops* envenomation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 633-635, 2015.



CAZEDEY, Edith Cristina Laignier et al. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 759-766, 2009.

CARDOSO, João Luiz Costa. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2009. p. 540-540.

CAVALCANTE, Joeliton S. et al. Blood plasma proteome alteration after local tissue damage induced by Bothrops erythromelas snake venom in mice. **Journal of Proteomics**, v. 269, p. 104742, 2022.

DOS SANTOS CAVALCANTE, Joeliton et al. Pain modulated by Bothrops snake venoms: Mechanisms of nociceptive signaling and therapeutic perspectives. **Toxicon**, v. 201, p. 105-114, 2021.

CAVALCANTE, Joeliton dos Santos. Dano tecidual local causado por venenos de Bothrops: perspectivas tromboinflamatórias usando proteômica e biologia de sistemas. 2022.

DALTRY, Jennifer C.; WÜSTER, Wolfgang; THORPE, Roger S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537-540, 1996.

ELIFIO-ESPOSITO, S. L. et al. A C-type lectin from Bothrops jararacussu venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 782-799, 2007.

FÉLIX-SILVA, Juliana et al. Inhibition of local effects induced by Bothrops erythromelas snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v. 125, p. 74-83, 2017.

FRY, Bryan G. et al. Effectiveness of snake antivenom: species and regional venom variation and its clinical impact. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 22, n. 1, p. 23-34, 2003.

FREITAS-DE-SOUSA, Luciana A. et al. Size matters: an evaluation of the molecular basis of ontogenetic modifications in the composition of Bothrops jararacussu snake venom. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 791, 2020.

GUTIÉRREZ, José María et al. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms?. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 182, 2018.

GUTIÉRREZ, José María; LEÓN, Guillermo; BURNOUF, Thierry. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. **Biologicals**, v. 39, n. 3, p. 129-142, 2011.

GUTIÉRREZ, José María et al. The search for natural and synthetic inhibitors that would complement antivenoms as therapeutics for snakebite envenoming. **Toxins**, v. 13, n. 7, p. 451, 2021.

GOMES, Antoniel AS et al. The allosteric activation mechanism of a phospholipase A2-like toxin from Bothrops jararacussu venom: a dynamic description. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

HIU, Jia Jin; YAP, Michelle Khai Khun. Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: Phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. **Biochemical society transactions**, v. 48, n. 2, p. 719-731, 2020.

JÚNIOR, FA Nogueira et al. Bothrops alternatus snake venom induces cytokine expression and oxidative stress on renal function. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 2058-2068, 2019.

KNUDSEN, Cecilie et al. Engineering and design considerations for next-generation snakebite antivenoms. **Toxicon**, v. 167, p. 67-75, 2019.

LAUSTSEN, Andreas H. et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon**, v. 146, p. 151-175, 2018.

Longbottom, Joshua et al. Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. **The Lancet**, v. 392, n. 10148, p. 673-684, 2018. Longbottom, Joshua et al.

Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. **The Lancet**, v. 392, n. 10148, p. 673-684, 2018.

LIRA-DA-SILVA, Rêjane M. et al. Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009. LIRA-DA-SILVA, Rêjane M. et al. Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LOTTO, Nicholas P. et al. The absence of thrombin-like activity in Bothrops erythromelas venom is due to the deletion of the snake venom thrombin-like enzyme gene. **PLoS one**, v. 16, n. 4, p. e0248901, 2021.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6-7, p. 495-496, 1986.

MAMEDE, Carla Cristine Neves et al. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. **Toxicon**, v. 187, p. 10-18, 2020.

MARINHO, Aline Diogo et al. Bothrops pauloensis snake venom-derived Asp-49 and Lys-49 phospholipases A2 mediates acute kidney injury by oxidative stress and release of inflammatory cytokines. **Toxicon**, v. 190, p. 31-38, 2021.

MILLEA, Paul J. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. **American family physician**, v. 80, n. 3, p. 265-269, 2009.

MONTEIRO, Wuelton Marcelo et al. Bothrops atrox, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. **Toxicon: X**, v. 6, p. 100037, 2020.

MORA-OBANDO, Diana et al. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109846, 2014.

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

MOURA-DA-SILVA, Ana Maria et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.

MORAIS, Victor. Antivenom therapy: efficacy of premedication for the prevention of adverse reactions. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 24, 2018.

MORAIS, Isabel CO et al. L-aminoacid oxidase from Bothrops leucurus venom induces nephrotoxicity via apoptosis and necrosis. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132569, 2015.

NAVES, Maria Paula Carvalho et al. Mutagenic and genotoxic activities of Phospholipase A2 Bothropstoxin-I from Bothrops jararacussu in Drosophila melanogaster and human cell lines. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1602-1610, 2021..

NERY, Neriane Monteiro et al. An overview of Bothrops erythromelas venom. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 680-686, 2016. NERY, Neriane Monteiro et al. An overview of Bothrops erythromelas venom. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 680-686, 2016.

NJUS, David et al. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 159, p. 37-43, 2020.

OMARA, Timothy. Plants used in antivenom therapy in rural Kenya: ethnobotany and future perspectives. **Journal of Toxicology**, v. 2020, 2020.

OLIVEIRA, Carlos Henrique de Moura; ASSAID SIMÃO, Anderson; MARCUSSI, Silvana. Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by Bothrops venom. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 5, p. 845-852, 2016.

OLIVEIRA, Carlos HM et al. Inhibition of proteases and phospholipases A 2 from Bothrops atrox and Crotalus durissus terrificus snake venoms by ascorbic acid, vitamin E, and B-complex vitamins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 2005-2016, 2016.

PUCCA, Manuela B. et al. Chronic kidney failure following lancehead bite envenoming: a clinical report from the Amazon region. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, 2020.

PIRES, Weverson Luciano et al. Effect of BjuL, a lectin isolated from Bothrops jararacussu, on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in vitro**, v. 41, p. 30-41, 2017.

PIRES, Weverson Luciano et al. Lectin isolated from Bothrops jararacussu venom induces IL-10 release by TCD4<sup>+</sup> cells and TNF- $\alpha$  release by monocytes and natural killer cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 595-605, 2019.

RODRIGUES, Caroline Fabri Bittencourt et al. Clinical implications of ontogenetic differences in the coagulotoxic activity of Bothrops jararacussu venoms. **Toxicology Letters**, v. 348, p. 59-72, 2021.

ROOMI, M. Waheed et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion by human ovarian cancer cell line SK-OV-3 with lysine, proline, arginine, ascorbic acid and green tea extract. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 32, n. 2, p. 148-154, 2006.

RONCOLATO, Eduardo Crosara et al. Phage display as a novel promising antivenom therapy: a review. **Toxicon**, v. 93, p. 79-84, 2015.

ROMANELLI, Mayara A. et al. Revisiting the acute kidney injury in Wistar rats experimentally envenomated with Bothrops jararacussu venom. **Toxicon**, v. 199, p. 117-126, 2021.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of development**, v. 141, p. 70-77, 2016.

RYAN, Nicole M.; DOWNES, Michael A.; ISBISTER, Geoffrey K. Clinical features of serum sickness after Australian snake antivenom. **Toxicon**, v. 108, p. 181-183, 2015.

RAGHU, Ganesh et al. The multifaceted therapeutic role of N-Acetylcysteine (NAC) in disorders characterized by oxidative stress. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 8, p. 1202, 2021.

RITA, Paul et al. Snake bite, snake venom, anti-venom and herbal antidote. A review. **Int J Res Ayurveda Pharm**, v. 2, n. 4, p. 1060-7, 2011.

SANTHOSH, M. Sebastin et al. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. **Inflammation research**, v. 62, n. 7, p. 721-731, 2013.

SCHILLER, Herbert B. et al. Time-and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. **Molecular systems biology**, v. 11, n. 7, p. 819, 2015.

SOARES, Karla Samara Rocha et al. Antivenom production against Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas snake venoms using cross-linked chitosan nanoparticles as an immunoadjuvant. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 158, 2018.

SILVA, Ageane Mota da et al. Epidemiological and clinical aspects of snakebites in the upper Juruá River region, western Brazilian Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 50, p. 90-99, 2019.

DA SILVA SOUZA, Anderson et al. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. **Toxicon**, v. 145, p. 15-24, 2018.

SAZIMA, Ivan. Um estudo de biologia comportamental da jararaca, Bothrops jararaca, com uso de marcas naturais. **Mem. Inst. Butantan**, p. 83-99, 1988.

SCHATTNER, Mirta et al. The snake venom metalloproteases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. 2005.

SCHRAGE, Arnhild et al. Experience with the HET-CAM method in the routine testing of a broad variety of chemicals and formulations. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 38, n. 1, p. 39-52, 2010.

TASOULIS, Theo; ISBISTER, Geoffrey K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 290, 2017.

DA SILVA AGUIAR, Wesley et al. Ontogenetic study of Bothrops jararacussu venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, v. 186, p. 67-77, 2020.

DE SILVA, H. Asita; RYAN, Nicole M.; DE SILVA, H. Janaka. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. **British journal of clinical pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 446-452, 2016.

DA SILVA, Noelson MV et al. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by Bothrops snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 196-205, 2007.

DE ORNELLAS STRAPAZZON, Juliana et al. Systemic oxidative stress in victims of Bothrops snakebites. **journal of applied biomedicine**, v. 13, n. 2, p. 161-167, 2015

SOEIRO, Paula A. et al. Doxycycline treatment reestablishes renal function of Wistar rats in experimental envenomation with Bothrops jararacussu venom. **Toxicon**, v. 199, p. 20-30, 2021.

SUNITHA, K. et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. **Toxicon**, v. 98, p. 89-97, 2015.

SHARMA, Rachana D. et al. Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: a novel and strategic neutralization by melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 2, p. 240-254, 2015.

TEIXERA, Leda Fabiélen et al. Local and systemic effects of BdipTX-I, a Lys-49 phospholipase A2 isolated from Bothrops diporus snake venom. **Toxicon**, v. 141, p. 55-64, 2018.

TAN, Choo Hock; BOURGES, Aymeric; TAN, Kae Yi. King Cobra and snakebite envenomation: on the natural history, human-snake relationship and medical importance of *Ophiophagus hannah*. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 27, 2022.

WANDERLEY, Carlos Wagner de Souza et al. Bothrops jararacussu snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoïd-and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134-147, 2014.

WINKEL, Kenneth D.; MIRTSCHIN, Peter; PEARN, John. Twentieth century toxinology and antivenom development in Australia. **Toxicon**, v. 48, n. 7, p. 738-754, 2006.

ZAFARULLAH, Muhammad et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 1, p. 6-20, 2003.

ZHITKOVICH, Anatoly. N-acetylcysteine: antioxidant, aldehyde scavenger, and more. **Chemical research in toxicology**, v. 32, n. 7, p. 1318-1319, 2019.