



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NAYANA KEYLA SEABRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DAS PEÇONHAS DE *Bothrops atrox* E
Crotalus durissus ruruima CAPTURADAS NO ESTADO DO AMAPÁ E
HABILIDADE DO SORO ANTIBOTRÓPICO E ANTICROTÁLICO BRASILEIROS
NA NEUTRALIZAÇÃO DESTAS ATIVIDADES**

MACAPÁ-AP

2014

NAYANA KEYLA SEABRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS AÇÕES DAS PEÇONHAS DE *Bothrops atrox* E
Crotalus durissus ruruima CAPTURADAS NO ESTADO DO AMAPÁ E
HABILIDADE DO SORO ANTIBOTRÓPICO E ANTICROTÁLICO BRASILEIROS
NA NEUTRALIZAÇÃO DESTAS ATIVIDADES**

Dissertação para fins de obtenção do Título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, na área de concentração ensaios biológicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva

MACAPÁ-AP

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

597.96

O48

Oliveira, Nayana Keyla Seabra de.

Caracterização das ações das peçonhentas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* capturadas no Estado do Amapá e habilidade de soro antibotrópico e anticrotálico brasileiros na neutralização destas atividades / Nayana Keyla Seabra de Oliveira -- Macapá, 2014.

142 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Jocivânia Oliveira da Silva

1. Serpente peçonhenta. 2. Acidentes. 3. Soroterapia. 4. *Crotalus durissus ruruima*. 5. *Bothrops atrox*. I. Silva, Jocivânia Oliveira da, orient. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nayana Keyla Seabra de Oliveira

Caracterização das ações das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* capturadas no estado do Amapá e habilidade do soro antiofídico e anticrotálico brasileiros na neutralização destas atividades

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Área de Concentração: Ensaios Biológicos

Data da Avaliação: ____/____/____

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva

Instituição: Universidade Federal do Amapá

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Deyse de Souza Dantas

Instituição: Universidade Federal do Amapá

Assinatura: _____

Prof. Dr. César Luiz Guimarães

Instituição: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Lorane Izabel da Silva Hage Melim

Instituição: Universidade Federal do Amapá

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Silvia Maria Mathes Faustino

Instituição: Universidade Federal do Amapá

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha querida e saudosa
avó Arlinda Pacheco Seabra (*in memmorian*)
que se alegrava e emocionava
a cada conquista por mim obtida.
Amo-te para sempre

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me acompanha em todos os momentos e realizações conquistadas em minha vida, e por sempre colocar pessoas maravilhosas ao meu redor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro desta pesquisa, Edital universal 14/2011 - nº do processo 473024/2011-0.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha Orientadora Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva, pelos ensinamentos científicos, amizade, cobranças e profissionalismo durante toda a jornada. Se não fosse por sua ajuda não teria chegado até aqui. Muito obrigada!

Ao veterinário e amigo José Renato Ribeiro, pelo apoio e auxílio durante a manipulação das serpentes e coleta das peçonhas, obrigada!

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho por permitir a realização de parte desta pesquisa no Laboratório de Fármacos/UNIFAP e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Dr. Francisco Luís Franco, Biólogo e pesquisador científico do Instituto Butantan de São Paulo, pela sua simplicidade, contribuição na identificação da subespécie da serpente *Crotalus durissus* e vontade de ajudar mesmo de longe.

À Bióloga Camila Moreira Barreto Gomes, supervisora – Resgate de Fauna e Ictiofauna responsável pela captura, registro e identificação da serpente *Bothrops atrox*.

Ao Setor de Imunobiológico da Central de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos (CADI) pela gentil doação dos soros antiofídicos utilizados na pesquisa.

Agradeço à equipe de AMIGOS do Laboratório de Toxicologia/UNIFAP: Adolfo, Leide, Shyanne, Camila, Maxwell, Rafael, Samara, e aos ex alunos, hoje amigos: Alberto, Felipe, Juliana, Julianne, Gabriela, Gisele, Heloana, pela ajuda direta e indireta durante todos os experimentos a qualquer hora ou dia da semana.

Aos meus pais, Reny e Waldir pelo amor incondicional, conselhos, apoio e ensinamentos, obrigada por tudo. Amo vocês!

À minha irmã Mayara Seabra pelo seu contínuo apoio e incentivo, sempre presente para me ouvir e aconselhar sabiamente, não me deixando desistir nunca.

À todos meus familiares pelo carinho, em especial à minha madrinha Rosilene Seabra que viveu junto comigo, lado a lado, esta realização, apoiando-me e auxiliando-me no que fosse preciso sempre. Muito obrigada!

À minha querida tia Marilete Seabra, por ter sido a intermediadora do local de busca da *Crotalus* no município de Porto Grande.

Ao meu grande amigo Benedito Medeiros, pela amizade verdadeira que construímos e pela contribuição todas as vezes que precisei.

Ao amigo Robenilson, futuro biólogo, apaixonado por estas serpentes tanto quanto eu. Obrigada pela disposição de me acompanhar todas as vezes que precisamos realizar busca ativa e captura destas serpentes.

Às minhas melhores amigas, Gabriella, Larissa Marques, Dryele, desde o tempo da graduação, por sempre compreenderem as horas em que precisei me afastar para estudar e pela amizade e força demonstrada nos momentos de aflição.

A todos os amigos e amigas, distantes ou próximos, antigos ou novos, que sempre me estenderam a mão, se alegraram com minhas vitórias e aconselharam-me em meus erros. Muito obrigada!

“Confia no SENHOR e faze o bem; habitarás na terra,
e verdadeiramente serás alimentado.
Deleita-te também no SENHOR, e
te concederá os desejos do teu coração.
Entrega o teu caminho ao SENHOR;
confia nele, e ele o fará”.

(Salmo 37:3-5)

RESUMO

Os acidentes ofídicos apresentam alto índice de morbi-mortalidade representando um grave problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais. Peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, são ricas em enzimas de largo espectro de especificidade que causam lesões teciduais locais e alterações sistêmicas. A soroterapia é o único tratamento cientificamente validado para acidentes ofídicos, sendo capaz de reverter os efeitos sistêmicos da peçonha no organismo do indivíduo. No entanto, modificações na composição das peçonhas para a preparação do *pool* de antígenos utilizado nos processos de imunização e obtenção do soro antiofídico podem afetar a efetividade do mesmo. O presente estudo teve como objetivo caracterizar as ações das peçonhas de serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, capturadas no Estado do Amapá e avaliar a habilidade do soro antibotrópico e anticrotálico brasileiro na neutralização destas atividades. Trata-se de um estudo experimental, com ensaios *in vivo* e *in vitro* onde foram avaliadas as variáveis dependentes: edema, nocicepção, infiltrado inflamatório, hemorragia, miotoxicidade, letalidade, coagulação, hemólise indireta por fosfolipases A₂, atividade hialuronidásica e perfil eletroforético das proteínas das peçonhas. Os resultados indicaram que o soro antibotrópico foi eficaz na neutralização das atividades nociceptiva (2ª fase), inflamatória (peritonite), hemorrágica, miotóxica, coagulante e hemolítica indireta por fosfolipases A₂. Porém, o mesmo não conseguiu neutralizar a atividade edematogênica, a 1ª fase da nocicepção e a atividade hialuronidásica. O perfil eletroforético mostrou que as proteínas presentes na peçonha de *B. atrox*, possuíam peso molecular de aproximadamente 14, 23 e 50 kDa. Em relação ao soro anticrotálico, observou-se que o mesmo foi eficaz na neutralização das atividades miotóxica, letal, coagulante e hemolítica indireta por fosfolipases A₂, porém não foi observada a neutralização da atividade inflamatória (peritonite) e hialuronidásica. Os resultados também mostraram que a peçonha de *C. d. ruruima* não induziu edema, nocicepção e hemorragia, sendo assim, não foram realizados os ensaios com o soro anticrotálico na neutralização destas atividades. O perfil eletroforético da peçonha de *C.d. ruruima* apresentou proteínas com peso molecular aproximado de 10, 14 e 32 kDa. Portanto, os resultados deste estudo demonstraram que tanto o soro antibotrópico quanto o soro anticrotálico foram terapeuticamente eficazes na neutralização da maioria dos efeitos desencadeados pelas peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* capturadas no Estado do Amapá.

Palavras-chave: Peçonha. *Bothrops atrox*. *Crotalus durissus ruruima*. Soroterapia

ABSTRACT

The snakebites present high mortality rate, which represent a serious problem of public health, mainly in the tropical countries. Poisons of snakes such as *Bothrops* and *Crotalus*, are rich in enzymes of wide specificity spectrum that cause local tissues lesions and systemic alterations. The serotherapy is the only treatment scientifically validated for snakebites, being capable to revert the systemic effects of the poison in the individual's organism. However, modifications in the composition of the poisons for the preparation of the pool of antigens used in the immunization processes and obtaining of the antiophidic serum can affect the effectiveness of the process. The present study had as objective to characterize the actions of the poisons of snakes such as *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus ruruima*, captured in the State of Amapá and to evaluate the ability of the antitropic serum and Brazilian anticrotalic in the neutralization of these activities. It is an experimental study, with alive samples in and in vitro where were appraised the dependent variables: edema, nociception, infiltrated inflammatory, bleeding, myotoxicity, lethality, coagulation, indirect hemolysis for phospholipase A₂, hyaluronidasic activity and electrophoretic profile of the proteins of venoms. The results indicated that the antitropic serum was effective in the neutralization of the activities of nociceptive (2nd phase), inflammatory (peritonite), bleeding, myotoxic, clotting and indirect hemolytic by phospholipase A₂. However, the same didn't get to neutralize the oedema activity, to 1st phase of the nociception and the hyaluronidase activity. The electrophoretic profile showed that the present proteins in the poison of *B. atrox*, possessed molecular weight of approximately 14, 23 and 50 kDa. In relation to the anticrotalic serum, it was observed that it was effective in the neutralization of the indirect myotoxic, lethal, clotting activities by phospholipase A₂, however the neutralization of the inflammatory activity was not observed (peritonite) and hyaluronidasic. The results also showed that the poison of *C.d. ruruima* didn't induce edema, nociception and hemorrhages, being like this, the samples were not accomplished with the anticrotalic serum in the neutralization of these activities. The electrophoretic profile of the poison of *C.d. ruruima* presented proteins with approximate molecular weight of 10, 14 and 32 kDa. Therefore, the results of this study demonstrated that as much the antitropic serum as the anticrotalic serum were effective therapeutically in the neutralization of most of the effects unchained by the poisons of *Bothrops atrox* and *Crotalus durissus ruruima* which were captured in the State of Amapá.

Keywords: Venom. *Bothrops atrox*. *Crotalus durissus ruruima*. Antivenom

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Serpente <i>Bothrops atrox</i> capturada no estado do Amapá, na região de Santo Antônio do Jari, mês setembro de 2012.....	24
Figura 2 – Serpente <i>Crotalus durissus Ruruima</i> capturada no estado do Amapá, no município de Porto Grande, mês junho de 2013.....	25
Figura 3 – Distribuição dos acidentes ofídicos por macro-região. Brasil, 2008.....	30
Figura 4 – Ciclo de fabricação do soro.....	34
Figura 5 – Localização do Estado do Amapá, Brasil (adaptado).....	36
Figura 6 – Procedimento de aferição da pata do camundongo com o especímetro.....	43
Figura 7 – Procedimento de avaliação atividade nociceptiva através através do método Hunskaar (1985).....	46
Figura 8 – Determinação da DEM induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	67
Figura 9 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade edematogênica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	68
Figura 10 – Determinação da DEM induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	69
Figura 11A – Dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha da serpente <i>Bothrops atrox</i> – intervalo de 0-5 minutos.....	71
Figura 11B – Dose nociceptiva mínima (DNM) da peçonha da serpente <i>Bothrops atrox</i> – intervalo de 20-30 minutos.....	71
Figura 12A – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> – intervalo de 0-5'.....	72
Figura 12B – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> – intervalo de 20-30'.....	73
Figura 13 – Dose inflamatória mínima (DIM) da peçonha da serpente <i>Bothrops atrox</i>	76
Figura 14 – Efeito da administração da peçonha da serpente <i>Bothrops atrox</i> sobre a migração de células mononucleares para cavidade peritoneal de camundongos.....	77
Figura 15 – Efeito da administração da peçonha da serpente <i>Bothrops atrox</i> sobre a migração de células polimorfonucleares para cavidade peritoneal de camundongos.....	78

Figura 16 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	79
Figura 17 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da migração de células mononucleares induzidas pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	79
Figura 18 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da migração de células polimorfonucleares induzidas pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	80
Figura 19 – Dose inflamatória mínima (DIM) da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus ruruima</i>	82
Figura 20 – Efeito da administração da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus ruruima</i> sobre a migração de células mononucleares para cavidade peritoneal de camundongos.....	82
Figura 21 – Efeito da administração da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus ruruima</i> sobre a migração de células polimorfonucleares para cavidade peritoneal de camundongos.....	83
Figura 22 – Habilidade do soro anticrotálico na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	84
Figura 23 – Habilidade do soro anticrotálico na neutralização da migração de células mononucleares induzidas pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	84
Figura 24 – Habilidade do soro anticrotálico na neutralização da migração de células polimorfonucleares induzidas pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	85
Figura 25 – Determinação da dose hemorrágica (DHM) induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	86
Figura 26 – Halos hemorrágicos formados após administração peçonha <i>Bothrops atrox</i>	87
Figura 27 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	87
Figura 28 – Ausência de halo hemorrágico observado após administração de 0,05 mg/Kg/50µl PBS da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	89
Figura 29 – Determinação da dose miotóxica (DMM) induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	91
Figura 30 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	92
Figura 31 – Determinação da dose miotóxica (DMM) induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	95
Figura 32 – Habilidade do soro anticrotálico na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	95
Figura 33 – DL ₅₀ da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i> administrada por via	97

intraperitoneal em camundongos.....	
Figura 34 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da letalidade induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	98
Figura 35 – Dose coagulante mínima (DCM) da peçonha da serpente <i>Bothrops atrox</i>	100
Figura 36 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	101
Figura 37 – Dose coagulante mínima (DCM) da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus ruruima</i>	102
Figura 38 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	103
Figura 39 – Determinação da dose hemolítica indireta por fosfolipase A ₂ (DHeM) induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	104
Figura 40 – Placa de petri contendo meio com suspensão de gema de ovo incorporada em gel de agarose, onde se visualiza halo translúcido de 10 mm produzido pela peçonha <i>Bothrops atrox</i> (10µg/50µL PBS).....	105
Figura 41 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipase A ₂ induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	106
Figura 42 – Determinação da dose hemolítica indireta por fosfolipase A ₂ (DHeM) induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	107
Figura 43 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipase A ₂ induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	108
Figura 44 – Dose hialuronidásica mínima (DHdM) da peçonha da serpente <i>Bothrops atrox</i>	110
Figura 45 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hialuronidásica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	111
Figura 46 – Dose hialuronidásica mínima (DHdM) da peçonha da serpente <i>Crotalus durissus ruruima</i>	113
Figura 47 – Habilidade do soro anticrotático sobre a atividade hialuronidásica induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	113
Figura 48 – Perfis eletroforéticos das peçonhas totais de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i> em PAGE-SDS 17,5% com voltagem constante de 90V.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Determinação da DEM da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	43
Tabela 2 – Determinação da DEM da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	44
Tabela 3 – Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade edematogênica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	44
Tabela 4 – Determinação da DNM da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	45
Tabela 5 – Determinação da DNM da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	46
Tabela 6 – Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	47
Tabela 7 – Determinação da DIM da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	49
Tabela 8 – Determinação da DIM da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	49
Tabela 9 – Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	50
Tabela 10 – Avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	50
Tabela 11 – Determinação da DHM da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	51
Tabela 12 – Determinação da DHM da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	52
Tabela 13 – Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	52
Tabela 14 – Determinação da DMM da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	54
Tabela 15 – Determinação da DMM da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	54
Tabela 16 – Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	55
Tabela 17 – Avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	55
Tabela 18 – Determinação da DL ₅₀ da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	56

Tabela 19 – Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da letalidade induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	57
Tabela 20 – Determinação da DCM da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	58
Tabela 21 – Determinação da DCM da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	58
Tabela 22 – Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	59
Tabela 23 – Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	59
Tabela 24 – Determinação da DHeM da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	61
Tabela 25 – Determinação da DHeM da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i> ..	61
Tabela 26 – Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A ₂ induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	62
Tabela 27 – Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A ₂ induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Soros antiofídicos produzidos no Brasil.....	35
Quadro 2 – Indicação do número de ampolas de soros antipeçonha para tratamento de acidentes ofídicos.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
B	<i>Bothrops</i>
BCTA	Brometo de cetiltrimetilamônio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CADI	Setor de Imunobiológico da Central de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos
C.d.	<i>Crotalus durissus</i>
CK	Creatina quinase
Cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
DCM	Dose Coagulante Mínima
DEM	Dose Edematogênica Mínima
DHdM	Dose Hialuronidásica Mínima
DHeM	Dose Hemolítica Indireta Mínima
DHM	Dose Hemorrágica Mínima
DIM	Dose Inflamatória Mínima
DL ₅₀	Dose Letal Média
DMM	Dose Miotóxica Mínima
DNM	Dose Nociceptiva Mínima
g	Gramas
H	Horas
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
KDa	Kilodalton
Ma	Miliamper
µg	Micrograma
Mg	Miligrama
Kg	Kilograma
µL	Militro
mL	Militro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
Nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato de sódio anidro
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetro
PBA	Peçonha <i>Bothrops atrox</i>
PBS	Solução salina tamponada
PBSB	Peçonha <i>Bothrops atrox</i> e soro antibotrópico
PC	Peçonha <i>Crotalus durissus ruruima</i>
PCSC	Peçonha <i>Crotalus durissus ruruima</i> e soro anticrotático
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
pH	potencial hidrogênico
RPM	rotação por minuto
SAB	Soro Antibotrópico
SABL	Soro Antibotrópico-Laquétrico

SABC	Soro Antibotrópico-Crotálico
SAC	Soro Anticrotálico
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
V	Volt
URT	Unidade de Redução de Turbidez
Zn ²⁺	Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
1.1 SERPENTES.....	23
1.1.1 Serpente do gênero <i>Bothrops</i>.....	23
1.1.1.1 Espécie <i>Bothrops atrox</i>	24
1.1.2 Serpentes da espécie <i>Crotalus durissus</i>.....	24
1.1.2.1 Subespécie <i>Crotalus durissus ruruima</i>	25
1.2 PEÇONHAS DE SERPENTES.....	26
1.2.1 Variabilidade da peçonha de serpentes.....	26
1.2.2 Peçonha da serpente do gênero <i>Bothrops</i>.....	28
1.2.2.1 Peçonha da espécie <i>Bothrops atrox</i>	29
1.2.3 Peçonha da serpente <i>Crotalus</i>.....	29
1.2.3.1 Peçonha da subespécie <i>Crotalus durissus ruruima</i>	30
1.3 ACIDENTES OFÍDICOS.....	30
1.3.1 Acidente botrópico.....	31
1.3.2 Acidente crotálico.....	31
1.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	31
1.5 SOROTERAPIA.....	33
1.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DO AMAPÁ.....	36
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3 METODOLOGIA.....	39
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	39
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	39
3.2.1 Animais.....	39
3.2.2 Captura das serpentes.....	39
3.2.2.1 Coleta das Peçonhas.....	40
3.2.2.2 Preparação das soluções de peçonha.....	41
3.3 SOROS ANTIOFÍDICOS.....	41
3.4 NEUTRALIZAÇÃO DAS PEÇONHAS DE SERPENTES PELO SORO ANTIBOTRÓPICO E ANTICROTÁLICO BRASILEIRO.....	42
3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	42
3.5.1 Atividade Edematogênica.....	42

3.5.1.1	Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) das peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	43
3.5.1.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiros na neutralização da atividade edematogênica induzida pelas peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> ou de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	44
3.5.2	Atividade Nociceptiva.....	45
3.5.2.1	Determinação da dose nociceptiva mínima (DNM) das peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	45
3.5.2.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro na neutralização da atividade nociceptiva induzida pelas peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> ou de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	47
3.5.3	Atividade Inflamatória.....	47
3.5.3.1	Determinação da dose inflamatória mínima (DIM) das peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	48
3.5.3.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e do soro anticrotático na neutralização da atividade inflamatória induzida pelas peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> ou de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	49
3.5.4	Atividade Hemorrágica.....	50
3.5.4.1	Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) das peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	51
3.5.4.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro na neutralização da atividade hemorrágica induzida pelas peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> ou de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	52
3.5.5	Atividade Miotóxica.....	53
3.5.5.1	Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	53
3.5.5.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro na neutralização da atividade miotóxica induzida pelas peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> ou de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	55
3.5.6	Letalidade.....	56
3.5.6.1	Determinação da DL ₅₀ da peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	56
3.5.6.2	Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da letalidade.....	56
3.5.7	Atividade Coagulante.....	57
3.5.7.1	Determinação da dose coagulante mínima (DCM) das peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	57
3.5.7.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro na neutralização da atividade coagulante induzida pelas peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> ou de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	58
3.5.8	Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂.....	59
3.5.8.1	Determinação da dose hemolítica mínima (DHeM) das peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	60
3.5.8.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro	61

	na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A ₂	
3.5.9	Atividade Hialuronidásica.....	62
3.5.9.1	Determinação da dose hialuronidásica mínima (DHdM) das peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> e <i>Crotalus durissus ruruima</i>	63
3.5.9.2	Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade hialuronidásica induzida pelas peçonhas de <i>Bothrops atrox</i> ou de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	64
3.5.10	Perfil eletroforético das proteínas das peçonhas.....	64
3.6	DESTINAÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS.....	65
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1	ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA.....	66
4.1.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>.....	66
4.1.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	68
4.2	ATIVIDADE NOCICEPTIVA.....	70
4.2.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>.....	70
4.2.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	73
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA.....	74
4.3.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>.....	74
4.3.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	80
4.4	ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	85
4.4.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>.....	85
4.4.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	89
4.5	ATIVIDADE MIOTÓXICA.....	89
4.5.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>.....	89
4.5.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	93
4.6	LETALIDADE.....	96
4.6.1	Determinação da DL₅₀ induzida pela peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	96
4.7	ATIVIDADE COAGULANTE.....	99
4.7.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>.....	99
4.7.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	101
4.8	ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA POR FOSFOLIPASES A ₂	103
4.8.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>.....	103
4.8.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>.....	106
4.9	ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA.....	109

4.9.1	Peçonha de <i>Bothrops atrox</i>	109
4.9.2	Peçonha de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	112
4.10	PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DAS PEÇONHAS.....	114
5	CONCLUSÕES.....	117
	REFERÊNCIAS.....	118
	ANEXO A – Certificado Comitê de Ética em Pesquisa.....	137
	ANEXO B – Aprovação para Coleta e captura das serpentes do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).....	138

INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos apresentam alto índice de morbi-mortalidade representando um grave problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais. O Estado do Amapá, localizado no extremo Norte do Brasil, faz parte da vasta região Amazônica e possui ampla diversidade de serpentes peçonhentas, responsáveis pela ocorrência de acidentes ofídicos, causados principalmente por serpentes do gênero *Bothrops*.

Diversos estudos científicos têm demonstrado ao longo do tempo, que a composição das peçonhas de serpentes pode variar em função de alguns fatores, como habitat, idade e dieta do animal.

Peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, são ricas em enzimas de largo espectro de especificidade que causam lesões e até necrose nos tecidos locais, além de efeitos sistêmicos decorrentes de alterações nos sistema de coagulação e cardiovascular.

Os acidentes botrópicos, considerados de maior importância clínica, desencadeiam reações como edema, dor, eritema, cianose, necrose e efeitos sistêmicos representados por sangramentos, alterações cardiovasculares e renais. O envenenamento crotálico promove ações neurotóxicas, miotóxicas e coagulante.

A soroterapia é a única terapia cientificamente validada para acidentes ofídicos, sendo capaz de reverter os efeitos sistêmicos da peçonha no organismo do indivíduo. O Instituto Butantan e Vital Brazil são os principais produtores dos soros antiofídicos utilizados no Brasil para acidentes causados por serpentes peçonhentas. No entanto, modificações na composição das peçonhas de diferentes serpentes podem afetar a capacidade de neutralização dos soros anti-peçonha.

No Brasil, o *pool* de antígenos utilizado para a imunização de cavalos na obtenção do anti-peçonha botrópico é composto pelas peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*. A peçonha de *Bothrops atrox* não compõe o *pool* de antígenos utilizado na produção do soro antibotrópico.

Em relação aos antígenos utilizados na imunização de cavalos para obtenção do anti-peçonha crotálico fazem parte as peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, não constando a peçonha de *Crotalus*

durissus ruruima, provavelmente a única espécie de cascavel existente no Estado do Amapá, responsável por acidentes ofídicos.

Assim, estudos sobre a composição das peçonhas de serpentes que habitam diferentes regiões geográficas e os efeitos da soroterapia sobre essas ações desencadeadas em organismos vivos, são de extrema importância, pois poderão contribuir futuramente para a produção de anti-peçonhas com maior especificidade e eficácia nos tratamentos decorrentes de envenenamentos ofídicos.

Deste modo, este estudo possui relevância por contribuir com o conhecimento das espécies de serpentes existentes no Estado do Amapá, por avaliar os efeitos desencadeados pelas peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, e também por analisar a capacidade dos soros anticrotálico e antibotrópico em neutralizar as ações decorrentes destes envenenamentos.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 SERPENTES

Em todo o mundo, há aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, onde cerca de 600 são peçonhentas (CHIPAUX & GOYFFON, 1998), distribuindo-se em 465 gêneros e 20 famílias, sendo que destas, somente 410 são consideradas peçonhentas e classificadas de acordo com suas características morfológicas: *Viperidae*, *Elapidae*, *Hydrophiidae* e *Colubridae* (COSTA, 2010).

As serpentes peçonhentas, através de glândulas especializadas produzem toxinas e possuem aparelhos apropriados para inoculá-las (SILVA, BOCHNER & GIMÉNEZ, 2011). Apresentam presas anteriores; com orifício central ou sulco; pupilas em fenda; fosseta loreal, órgão sensorial termorreceptor; e cauda que afina abruptamente (GOMES, 2006). Especificamente serpentes do gênero *Crotalus* apresentam na extremidade da cauda guizo ou chocalho de cor amarelada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

As espécies de serpentes peçonhentas existentes no Brasil pertencem às famílias *Viperidae*, *Colubridae* e *Elapidae* (BRASIL, 2009), distribuídas em quatro gêneros *Bothrops* (jararaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu) e *Micrurus* (coral verdadeira) (SANTOS-FILHO, 2009).

1.1.1 Serpentes do gênero *Bothrops*

Existem 30 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* distribuídas por todo o Brasil, sendo que as mais conhecidas são: *Bothrops (B.) atrox*, encontrada no Norte do Brasil; *B. erythromelas*, Nordeste; *B. neuwiedi*, em todo o Brasil, com exceção do Norte; *B. jararaca*, Sul e Sudeste; *B. jararacussu*, cerrado da região central e em florestas tropicais do Sudeste; e *B. alternatus*, Sul (PINHO & PEREIRA, 2001).

Serpentes do gênero *Bothrops*, comumente conhecidas como jararacas, são peçonhentas, e podem ser encontradas nas Américas Central e do Sul. Suas diferentes espécies apresentam variabilidade nos padrões de coloração e tamanho, ação da peçonha, dentre outras características (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

1.1.1.1 Espécie *Bothrops atrox*

As serpentes da espécie *Bothrops atrox*, também conhecidas como Jararaca do Norte, Jararaca, Combóia, Jararaca-do-rabo-branco ou Cambéua, estão distribuídas no norte do Brasil, nas Guianas, Suriname, Venezuela, Equador, Peru, Colômbia, Bolívia e norte da Argentina (Figura 1) (DA SILVA, 2001).

São répteis terrestres, geralmente noturnos, encontrados em planícies tropicais. Serpentes adultas, atingem um comprimento total de 75 a 125 centímetros (cm) e seu padrão de cores e marcações do corpo apresentam variabilidade tanto na configuração quanto no grau de contraste (CALVETE *et al.*, 2011).

A *Bothrops atrox* é a principal serpente de interesse médico da região Norte do Brasil e maior causadora de acidentes letais na América do Sul (WALDEZ & VOGT, 2011).



Figura 1 - Serpente *Bothrops atrox* capturada no estado do Amapá, na região de Santo Antônio do Jari, mês setembro de 2012.
Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

1.1.2 Serpentes da espécie *Crotalus durissus*

As serpentes popularmente denominadas de cascáveis são representadas por apenas uma espécie no Brasil, a *Crotalus durissus* (C.d.). Dependendo da região pode apresentar diferentes subespécies predominantes: a) *Crotalus durissus terrificus*, encontrada com maior frequência nas regiões Sul oriental e meridional; b)

Crotalus durissus collineatus, encontrada nas regiões de Minas Gerais e Goiás; c) *Crotalus durissus cascavel*, encontrada na região de caatinga nordestina; d) *Crotalus durissus ruruima*, disposta na região Norte; e e) *Crotalus durissus marajoensis*, encontrada na ilha do Marajó (PINHO & PEREIRA, 2001).

Os machos costumam ser um pouco maiores que as fêmeas, podendo atingir aproximadamente 1,5 metros de comprimento (ALVES, 2010).

1.1.2.1 Subespécie *Crotalus durissus ruruima*

Serpentes da subespécie *Crotalus durissus ruruima*, conhecidas popularmente como cascavel, boicininga, maracambóia, são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas ou pedregosas e apresentam comportamento agressivo quando ameaçadas. É comumente encontrada nos limites entre Brasil, Venezuela e Guiana. Apresenta localização geográfica na América Latina em algumas regiões de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia, assim como também na América Equatorial (DO NASCIMENTO, 2000).



Figura 2 - Serpente *Crotalus durissus ruruima* capturada no estado do Amapá, no município de Porto Grande, mês junho de 2013.
Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

1.2 PEÇONHAS DE SERPENTES

Segundo Ferreira (2009) peçonha é excreção peçonhasa ou corrosiva de certos animais e de alguns insetos, usada geralmente como arma de defesa. A peçonha é considerada como proteína altamente complexa que é inoculada na corrente sanguínea através de dispositivos que o próprio animal tem para esta finalidade, como os dentes ou ferrões. Sendo assim, as serpentes que possuem presas inoculadoras são chamadas peçonhentas, e as que não possuem são chamadas não peçonhentas (NETO, 2001).

Assim, a peçonha nada mais é que uma especialização da saliva da serpente, onde esta adquire o poder de destruição das proteínas e de desencadear diversas reações nos seres vivos para que se possa realizar a digestão. Então, a peçonha para a serpente atua como suco digestivo (NETO, 2001).

As peçonhas de serpentes exibem versatilidade em sua composição e atividades biológicas, que pode ser devido a características próprias ou geneticamente variáveis; características de síntese protéica específica ou devido a fatores exógenos, como condições climáticas, habitat, idade e hábitos alimentares (FURTADO *et al.*, 2006).

Peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, são ricas em enzimas de largo espectro de especificidade que causam lesões e até necrose nos tecidos locais, sintomas sistêmicos decorrentes de alterações no sistema de coagulação e cardiovascular. Entre as proteínas presentes nessas peçonhas enfatiza-se: fosfolipases A₂, nucleotidasas L-aminoácido oxidases, metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, lectinas tipo C, dentre outras (DE PAULA, 2009).

1.2.1 Variabilidade da peçonha de serpentes

A variabilidade na composição das peçonhas de serpentes é um fenômeno presente em todos os níveis taxonômicos e pode ter um impacto tanto na pesquisa básica como no tratamento nos casos de acidentes ofídicos, incluindo a seleção da soroterapia e também a seleção de espécimes para a produção dos soros antiofídicos (MACKESSY *et al.*, 2003).

Atualmente, estudos realizados envolvendo peçonhas de serpentes têm servido à sistemática, até mesmo em nível filogenético permitindo determinar novas linhas de segregações por meio do estudo de peçonha de diferentes populações (GLENN & STRAIGHT, 1978; RAEL *et al.*, 1984; BRAZIL, 1984).

Esta variabilidade na composição e atividades biológicas das peçonhas de serpentes vem sendo documentada por diversos autores e pode ser observada em diversos níveis tais como variações interfamiliares, intergenéricas, interespecíficas, intraespecíficas, ontogenéticas, geográficas, sazonais e sexuais. A composição da peçonha está relacionada ao tipo de dieta de uma determinada espécie, uma vez que uma de suas principais funções é a captura e morte das presas (MACKESSY, 1993; DALTRY *et al.*, 1996).

Neste contexto, a dieta dos animais tem um papel de extrema importância, uma vez que a subjugação de presas é uma das principais funções das peçonhas (DALTRY *et al.*, 1996). A variabilidade em peçonhas tem implicações também na terapêutica dos acidentes. Ribeiro & Jorge (1990) e Kamiguti *et al.* (1986a) relataram alterações no tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por filhotes e adultos de serpentes *Bothrops jararaca*. Warrel (1997) contrasta a variabilidade verificada nas peçonhas com a terapêutica dos acidentes e relata diferenças em quadros clínicos de pacientes picados por serpentes de diferentes idades.

Alterações ontogenéticas nas peçonhas estão presentes na maioria das pesquisas que versam sobre variabilidade e as suas implicações permitem a elaboração das mais diversas hipóteses que, além de contribuírem para o entendimento da diversidade e complexidade das peçonhas, constituem ferramentas importantes para estudos sobre a biologia das espécies estudadas (MACKESSY *et al.*, 2003).

Chipaux, Willian & White (1991) enfatizam a importância de se conhecer esta variabilidade, pois peçonhas de indivíduos da mesma espécie podem apresentar diferenças na composição da peçonha, dependendo da região ecológica onde foram coletados e isto pode ter implicações regionais na eficácia do anti-peçonha.

As vias de administração da peçonha também são fontes de variação quando se estuda a sensibilidade de peçonhas. Vários trabalhos descrevem as ações das peçonhas de serpentes com relação às vias administradas,

principalmente para estudar os efeitos hemorrágicos. Bolaños (1984) foi um dos pioneiros nos estudos sobre a toxicidade de peçonhas de serpentes da Costa Rica, inoculando camundongos através das vias intraperitoneal e intravenosa; a via intravenosa apresentou maior sensibilidade à peçonha.

Da Rocha & Furtado (2005) estudaram a variação geográfica da peçonha de *Bothrops alternatus* através da atividade coagulante sobre o plasma analisando 61 amostras individuais de peçonha contrapostos ao pool da espécie (peçonha referência). Concluiu-se que a variação individual prevaleceu nas amostras, não apresentando correlação com as áreas de distribuição geográfica, mas a atividade coagulante das amostras de peçonha do nordeste foi menos ativa que na região central da área de distribuição de *B. alternatus*.

Assim, a relevância das variações na composição das peçonhas influenciadas por fatores biológicos como a variação intraespecífica ao nível geográfico, pode auxiliar na identificação de novas populações e mesmo variações individuais dentro de uma espécie de serpente, sendo importante tanto do ponto de vista da pesquisa científica, como na elaboração de pools de peçonha para a imunização na produção dos anti-peçonhas ofídicos (DA ROCHA, 2005).

Características filogenéticas, ontogenéticas, sexuais, ambientais ou de dieta podem alterar a composição das peçonhas trazendo consequências para os envenenamentos humanos e eficácia da soroterapia. Assim, o conhecimento acurado da composição das peçonhas pode conferir subsídios para escolhas cientificamente embasadas dos antígenos empregados na produção dos anti-peçonhas, além do que, pode indicar marcadores moleculares de relevância em taxonomia ou na identificação clínica dos sintomas em pacientes envolvidos em acidentes ofídicos (LOMONTE, 1994a).

1.2.2 Peçonha da serpente do gênero *Bothrops*

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* contém diferentes toxinas de natureza protéica, algumas com atividade enzimática, que podem atuar conjuntamente produzindo os principais efeitos lesivos sistêmicos e locais após a picada. Componentes de peçonhas de serpentes desse gênero, já foram isolados

como fatores hemorrágicos, enzimas que promovem distúrbios de coagulação e enzimas proteolíticas, cujo consequência é a destruição tecidual (CATARINO, 2011).

As toxinas das peçonhas de serpentes *Bothrops* ocasionam alterações fisiológicas sistêmicas que provocam sangramentos, alterações cardiovasculares e renais (WARRELL, 2007; LALLOO, 2009).

1.2.2.1 Peçonha da espécie *Bothrops atrox*

Entre os componentes enzimáticos presentes na peçonha de *Bothrops atrox* encontra-se fosfolipases A₂, fosfodiesterases, metaloproteases, serinoproteases, acetilcolinesterases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, entre outras. Estudo realizado com *Bothrops atrox* Amazônica, revelou que os componentes majoritários abundantes nesta peçonha são metaloproteinasas (61,6%), fosfolipases A₂ (14,6%) e serinoproteinasas (8,2%) (NEIVA *et al.*, 2009).

1.2.3 Peçonha da serpente *Crotalus*

A peçonha do gênero *Crotalus*, bioquimicamente, apresenta composição diversificada e complexa, formada por compostos inorgânicos (cerca de 10% do peso seco total), que apresentam papel importante na ativação de algumas enzimas; e por compostos orgânicos, como enzimas hidrolíticas, proteolíticas e não hidrolíticas, além de toxinas, responsáveis em grande parte pela toxicidade da peçonha (BARRAVIERA, 1994).

Dentre seus componentes orgânicos, a peçonha da *Crotalus* apresenta enzimas fosfodiesterase, L-amino-oxidase, 5-nucleotidase e toxinas como a crotoxina, convulxina, crotamina e giroxina (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004b). Além de induzir atividades tóxicas causando neurotoxicidade, paralisia respiratória, hipotensão, insuficiência renal aguda, miotoxicidade, hepatotoxicidade, alterações hemorrágicas e choque (CRUZ *et al.*, 2005; AMORA, 2005).

1.2.3.1 Peçonha da subespécie *Crotalus durissus ruruima*

A peçonha da *C.d. ruruima* é classificada de acordo com a sua coloração em branco ou amarelo. Desta maneira, encontram-se diferenças bioquímicas e biológicas nos diferentes tipos de peçonhas produzidas por um único animal, pois estudos demonstraram que a peçonha branca apresenta atividades letal, coagulante, miotóxica, edematogênica e hemolítica, enquanto que, a variedade amarela, além destas, também apresenta atividades hemorrágica, necrotizante e caseinolítica. Importante salientar que, estes dois tipos de peçonha podem ser produzidos pelo mesmo animal (DOS-SANTOS, 1993a).

1.3 ACIDENTES OFÍDICOS

Estima-se que cerca de 5,5 milhões de pessoas no mundo sofram acidentes ocasionados por serpentes, principalmente em países, como a África, Ásia e América Latina, representando um grave problema de saúde pública, atingindo principalmente, moradores de áreas rurais (WARRELL, 2010; WILLIAMS *et al.*, 2010).

No Brasil entre 2000 e 2009, foram notificados aproximadamente 24 mil acidentes ofídicos por ano, em maior quantidade e letalidade na região Norte do país com médias anuais de 6,77 mil vítimas e 33 óbitos (Figura 3) (BRASIL, 2009).

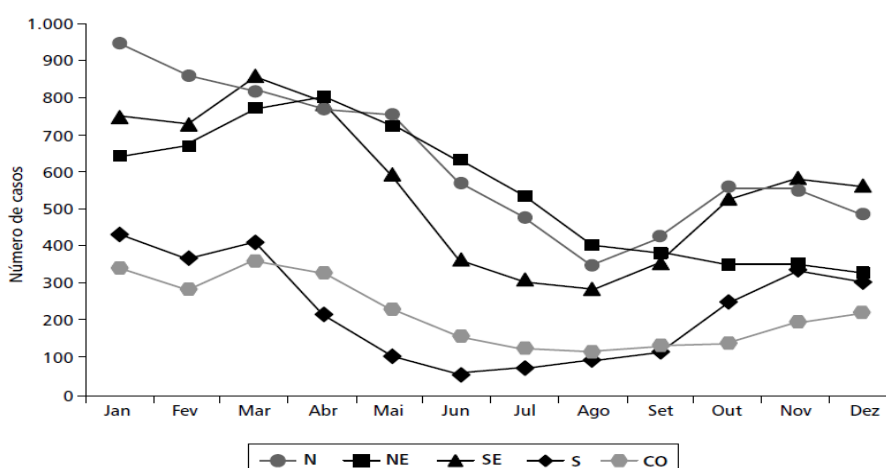


Figura 3 – Distribuição dos acidentes ofídicos por macro-região. Brasil, 2009
Fonte: Sistema de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde

1.3.1 Acidente botrópico

A maior parte dos efeitos locais e sistêmicos do envenenamento botrópico são mediados por metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases ácidas ou básicas e enzimas hidrolíticas, as quais liberam diferentes mediadores endógenos como peptídeos (bradicinina), aminas biogênicas (histamina e serotonina) e metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (GUTIÉRREZ & LÉON, 2009b).

Os acidentes botrópicos são considerados de maior importância clínica e incluem edema, dor, eritema, cianose e necrose (MAGALHÃES et al, 2011). De acordo com o Ministério da Saúde (2001), estes acidentes são classificados em leve, moderado e grave.

1.3.2 Acidente crotálico

Os acidentes crotálicos são classificados como leves, moderados e grave. Os acidentes leves apresentam sinais e sintomas neurotóxicos discretos, de aparecimento tardio, fâscies miastênica discreta, mialgia discreta, sem alteração da cor da urina. Os acidentes moderados apresentam sinais e sintomas neurotóxicos, como fâscies miastênica evidente, mialgia discreta ou provocada ao exame, e a urina pode apresentar coloração alterada. Já os acidentes considerados graves apresentam sinais e sintomas neurotóxicos evidentes, como fâscies miastênica, fraqueza muscular, mialgia intensa e urina escura, podendo haver oligúria ou anúria e insuficiência respiratória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

1.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório foi descrito inicialmente por Cornelius Celsus, no século I d.C., em termos dos sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. Posteriormente o patologista alemão Rudolph Virchow descreveu o quinto sinal cardinal: a perda da função ou *functio lesae*. A inflamação pode ser definida como uma reação do tecido vivo vascularizado a uma lesão local, que dependendo do tipo ou persistência do agente lesivo, pode ser classificada como aguda ou crônica. Esta

lesão pode ser ocasionada por estímulos mecânicos, químicos, por invasão de microorganismos ou devido a reações de hipersensibilidade (ROCK & KONO, 2008).

Se a neutralização e destruição do agente agressor, assim como o processo de reparo tecidual não ocorrerem de forma sincronizada e eficiente, a resposta inflamatória pode provocar lesão tecidual permanente através do acúmulo de substâncias prejudiciais ao organismo, como leucócitos, colágeno e outras substâncias (NATHAN, 2002).

Os sinais cardinais presentes no processo inflamatório agudo ocorrem devido às mudanças hemodinâmicas e celulares que acontecem durante o processo inflamatório. As mudanças hemodinâmicas são caracterizadas pela vasodilatação arteriolar e pelo aumento localizado da permeabilidade microvascular. Esses eventos são regulados pela ação de vários mediadores que são liberados durante uma lesão tecidual, na presença de alérgenos, microorganismos patogênicos, corpos estranhos e irritantes e compostos tóxicos (MEDZHITOV, 2008).

Esse aumento da permeabilidade vascular ocorre devido a um desequilíbrio das pressões hidrostática e oncótica no plasma e tecidos, mediado pela ação de mediadores inflamatórios (histamina e serotonina), ocorrendo acúmulo de líquido no interstício, resultando em edema tecidual. A dor também está presente e ocorre devido à ação direta dos mediadores inflamatórios (bradicinina, substância P) sobre terminações nervosas (KING, 2007).

Os mediadores inflamatórios são pequenas moléculas e proteínas que agem na amplificação e terminação de tipos diferentes de respostas inflamatórias. Atuam por meios de receptores específicos nas células-alvo, sendo que a maioria desses mediadores tem efeito em vários tipos celulares. Os mediadores inflamatórios são representados por: aminas vasoativas (histamina e serotonina); óxido nítrico; neuropeptídeos (substância P); mediadores derivados de lipídeos; citocinas; quimiocinas e cascatas de proteínas plasmáticas (cascata de complemento, da coagulação e da quinina) (KING, 2007).

Após haver lesão ou insulto ao tecido conectivo, seja devido à lesão mecânica ou à irritação química, as respostas do organismo ocorrem em etapas, sendo constituídas pela inflamação aguda, crônica e granulomatosa. O estágio agudo envolve respostas vasculares e celulares durante as primeiras 24 horas, atingindo seu pico após 48 a 72 horas. Há aumento da permeabilidade vascular e

vasodilatação causados pelos mediadores inflamatórios conhecidos como: histamina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, fator ativador de plaquetas, componente do complemento e substâncias liberadas nas terminações nervosas. Os neutrófilos são as células predominantes, às vezes associadas aos eosinófilos (KISNER & COLBY, 2005).

O estágio crônico surge à medida que a inflamação diminui (do segundo ao quarto dia), podendo durar de 14 a 21 dias após o surgimento da lesão, sendo caracterizado pelo aumento da atividade fibroblástica, formação de colágeno e tecido de granulação. Já no estágio crônico não existem sinais de inflamação, mas o paciente ainda não teve suas funções recuperadas completamente. Há a sobreposição com o estágio subagudo, ou seja, do 14º ao 21º dia após a lesão, ocorrendo nessa fase, a maturação do tecido conectivo devido ao desenvolvimento de fibras de colágeno e tecido cicatricial (KISNER & COLBY, 2005; KING, 2007).

O processo inflamatório pode causar danos ao organismo quando é muito exacerbado, ou quando a resolução do processo inflamatório não é satisfatória, podendo ocorrer à progressão dessa resposta para uma cronificação do processo (CABRAL, 2005).

1.5 SOROTERAPIA

O tratamento preconizado para os acidentes ofídicos são os antipeçonhas, imunobiológicos produzidos pela imunização de animais com as peçonhas das principais serpentes causadoras de acidentes. Estes neutralizam por meio de seus anticorpos os componentes responsáveis pela indução das ações biológicas das peçonhas (MAGALHÃES, 2010).

A soroterapia é o único tratamento cientificamente validado para acidentes ofídicos, sendo capaz de reverter os efeitos sistêmicos da peçonha no organismo do indivíduo (GUTIÉRREZ & LÉON, 2009b). Seu objetivo de tratamento é neutralizar a maior quantidade possível de peçonha circulante, independente do peso do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Os soros heterólogos antipeçonhas são concentrados de imunoglobulinas obtidos por sensibilização de diversos animais, sendo mais utilizados os de origem equina (Figura 4). No Brasil, os laboratórios que produzem esses imunoderivados

para rede pública são: Instituto Butantan (São Paulo), Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais) e Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

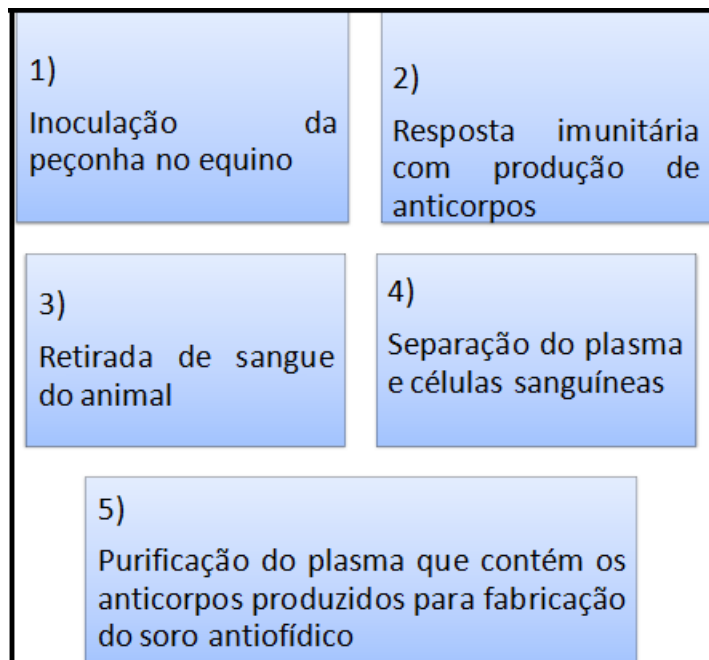


Figura 4 – Ciclo de fabricação do soro.

Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

No Brasil, o soro somente é produzido em apresentação líquida distribuído em uma ampola de 10 mililitros (mL) que deve ser conservada em geladeira à temperatura de 4°C a 8°C, devendo-se evitar o congelamento. Sua validade, em geral, é de dois a três anos (SORO ANTIBOTRÓPICO, 2009).

Para distribuição apropriada e maior efetividade, sua administração deve ser realizada por via endovenosa, onde rapidamente torna-se biodisponível. A dose a ser fornecida está relacionada com os sintomas clínicos e a localização da picada, é calculada pelo monitoramento desses sintomas através de exames neurológicos, físicos e de coagulopatias (DA SILVA JUNIOR, 2007).

No entanto, o tratamento com soroterapia apresenta desvantagens como o risco de efeitos colaterais na vítima, reação anafilática, hipersensibilidade às proteínas heterólogas do soro, ineficiência no combate dos efeitos locais da peçonha e necessidade de cuidados com a estocagem do soro e com seu prazo de validade (DE PAULA, 2009). Ainda pode ocorrer indisponibilidade do soro em algumas regiões do país (DA SILVA *et al.*, 2009).

Além do mais, a variabilidade na composição dos peçonhas de serpentes diferentes apresenta adversidades na fabricação dos antipeçonhas, prejudicando a efetividade dessa classe de agente terapêutico. Assim, a variação inter e intra específica da composição da peçonha pode afetar a capacidade de neutralização dos antipeçonhas (DA SILVA *et al.*, 2007a).

A soroterapia é extremamente importante, visto que quando administrada logo após o acidente é capaz de reduzir a letalidade e os efeitos sistêmicos decorrentes dos envenenamentos por serpentes peçonhentas. Porém, os efeitos locais provocados pela peçonha, são apenas parcialmente neutralizados pelo soro antiofídico, sendo necessário a utilização de complementação com medicamentos e outras terapias (PICOLO *et al.*, 2002; FONSECA, 2011).

O quadro 1 apresenta informações sobre a capacidade de neutralização e os respectivos antígenos dos soros antiofídicos produzidos no Brasil.

Quadro 1. Soros antiofídicos produzidos no Brasil.

SORO ANTIOFÍDICO	CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO	ANTIGENO
ANTIELAPÍDICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Micrurus</i> (corais)	Peçonhas de <i>M. corallinus</i> e <i>M. frontalis</i> , em iguais quantidades
ANTILAQUÉTICO	Neutraliza a peçonha de serpentes <i>Lachesis</i> (surucucu)	Peçonha de <i>Lachesis. Muta</i>
ANTICROTÁLICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Crotalus</i> (cascavéis)	Peçonhas de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>C.d. collilineatus</i>
ANTIBOTRÓPICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> (jararaca)	Peçonha <i>B. jararaca</i> (50%), <i>B. moojeni</i> , <i>B. neuwiedi</i> , <i>B. alternatus</i> e <i>B. jararacussu</i> em iguais proporções.
ANTIBOTRÓPICO-LÁQUETICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Laquesis</i> e grupo botrópico	Composto por uma mistura de peçonhas de <i>Laquesis muta muta</i> (60%) e 40% de antígeno botrópico
ANTIBOTRÓPICO-CROTÁLICO	Neutraliza as peçonhas de serpentes do gênero <i>Crotalus</i> e do grupo botrópico.	O antígeno é composto por mistura de peçonhas do gênero <i>Crotalus</i> e do grupo botrópico

Fonte: Adaptado por Vilar, De Carvalho & Furtado (2005).

A posologia do número de ampolas indicadas no tratamento específico da soroterapia para acidentes botrópicos e crotáticos depende da classificação do acidente ofídico (leve, moderado ou grave), visualizado no quadro abaixo (Quadro

2). Estas recomendações baseiam-se em estudos clínicos da neutralização das peçonhas pelos soros anti-peçonhas na circulação sistêmica e na reversão das alterações de coagulação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Quadro 2. Indicação do número de ampolas de soros anti-peçonha para tratamento de acidentes ofídicos

Acidente causado por:	Leve	Moderado	Grave	Tipo de soro
<i>Bothrops</i>	2 – 4	4 – 8	12	SAB, SABL ou SABC
<i>Crotalus</i>	5	10	20	SAC ou SABC

SAB – Soro antibotrópico; SABL – Soro antibotrópico-laquétrico; SABC – Soro antibotrópico-crotálico
SAC – Soro anticrotálico

Fonte: Ministério da Saúde, 2001.

1.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DO AMAPÁ

Situado no extremo norte do país, o Estado do Amapá tem uma superfície territorial de 140.276 km², que corresponde a 1,6% do Brasil e a 3,6% da Região Norte. Faz fronteira com o Estado do Pará, Suriname e Guiana Francesa. Relativamente pequeno, se comparado com outros Estados da Amazônia, o Amapá concentra uma grande diversidade em ambientes naturais, já que faz parte de dois domínios geográficos: o amazônico e o oceânico (Figura 5) (AMAPÁ, 2000).

O clima dominante do Estado é tropical úmido, com poucas variações de temperatura, sendo outubro o mês mais quente e, de fevereiro a abril, o período mais frio. As chuvas se estendem por um longo período, de dezembro a julho, e o período seco entre agosto e novembro, já é mais curto (AMAPÁ, 2000).



Figura 5 – Localização do Estado do Amapá, Brasil (adaptado).
Fonte: www.ap.gov.br

A cobertura vegetal do Estado apresenta-se em dois padrões principais: as formações florestais, com florestas densas de terra firme, florestas de várzea e manguezais e formações campestres, com cerrados e campos de várzea inundáveis ou aluviais (ARMELIN, 2001).

A floresta de terra firme é o ecossistema de maior representatividade, ocupando mais de 70% da superfície do Estado. É o ambiente com maior biodiversidade e biomassa, apresentando apenas 1% de devastação de sua área de 140.276 km². O cerrado ocupa a faixa de domínio geológico da formação barreiras e biogeograficamente representa um enclave do ambiente típico do Brasil Central, apresentando espécies endêmicas e grande intervenção antrópica por estarem localizados nesses ecossistemas os principais cultivos florestais homogêneos (ÁVILA-PIRES *et al.*, 2007).

A Amazônia brasileira apresenta uma rica fauna de serpentes com aproximadamente 149 espécies registradas. O Estado do Amapá apresenta uma grande diversidade de serpentes peçonhentas, responsáveis pela ocorrência de acidentes ofídicos (ARMELIN, 2001).

Inúmeros casos de acidentes por serpentes peçonhentas foram notificados à Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Amapá nos anos de 2003, 2004, 2005, 2006, perfazendo um total de 909 ocorrências, sendo que destas, 614 (67,5%) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, sendo que a espécie encontrada na região Norte do Brasil, sendo mais comum no leste do Pará e em toda a Amazônia é *Bothrops atrox* (DA SILVA, 2001).

Em 2010, o Estado do Amapá registrou 382 casos de acidentes ofídicos, destes 242 (63,4%) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* e 2 (0,8%) por serpentes do gênero *Crotalus*; a zona rural foi onde se registrou a maioria dos acidentes ofídicos (79,3%), sendo que 67% destes indivíduos afetados também relataram residir na zona rural. Em 90,8% dos casos, houve evolução para cura, não ocorrendo óbitos no período analisado (DA SILVA *et al.*, 2011).

Importante citar que, mesmo com a elevada ocorrência de acidentes ofídicos, não existem levantamentos sobre as espécies de serpentes peçonhentas existentes no Estado do Amapá e os tratamentos com a soroterapia são realizados considerando-se o provável gênero da serpente que ocasionou o envenenamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as ações das peçonhas de serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, capturadas no Estado do Amapá e avaliar a habilidade dos soros antibotrópico e anticrotálico brasileiro na neutralização destas atividades.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as atividades edematogênica, nociceptiva, hemorrágica, miotóxica, coagulante, hemolítica indireta por fosfolipases A₂, hialuronidásica e quantificação do infiltrado inflamatório induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox* capturada no Estado do Amapá e avaliar a habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização destas atividades;
- Analisar as atividades edematogênica, nociceptiva, hemorrágica, miotóxica, coagulante, hemolítica indireta por fosfolipases A₂, hialuronidásica, quantificação do infiltrado inflamatório e letalidade induzidas pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliar a habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização destas atividades;
- Verificar o perfil eletroforético das proteínas das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* capturadas no Estado do Amapá.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo apresenta caráter experimental, exploratório, com aplicação de campo de natureza quantitativa, cujo objetivo foi caracterizar as principais ações das peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, capturadas no Estado do Amapá e avaliar a habilidade dos soros antiofídico e antiofídico brasileiro na neutralização destas atividades.

O projeto de pesquisa foi inicialmente submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e recebeu o parecer de aprovado, em reunião realizada no dia 16 de fevereiro de 2012, sendo registrado sob o protocolo nº. 001/2012 (ANEXO A).

Este estudo seguiu os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Toxicologia e no Laboratório de Fármacos do curso de Ciências Farmacêuticas da UNIFAP.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

3.2.1 Animais

Os ensaios *in vivo* foram realizados em camundongos da linhagem Albino (Swiss), adultos, com peso entre 20-25 gramas (g), provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas. Os animais foram mantidos em condições ambientes controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa de 40-60%) com comida e água *ad libitum*, com ciclos de luz alternados de 12 em 12 horas (h).

3.2.2 Captura das serpentes

Para a captura das serpentes foram utilizados métodos combinados de reconhecimento por encontro visual, seguido de captura com gancho herpetológico,

cambão ou laço de Lutz e luvas de couro, durante o período matutino de 6:00h às 10:00h, vespertino de 16:00h às 19:00h e noturno de 20:00h às 24:00h. Foram utilizadas armadilhas de interceptação e queda, coleta por terceiros e encontros ocasionais em ambientes de floresta e pastagem. Utilizou-se uma câmera fotográfica para registro dos animais encontrados e guias de campo para identificação.

A captura da serpente *Bothrops atrox* foi realizada por meio do Programa de Acompanhamento e Resgate de Fauna durante a fase de supressão e enchimento do reservatório da usina hidrelétrica Santo Antônio do Jari, localizada nos municípios de Almerim (PA) e Laranjal do Jari (AP). O local da coleta (0°38'12.42"S, 52°30'15.87"O) foi marcado através de um sistema global de medição de posição (GPS Garmin – modelo nüvi 40). A serpente foi registrada e identificada pela Bióloga Camila Moreira Barreto Gomes, supervisora – Resgate de Fauna e Ictiofauna.

A serpente *Crotalus durissus ruruima* foi capturada em um terreno localizado no município de Porto Grande, no Estado do Amapá. O local da coleta (0°42'24.538"S, 051°24'47.215"W) foi marcado através de um sistema global de medição de posição (GPS Garmin – modelo nüvi 40). A serpente foi identificada pelo Dr. Francisco Luís Franco, Biólogo e pesquisador científico do Instituto Butantan, São Paulo.

Os animais capturados foram acondicionados em caixa de transporte para serpentes, com tampa móvel e abertura em acrílico menor que a caixa. Os animais foram mantidos no Laboratório de Toxicologia por um período de 15 a 30 dias. Neste período, foi oferecido água e alimentação (camundongos) às serpentes. Realizou-se duas coletas de peçonha de cada animal, que ao final do período citado foram encaminhados ao Centro de Triagem de Animais Silvestres do Amapá e reintroduzidos novamente na natureza, no mesmo local de onde foram capturados.

Este projeto obteve aprovação para coleta e captura de serpentes pertencentes aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* no Estado do Amapá, junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), ligado ao Ministério do Meio Ambiente, sendo registrado sob o protocolo nº. 27228-4 (ANEXO B).

3.2.2.1 Coleta das peçonhas

Primeiramente, as serpentes foram colocadas em uma câmara contendo dióxido de carbono (CO₂) para promover a anestesia das mesmas, diminuindo a agitação do animal e oferecendo maior segurança ao técnico manipulador. Em seguida, foi realizada a abertura da boca da serpente, apoiando-se as presas em um recipiente de vidro envolto em gelo, exercendo-se uma ligeira compressão nas glândulas atrás da cabeça da serpente. Imediatamente após a coleta da peçonha, foi realizada a assepsia na boca da serpente utilizando-se clorexidina. Posteriormente, as peçonhas coletadas foram submetidas à liofilização e em seguida, armazenadas a – 20°C.

3.2.2.2 Preparação das soluções de peçonha

As peçonhas brutas liofilizadas das serpentes pertencentes às espécies *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* foram dissolvidos, isoladamente, em solução salina tamponada (PBS) e centrifugados a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos em centrífuga Excelsa Baby. Uma alíquota de sobrenadante foi separada para dosagem de proteínas, através do método de microbiureto (JOHNSON *et al.*, 1980). Depois a solução estoque de peçonha foi diluída com PBS para a realização do experimento.

3.3 SOROS ANTIOFÍDICOS

O soro antibotrópico (Lote 095106 D) e anticrotálico (Lote 1207131), produzidos pelo Instituto Vital Brazil S.A., foram solicitados a termo de doação ao Setor de Imunobiológico da Central de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos (CADI), vinculado à Secretaria de Estado da Saúde do Amapá.

O soro anticrotálico é uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas de soro de equinos hiperimunizados, com peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* (*Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*). Uma ampola de 10 ml contém imunoglobulinas de origem equina que neutralizam, no mínimo, 15 mg de peçonha-referência de *Crotalus durissus terrificus* (soroneutralização em camundongos).

No Brasil, o *pool* de antígenos utilizado para a imunização de cavalos na obtenção do antipeçonha botrópico é composto pelas peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*.

A via de administração dos soros utilizada nos experimentos *in vivo* foi intraperitoneal, especificamente no quadrante abdominal inferior direito dos camundongos, objetivando o alcance destes na corrente sanguínea. A soroterapia foi realizada 30 minutos após administração das peçonhas e a dose utilizada foi de 60 microlitros (μL) (NADUR-ANDRADE *et al.*, 2011).

3.4 NEUTRALIZAÇÃO DAS PEÇONHAS DE SERPENTES PELO SORO ANTIBOTRÓPICO E ANTICROTÁLICO BRASILEIRO

Em todos os ensaios de toxicidade com as peçonhas das serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, simultaneamente foi avaliada a habilidade do soro antibotrópico ou do soro anticrotálico brasileiros na neutralização das ações produzidas por essas peçonhas, utilizando-se animais de laboratório (camundongos) ou ensaios *in vitro*.

3.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.5.1 Atividade Edematogênica

Para a determinação da atividade edematogênica das peçonhas utilizou-se o método descrito por Yamakawa *et al.* (1976), com algumas modificações. O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da Dose Edematogênica Mínima (DEM) da peçonha de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para DEM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade edematogênica.

3.5.1.1 Determinação da dose edematogênica mínima (DEM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

A DEM foi definida como a menor dose de peçonha necessária para a formação de um edema de 30% na pata experimental (DA ROCHA & FURTADO, 2007).

Para esta determinação foram utilizados camundongos, distribuídos aleatoriamente em grupos de 3 animais cada. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

A peçonha de *Bothrops atrox*, em diferentes concentrações (0,05; 0,10 ou 0,20 mg/Kg) foi injetada na região subplantar da pata posterior direita, por via intradérmica (Tabela 1). O volume da pata foi avaliado através do uso de um paquímetro de baixa pressão 0,01 milímetro (mm) (Mitutoyo), nos intervalos de 0h (antes da peçonha); 0,5h; 1h; 2h; 3h e 4 horas (após a administração da peçonha). Foram realizadas três medidas para o cálculo da média de volume da pata de cada animal.

Tabela 1. Determinação da DEM da peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	PBS (μ L)	Peçonha (mg/kg)
I	50	–
II	–	0,05
III	–	0,10
IV	–	0,20

DEM= Dose edematogênica mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=12.



Figura 6 – Procedimento de aferição da pata do camundongo com o espécímetro.
Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

A mesma metodologia, descrita acima, foi adotada para a determinação da DEM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*. Para tanto, utilizou-se as concentrações de 0,006; 0,012; 0,025 e 0,05 mg/Kg administradas por via intradérmica a outros camundongos (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação da DEM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (mg/kg/50 µL PBS)
I	50	–
II	–	0,006
III	–	0,012
IV	–	0,025
V	–	0,05

DEM= Dose edematogênica mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=15.

3.5.1.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotálico brasileiros na neutralização da atividade edematogênica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*

Para esta avaliação, foram utilizados camundongos distribuídos aleatoriamente em grupos de 3 animais cada. Cada grupo recebeu um tratamento diferente.

Na indução do edema de pata foi utilizada 2 DEM da peçonha de *B. atrox* (0,20 mg/Kg), administrada intradermicamente na região subplatar da pata posterior direita dos camundongos (Tabela 3). O soro antibotrópico foi administrado por via intraperitoneal. Os animais dos grupos controle receberam somente PBS ou somente peçonha.

Tabela 3. Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade edematogênica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/50 µL PBS)	Soro antibotrópico (µL)
PBS	–	–
PBA	0,20	–
PBSB	0,20	60

PBS= Solução salina tamponada (50 µL). PBA= Peçonha *Bothrops atrox*. PBSB= Peçonha *Bothrops atrox* e soro antibotrópico. N=9

Não foi possível avaliar o efeito do soro anticrotálico em relação a esta atividade, pois os resultados mostraram que a peçonha de *Crotalus durissus ruruima*, capturada no Estado do Amapá, não possui ação edematogênica.

3.5.2 Atividade Nociceptiva

Para a determinação desta atividade utilizou-se o método de Hunskaar *et al.* (1985), com modificações de Soares *et al.* (2009) e Souza (2012). O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da Dose Nociceptiva Mínima (DNM) da peçonha de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para a determinação da DNM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

3.5.2.1 Determinação da dose nociceptiva mínima (DNM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

Primeiramente, determinou-se a menor dose de peçonha capaz de promover uma resposta álgica na pata dos camundongos quando comparado com o grupo controle, administrado somente com PBS. Para tanto, foram utilizados camundongos, distribuídos aleatoriamente em grupos com 5 animais cada.

Os animais foram imobilizados manualmente para administração por via subcutânea, na região intraplantar da pata posterior direita, da peçonha de *Bothrops atrox* em diferentes concentrações (0,05; 0,10; 0,20 mg/kg). Os animais do grupo controle receberam somente PBS por via subcutânea (Tabela 4).

Tabela 4. Determinação da DNM da peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	PBS (μL)	Peçonha (mg/Kg/ 50 μL PBS)
I	50	–
II	–	0,05
III	–	0,10
IV	–	0,20

DNM= Dose nociceptiva mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=20.

Após a administração da peçonha ou de PBS, os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro, contendo espelhos em volta com o objetivo de criar uma superfície refletora para facilitar a observação destes (Figura 7). Em seguida, com o uso de cronômetros, verificou-se a resposta álgica dos animais (nocicepção), considerada como o tempo gasto, em segundos, em que os animais lambeiram ou morderam a pata injetada, durante os 5 minutos iniciais (primeira fase) e no intervalo de 20 a 30 minutos (segunda fase).

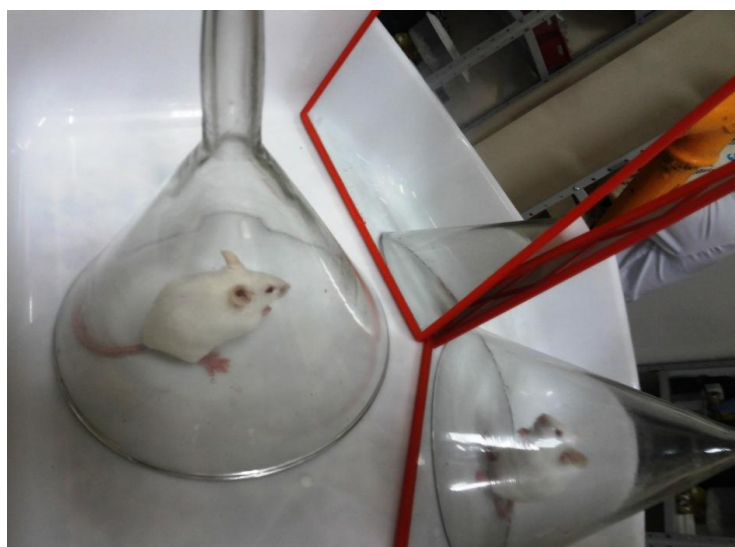


Figura 7 – Procedimento para indução da nocicepção com a peçonha de *B. atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*, realizado através do método de Hunskaar (1985)

Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

Em outros camundongos foram administrados diferentes concentrações (0,006; 0,012; 0,025; 0,05 mg/Kg) da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* para avaliação do efeito nociceptivo, utilizando-se o mesmo procedimento metodológico descrito anteriormente. Os animais do grupo controle receberam somente PBS por via subcutânea (Tabela 5).

Tabela 5. Determinação da DNM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (μL)	Peçonha (mg/Kg/ 50 μL PBS)
I	50	–
II	–	0,006
III	–	0,012
IV	–	0,025
V	–	0,05

DNM= Dose nociceptiva mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=25.

3.5.2.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro na neutralização da atividade nociceptiva induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*

Para a indução da nocicepção foram administradas por via subcutânea na região intraplantar da pata posterior direita, 2 DNM (0,20 mg/kg) da peçonha de *B. atrox* a camundongos distribuídos aleatoriamente em grupos, contendo 5 animais cada (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/ 50 µL PBS)	Soro antibotrópico (µL)
PBS	–	–
PBA	0,20	–
PBSB	0,20	60

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PBA= Peçonha *Bothrops atrox*; PBSB= Peçonha *Bothrops atrox* e soro antibotrópico; DNM= Dose nociceptiva mínima. N=15.

Não foi possível avaliar o efeito do soro anticrotático em relação a esta atividade, pois os resultados mostraram que a peçonha de *Crotalus durissus ruruima* capturada no Estado do Amapá não possui ação nociceptiva.

3.5.3 Atividade Inflamatória

Para a avaliação desta atividade foi utilizado o método descrito por Souza & Ferreira (1985). O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da Dose Inflamatória Mínima (DIM) da peçonha de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para a determinação da DIM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade inflamatória.

3.5.3.1 Determinação da dose inflamatória mínima (DIM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

Primeiramente, determinou-se a menor dose de peçonha capaz de induzir o infiltrado inflamatório na cavidade peritoneal dos animais (verificado através da análise da migração leucocitária), comparando-se os resultados obtidos com os do grupo controle, administrados somente com PBS. Para tanto, diferentes concentrações da peçonha de *B. atrox* (0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 mg/Kg/ 50 µL PBS) foram administradas por via intraperitoneal nos camundongos (Tabela 7).

Após 4 horas da administração, a migração celular foi analisada. Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e após este procedimento, injetou-se 10 ml de PBS heparinizado (1 ml heparina/1000 ml de PBS) na cavidade peritoneal. O lavado peritoneal foi coletado com a ajuda de uma seringa, sendo posteriormente realizada a contagem total de leucócitos e a contagem diferencial destas células.

Para a contagem total de leucócitos, 20 µL do lavado peritoneal foram diluídos em 0,4 mL da solução de Turk e, em seguida um pequeno volume do líquido foi colocado em câmara de Neubauer, sendo preenchido um dos lados desta câmara com a diluição homogeneizada. Os leucócitos foram contados nos quatro quadrados laterais maiores e posteriormente o valor encontrado foi multiplicado por 50, resultando no N^o total de leucócitos/mm³.

Parte do lavado peritoneal foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi suspenso em 0,4 mL de uma solução de albumina a 3% em PBS p/v. O esfregaço celular foi preparado em lâmina e posteriormente corados com corante pancrômico de Rosenfeld. As células foram contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo (SOUZA; FERREIRA, 1985). Os resultados obtidos na contagem diferencial foram expressos como o número de neutrófilos por mL no lavado peritoneal (BARBOSA *et al.*, 2008).

Tabela 7. Determinação da DIM da peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	PBS (μL)	Peçonha (mg/kg/ 50 μL PBS)
I	50	–
II	–	0,05
III	–	0,10
IV	–	0,20
V	–	0,30
VI	–	0,40

DIM= dose inflamatória mínima. PBS- Solução salina tamponada. N=30

A mesma metodologia, descrita acima, foi adotada para indução do infiltrado inflamatório na cavidade peritoneal de outros camundongos, distribuídos aleatoriamente em grupos, contendo 5 animais cada. Os animais foram imobilizados manualmente para administração da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*, em diferentes concentrações (0,006; 0,012; 0,025; 0,05 mg/kg) por via intraperitoneal (Tabela 8).

Tabela 8. Determinação da DIM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (μL)	Peçonha (mg/kg) 50 μL PBS)
I	50	–
II	–	0,006
III	–	0,012
IV	–	0,025
V	–	0,05

DIM= dose inflamatória mínima. PBS- Solução salina tamponada. N= 20

3.5.3.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e do soro anticrotálico na neutralização da atividade inflamatória induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*

Nesta etapa, administrou-se 2 DIM (0,20 mg/kg) da peçonha de *Bothrops atrox* a camundongos distribuídos aleatoriamente em grupos, contendo 5 animais cada. O soro antibotrópico foi administrado por via intraperitoneal. Os animais dos grupos controle receberam somente a peçonha ou PBS (Tabela 9). Após 4 horas da administração, a migração celular na cavidade peritoneal foi analisada.

Tabela 9. Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/ 50 µL PBS)	Soro antibotrópico (µL)
PBS	—	—
PBA	0,20	—
PBSB	0,20	60

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PBA= Peçonha *Bothrops atrox*; PBSB= Peçonha *Bothrops atrox* e soro antibotrópico. N=15.

O mesmo procedimento metodológico foi realizado com outros camundongos para avaliar a habilidade do soro anticrotático em neutralizar a atividade inflamatória induzida pela peçonha de *C.d. ruruima*. Para tanto, administrou-se 2 DIM, que correspondeu a 0,012 mg/kg (Tabela 10). Os animais dos grupos controle receberam somente a peçonha ou PBS. Após 4 horas da administração, a migração celular na cavidade peritoneal foi analisada.

Tabela 10. Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/ 50 µL PBS)	Soro anticrotático (µL)
PBS	—	—
PC	0,012	—
PCSC	0,012	60

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima*; PCSC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima* e soro anticrotático. N=15.

3.5.4 Atividade Hemorrágica

A hemorragia foi induzida através de injeções realizadas intradermicamente no dorso de camundongos. Após 2 horas, os animais foram eutanaziados em câmara de CO₂. A pele próxima ao local da injeção foi retirada e o halo hemorrágico formado foi medido em mm segundo o método de Kondo (1960).

A primeira etapa deste experimento consistiu na determinação da Dose Hemorrágica Mínima (DHM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para a determinação da DHM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade hemorrágica.

3.5.4.1 Determinação da dose hemorrágica mínima (DHM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

A DHM é definida como a menor concentração de peçonha, capaz de produzir uma lesão hemorrágica (halo hemorrágico) de 10 mm de diâmetro no dorso de animais.

Doses crescentes da peçonha de *B. atrox* (0,20; 0,40; 0,60; 0,80 mg/Kg/ 50 µL PBS) foram administradas a camundongos distribuídos em grupos de 5 animais (Tabela 11). Os animais do grupo controle receberam somente PBS.

Após 2 horas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e em seguida os halos hemorrágicos foram medidos em mm.

Tabela 11. Determinação da DHM da peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (mg/kg/ 50 µL PBS)
I	50	–
II	–	0,20
III	–	0,40
IV	–	0,60
V	–	0,80

DHM= dose hemorrágica mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=25.

O mesmo procedimento foi realizado administrando-se diferentes concentrações da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* (0,10; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 mg/Kg/ 50 µL PBS) no dorso de outros camundongos (Tabela 12). Os animais do grupo controle receberam somente PBS.

Tabela 12. Determinação da DHM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (μL)	Peçonha (mg/kg/ 50 μL PBS)
I	50	–
II	–	0,006
III	–	0,012
IV	–	0,025
V	–	0,05
VI	–	0,10

DHM= dose hemorrágica mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=30.

3.5.4.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade hemorrágica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*

A indução da hemorragia foi realizada administrando-se 2 DHM da peçonha de *Bothrops atrox* (0,40 mg/kg) por via intradérmica no dorso de camundongos. Em seguida, por via intraperitoneal, administrou-se 60 μL do soro antibotrópico. Os animais dos grupos controle receberam somente a peçonha ou PBS.

Após 2 horas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os halos hemorrágicos foram medidos em mm e os diâmetros submetidos à análise estatística. (Tabela 13).

Tabela 13. Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/ 50 μL PBS)	Soro antibotrópico (μL)
PBS	–	–
PBA	0,40	–
PBSB	0,40	60

PBS= Solução salina tamponada (50 μL); PBA= Peçonha *Bothrops atrox*; PBSB= Peçonha *Bothrops atrox* e soro antibotrópico. N=15

Nesta etapa, não foi possível realizar a avaliação da habilidade do soro anticrotálico na neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *C.d. ruruima*, pois todas as doses utilizadas no presente estudo não foram capazes de produzir halo hemorrágico no dorso dos animais. Além disso, as doses de 0,05 e

0,10 mg/Kg/ 50 µL PBS promoveram o óbito dos camundongos e não se verificou hemorragia em nenhum deles.

3.5.5 Atividade Miotóxica

A atividade miotóxica foi determinada utilizando-se o método de quantificação de níveis séricos da enzima creatina quinase (CK) (KAPLAN & PESCE, 1986). O princípio deste método consiste na reação da creatina fosfato e a adenosina fosfato (ADP), catalisada pela enzima CK, formando creatina e adenosina trifosfato (ATP). O ATP formado é utilizado para fosforilar glicose, produzindo glicose-6-fosfato (G-6-P) na presença da hexoquinase, a glicose-6-P é então oxidada a gluconolactona-6-fosfato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺), sendo esta reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase.

Na última reação descrita o NADP⁺ é reduzido a NADPH aumentando a absorbância aferida em comprimento de onda de 340 nm. A variação em absorbância é diretamente proporcional à atividade da enzima CK. A atividade foi expressa em unidades/litro. Uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto.

A primeira etapa deste experimento consistiu na determinação da Dose Miotóxica Mínima (DMM) da peçonha de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para DMM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade miotóxica.

3.5.5.1 Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

Nesta avaliação utilizou-se camundongos distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais cada.

Para a determinação da DMM, diferentes concentrações de peçonha de *B. atrox* (0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 mg/Kg/ 50 µL PBS) foram administradas no músculo gastrocnêmio da pata direita dos camundongos (Tabela 14).

As amostras de sangue foram coletadas 3 horas após, por punção venosa retro orbital, utilizando-se tubos capilares heparinizados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o plasma obtido foi utilizado para a determinação dos níveis plasmáticos de creatina quinase, utilizando-se o Kit de diagnóstico CK-NAC Liquiform (LABTEST). As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro BIOPLUS 2000, com comprimento de onda de 340 nm, a 37°C.

Tabela 14. Determinação da DMM das peçonhas de *Bothrops atrox*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (mg/kg/ 50 µL PBS)
I	50	–
II	–	0,05
III	–	0,10
IV	–	0,20
V	–	0,30
VI	–	0,40

DMM= dose miotóxica mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=30

O mesmo procedimento foi adotado para determinação da DMM com a peçonha de *Crotalus durissus ruruima*. Para tanto, diferentes concentrações da referida peçonha (0,006; 0,012; 0,025; 0,05 mg/Kg/ 50 µL PBS) foram administradas no músculo gastrocnêmio da pata direita dos camundongos (Tabela 15). Os animais do grupo controle receberam somente PBS (50 µL).

Tabela 15. Determinação da DMM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (mg/kg/ 50 µL PBS)
I	50	–
II	–	0,006
III	–	0,012
IV	–	0,025
	–	0,05

DMM= dose miotóxica mínima. PBS= Solução salina tamponada. N=25

3.5.5.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro na neutralização da atividade miotóxica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*

Nesta etapa, 2 DMM (0,20 mg/kg) da peçonha de *B. atrox* foram administradas no músculo gastrocnêmio da pata direita de camundongos, distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais. O soro anticrotático foi administrado por via intraperitoneal (Tabela 16).

Tabela 16. Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/ 50 µL PBS)	Soro antibotrópico (µL)
PBS	–	–
PBA	0,20	–
PBSB	0,20	60

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PBA= Peçonha *Bothrops atrox*; PBSB= Peçonha *Bothrops atrox* e soro antibotrópico. N=15.

O mesmo procedimento metodológico foi realizado com outros camundongos para avaliar a habilidade do soro anticrotático em neutralizar a miotoxicidade induzida pela peçonha de *C.d. ruruima*. Para tanto, administrou-se 2 DMM, que correspondeu a 0,05 mg/kg/ 50 µL PBS. Os animais do grupo controle receberam somente PBS por via intramuscular (Tabela 17). O soro anticrotático foi administrado por via intraperitoneal.

Tabela 17. Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/ 50 µL PBS)	Soro anticrotático (µL)
PBS	–	–
PC	0,05	–
PCSC	0,05	60

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima*; PCSC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima* e soro anticrotático. N=15.

3.5.6 Letalidade

Para determinar a dose letal média (DL₅₀) da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* utilizou-se o método descrito por Finney (1971), com algumas modificações. O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) e a segunda na avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização desta atividade.

3.5.6.1 Determinação da DL₅₀ da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Para determinar a dose letal média (DL₅₀), foram administrados por via intraperitoneal, diferentes concentrações da peçonha de *C. d. ruruima* a grupos de 4 camundongos cada (Tabela 18). O número de animais mortos e vivos foi registrado durante um período de 24h, e a DL₅₀ foi calculada através do método de PROBITOS.

Tabela 18. Determinação da DL₅₀ da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (μL)	Peçonha (mg/kg)
I	50	–
II	–	0,025
III	–	0,05
IV	–	0,10
V	–	0,20

DL₅₀ = dose letal média. PBS= Solução salina tamponada. N= 20

3.5.6.2 Avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização da letalidade

Nesta etapa, a concentração de peçonha utilizada para induzir a letalidade foi de 2 DL₅₀ (0,10 mg/kg/50 μL PBS). Para tanto, foram utilizados camundongos distribuídos aleatoriamente em grupos de 4 animais cada. A administração da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* foi realizada intraperitonealmente e, 30 minutos após, administrou-se o soro anticrotálico pela mesma via nas doses de 60, 120, 240 e 480 μL (Tabela 19).

Tabela 19. Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da letalidade induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	Peçonha (mg/Kg/ 50 µL PBS)	Soro anticrotático (µL)
PBS	–	–
PC	0,10	–
PCSC1	0,10	60
PCSC2	0,10	120
PCSC3	0,10	240
PCSC4	0,10	480

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima*; PCSC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima* e soro anticrotático. N= 24

3.5.7 Atividade Coagulante

A atividade coagulante foi determinada *in vitro* e se baseou no método descrito por Theakston & Reid (1983). O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da Dose Coagulante Mínima (DCM) da peçonha de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para DCM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade coagulante.

3.5.7.1 Determinação da dose coagulante mínima (DCM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

A dose mínima coagulante é definida como a menor quantidade de peçonha (em mg de peçonha seca por litro de solução teste) capaz de coagular uma solução padronizada de plasma citratado em 60 segundos a 37°C (THEAKSTON e REID, 1983). Para este ensaio foi utilizado plasma humano citratado (citrato de sódio 3,8%) preparado a partir da proporção 1:9, citrato de sódio 3,8% e sangue, respectivamente. O sangue foi centrifugado a 4000 rpm, 4°C por 15 minutos e o plasma foi separado e imediatamente utilizados nos ensaios. A peçonha foi diluída em solução salina 0,85%. A 200µl de plasma foram adicionados 100µl de peçonha

em diferentes concentrações (1,5; 2,5; 5,0; 6,5; 10,0; 12,5 µg/ 50µL PBS) da peçonha de *Bothrops atrox* (Tabela 20) e o tempo de coagulação cronometrado.

Tabela 20. Determinação da DCM da peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (µg/ 50µL PBS)
I	50	–
II	–	1,5
III	–	2,5
IV	–	5,0
V	–	6,5
VI	–	10,0
VII	–	12,5

PBS- Solução salina tamponada.

A mesma metodologia referida acima foi utilizada para determinação da DCM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*, com as concentrações de 2,5; 5,0; 6,5; 10,0; 12,5 µg/ 50µL PBS (Tabela 21).

Tabela 21. Determinação da DCM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (µg/ 50µL PBS)
I	50	–
II	–	2,5
III	–	5,0
IV	–	6,5
V	–	10,0
VI	–	12,5

PBS- Solução salina tamponada.

3.5.7.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade coagulante induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*

Nesta etapa, foram utilizadas 2 DCM (3,0µg/25µL PBS) da peçonha de *Bothrops atrox* para indução da atividade coagulante. Em tubos eppendorf foram

misturados 25 µL de peçonha com 25 µL de soro antibotrópico, e imediatamente após foi aplicado 50 µL desta mistura ao plasma humano (200 µL) (Tabela 22).

Tabela 22. Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	Peçonha (µg/ 25µL PBS)	Soro antibotrópico (µL)
PBS	–	–
PBA	3,0	–
PBSB	3,0	25

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PBA= Peçonha *Bothrops atrox*; PBSB= Peçonha *Bothrops atrox* e soro antibotrópico.

A mesma metodologia foi adotada para avaliar a habilidade do soro anticrotático na inibição da atividade coagulante, utilizando-se 2 DCM (5,0µg /25µL PBS) da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*. Em tubos eppendorf foram misturados 25 µL desta peçonha com 25 µL de soro anticrotático e imediatamente após foi aplicado 50 µL desta mistura ao plasma humano (200 µL) (Tabela 23).

Tabela 23. Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	Peçonha (µg/ 25µL PBS)	Soro anticrotático (µL)
PBS	–	–
PC	5,0	–
PCSC	5,0	25

PBS= Solução salina tamponada (50 µL); PC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima*; PCSC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima* e soro anticrotático.

3.5.8 Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂

A atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂ foi realizada *in vitro* e se baseou no método de hemólise radial indireta (HABERMANN & HARDT, 1972) modificado por Gutiérrez *et al.* (1988). O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da Dose Hemolítica Indireta Mínima (DHeM) da peçonha de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para DHeM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade fosfolipásica.

3.5.8.1 Determinação da dose hemolítica mínima (DHeM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

As fosfolipases são enzimas que catalisam a hidrólise dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares, liberando quantidades equimolares de ácidos graxos e lisofosfolipídios que por sua vez promovem a lise celular. No presente estudo utilizou-se o método da hemólise indireta para a determinação da atividade fosfolipásica da peçonha de *B. atrox* (Tabela 24).

A atividade fosfolipásica foi ensaiada em meio de cultura *in vitro* em placas de Petri. Primeiramente, homogeneizou-se gemas de ovos em uma solução salina (2 gemas para cada 100 mL de solução salina 0,85%). Em seguida preparou-se uma solução contendo ágar (20g/L) fundido em TRIS 20 mM juntamente com o CaCl₂ (0,56 g/L). Quando esta solução atingiu uma temperatura por volta de 45°C, adicionou-se as gemas de ovo diluídas e distribuiu-se em placas de petri.

Após o endurecimento das mesmas, as placas foram colocadas em refrigerador para que se solidificassem. Utilizando ponteiras de 100 microlitros foram feitos orifícios ao redor da placa e no centro, deixando espaços uniformemente distribuídos para que se pudesse visualizar os halos formados. Em cada poço foi aplicada 50 µL da amostra a ser analisada. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e, em seguida, os diâmetros dos halos formados foram medidos em mm. A DHeM foi definida como a concentração de peçonha capaz de formar um halo de 10 mm no meio de cultura. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 24. Determinação da DHeM da peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (µg/50 µL PBS)
I	50	–
II	–	8
III	–	10
IV	–	15
V	–	20
VI	–	25
VII	–	30

DHeM= dose hemolítica mínima. PBS= Solução salina tamponada; PB- peçonha bruta.

Para a determinação da DHeM da peçonha *Crotalus durissus ruruima* empregou-se a mesma metodologia acima descrita utilizando diferentes concentrações desta peçonha (10; 15; 20; 25; 30 µg/50 µL PBS) (Tabela 25).

Tabela 25. Determinação da DHeM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	PBS (µL)	Peçonha (µg/50 µL PBS)
I	50	–
II	–	10
III	–	15
IV	–	20
V	–	25
VI	–	30

DHeM= dose hemolítica mínima. PBS- Solução salina tamponada; PB- peçonha bruta.

3.5.8.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotálico brasileiro na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂

Nesta etapa, foram utilizadas 2 DHeM (20µg/25 µL PBS) da peçonha de *Bothrops atrox* para indução da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂. Em tubos eppendorf foram misturados 25 µL de peçonha com soro antibotrópico nas diferentes doses de 25, 40, 60 e 80 µL, e imediatamente após foi aplicado 50 µL desta mistura nos orifícios das placas de petri contendo o meio de cultura anteriormente descrito (Tabela 26). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 26. Avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂ induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*

Grupo	Peçonha (µg/25 µL PBS)	Soro antibotrópico (µL)
PBS	–	–
PBA	20	–
PBSB1	20	25
PBSB2	20	40
PBSB3	20	60
PBSB4	20	80

PBS= Solução salina tamponada (25 µL); PBA= Peçonha *Bothrops atrox*; PBSB= Peçonha *Bothrops atrox* e soro antibotrópico; DHeM= Dose hemolítica indireta mínima.

O mesmo procedimento metodológico foi utilizado para avaliação da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂ induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*, utilizando-se diferentes doses do soro anticrotático (5, 10, 15 e 25 µL) e 2 DHeM (40µg/25 µL PBS) da referida peçonha (Tabela 27).

Tabela 27. Avaliação da habilidade do soro anticrotático brasileiro na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂ induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Grupo	Peçonha (µg/25 µL PBS)	Soro anticrotático (µL)
PBS	–	–
PC	40	–
PCSC1	40	5
PCSC2	40	10
PCSC3	40	15
PCSC4	40	25

PBS= Solução salina tamponada (25 µL); PC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima*; PCSC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima* e soro anticrotático.

3.5.9 Atividade Hialuronidásica

Na avaliação da atividade hialuronidásica, os experimentos foram divididos em duas etapas: a primeira consistiu na determinação da Dose Hialuronidásica Mínima (DHdM) da peçonha de *Bothrops atrox* e a segunda na avaliação da habilidade do soro antibotrópico brasileiro na neutralização desta atividade.

A mesma metodologia foi adotada para a determinação da DHdM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* e avaliação da habilidade do soro anticrotálico brasileiro na neutralização desta atividade.

3.5.9.1 Determinação da dose hialuronidásica mínima (DHdM) das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*

A atividade hialuronidásica foi realizada *in vitro* e baseou-se no método descrito por Pukrittayakamee *et al.* (1988), modificado por Queiroz *et al.* (2008) em que a solução de ensaio torna-se menos turva na medida em que ocorre hidrólise do ácido hialurônico por hialuronidases presentes na amostra.

A solução consistiu de peçonha de *Bothrops atrox* (4; 8; 12; 24; 36; 48; 60 µg), 20µl de ácido hialurônico (0,5mg/ml) e tampão de acetato (0.2 M acetato de sódio/ ácido acético, pH 6.0, contendo 0.15 M NaCl) em um volume final de 100µl. Esta mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado 200 µl de brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) a 2,5% em solução de NaOH 2% e as respectivas absorbâncias mensuradas no espectrofotômetro SHIMATZU, a 405 nm. No tubo branco foi adicionado 100 µL de tampão acetato e 200 µL de BCTA. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para estimativa da porcentagem de redução de turbidez, utilizou-se um tubo chamado 100% turvo, contendo 80µl de tampão acetato e 20µl do substrato ácido hialurônico. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de BCTA.

A atividade específica foi determinada utilizando-se a relação Unidades de Redução de Turbidez (URT) / concentração de peçonha em miligramas:

$$\text{URT}^* / \text{concentração de peçonha (mg)} \quad \text{U/mg}$$

* URT (Unidade de redução de turbidez) = 1U = 50% de hidrólise do ácido hialurônico. Absorbância onde se verifica a redução de 50% de turbidez da solução de ensaio.

O mesmo procedimento metodológico foi utilizado para a determinação da DHdM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* (4; 8; 12; 24; 36; 48; 60 µg).

3.5.9.2 Avaliação da habilidade do soro antibotrópico e anticrotático brasileiro na neutralização da atividade hialuronidásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*

Para a indução da atividade hialuronidásica, foram utilizadas 1 DHdM (36µg) da peçonha de *Bothrops atrox* misturado com o soro antibotrópico (2.8µL), perfazendo um volume final de 100 µL. Imediatamente após, analisou-se a atividade hialuronidásica.

A mesma metodologia foi adotada para avaliar a habilidade do soro anticrotático na inibição da atividade hialuronidásica, utilizando-se 1 DHdM (36µg) da peçonha de *Crotalus durissus ruruima*. Ao tubo contendo a peçonha, adicionou-se 2.8µL de soro anticrotático.

3.5.10 Perfil eletroforético das proteínas das peçonhas

Para análise dos padrões eletroforéticos foi utilizado o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguindo o método descrito por Laemmli (1970). A eletroforese é uma técnica laboratorial que possibilita a separação ou fracionamento de materiais de origem orgânica tal como proteínas, enzimas, DNA e RNA, com cargas elétricas definidas por pHs específicos através de sua migração através dos poros de um gel, em resposta a um campo elétrico.

Para a preparação do gel superior (empacotamento) foram utilizadas soluções de acrilamida/bis-acrilamida (30%:0,8%), Tris-HCl pH 6,8 0,5 M, SDS 1 %, persulfato de amônio 0,03%, água e TEMED.

Para a preparação do gel inferior (corrida) foram utilizadas soluções de acrilamida/bis-acrilamida (30%:0,8%), Tris-HCl pH 8,8 2,0M, SDS 1 %, persulfato de amônio 0,03%, água e TEMED.

Os géis foram preparados e aplicados entre duas placas de eletroforese medindo 8x9 cm. Após a solidificação do gel, aplicou-se em dois poços 20µL da solução da peçonha de *Bothrops atrox* (5 µg/µL tampão da amostra) e em outros dois poços 20µL da solução da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* (5 µg/µL tampão da amostra). A solução tampão de amostra contém Tris-HCl 0,0625 M, pH

6,8, contendo β -mercaptoetanol a 5% (v/v), SDS a 2% (m/v), glicerol a 10% e azul de bromofenol a 0,001%.

Em um dos poços do gel foi adicionado uma solução contendo os padrões de peso molecular, fosforilase B (97KDa), albumina (66KDa), ovoalbumina (45KDa), anidrase carbônica (30KDa), inibidor de tripsina de soja (20,1KDa) e lactoalbumina (14,4KDa), provenientes da empresa GE Healthcare®.

O tempo de corrida foi de 4 horas em 10 mA e 40 V. O equipamento utilizado foi o Sistema de eletroforese vertical Vert-i10® (LOCCUS).

Após o término das corridas, os géis foram imediatamente corados com solução de Coomassie Brilliant Blue G250 durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os géis foram descorados com trocas sucessivas utilizando solução descorante de ácido acético (20%). Posteriormente os géis foram fotografados.

3.6 DESTINAÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS

Ao final de cada experimento, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ (Laboratório de Fármacos). As carcaças dos animais foram então descartadas com os resíduos biológicos da UNIFAP, e coletadas através de uma empresa especializada (TRATALIX) para que fossem incineradas.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir dos experimentos foram analisados pelos softwares InStat versão 3.01 e Graph Pad Prism versão 5.03 e expressos através da Média $\pm$ Erro Padrão, organizados e distribuídos na forma de gráficos e tabelas.

Para análise estatística utilizou-se os testes "t" de Student e análise de variância (ANOVA) acompanhado do teste de Tukey-Kramer. Os resultados com nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

Para os ensaios de letalidade utilizou-se o teste estatístico de regressão linear simples pelo método de PROBITOS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA

4.1.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

A peçonha da serpente *B. atrox* é constituída principalmente por proteínas com atividade enzimática e tem como características causar danos locais, tais como hemorragia, edema, mionecrose, infiltração de leucócitos e efeitos sistêmicos, como coagulopatias, nefrotoxicidade, disfunção hemodinâmica e cardiotoxicidade. A fisiopatologia dos acidentes ocasionados por serpentes envolve uma série complexa de eventos que dependem da ação combinada destes componentes da peçonha. (SALAZAR *et al.*, 2007; PAIVA *et al.*, 2011; KOHLHOFF *et al.*, 2012; JANUÁRIO *et al.*, 2004; CUNHA & MARTINS, 2012).

A atividade edematogênica de peçonhas ofídicas é resultado da ação sinérgica entre diversos componentes que induzem a liberação de mediadores químicos como as citocinas (proteínas de baixo peso molecular que mediam todas as fases da resposta inflamatória), causando aumento na permeabilidade das membranas e extravasamento de líquidos para o espaço extracelular (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

Os resultados do presente estudo mostraram que a peçonha botrópica induziu o edema na pata de camundongos, imediatamente após a administração da peçonha, atingindo um pico máximo em 0,5 hora (30 minutos) e decrescendo gradativamente (Figura 8).

A concentração de 0,10 mg/Kg promoveu um aumento estatisticamente significativo na espessura da pata dos animais, nos tempos de 0,5h (3.21 ± 0.017 , $p < 0,05$); 1h (3.02 ± 0.012 , $p < 0,05$); 2h (2.93 ± 0.048 , $p < 0,05$); 3h (2.66 ± 0.064 , $p < 0,05$) e 4h (2.52 ± 0.029 , $p < 0,05$), quando comparadas com os animais do grupo controle PBS (0,5h – 2.19 ± 0.0088 ; 1h – 2.15 ± 0.026 ; 2h – 2.14 ± 0.029 ; 3h – 2.14 ± 0.023 ; 4h – 2.13 ± 0.012).

O mesmo ocorreu com a concentração de 0,20 mg/Kg, conforme pode ser observado na Figura 8, que foi capaz de induzir edema estatisticamente significativo

nos tempos de 0,5h (3.39 ± 0.027 , $p < 0,01$); 1h (3.20 ± 0.064 , $p < 0,01$); 2h (3.18 ± 0.003 , $p < 0,01$); 3h (3.04 ± 0.076 , $p < 0,01$) e 4h (2.88 ± 0.016 , $p < 0,01$).

Após análise dos resultados, selecionou-se a menor concentração para a indução do edema (0,10 mg/Kg), responsável pelo aumento de 30% na espessura da pata dos camundongos. Este estudo ratifica pesquisas prévias que mostraram a capacidade da peçonha botrópica em induzir a formação do edema, através da ação dos componentes da peçonha sobre as células endoteliais vasculares e mediadores inflamatórios (PICOLO *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2008).

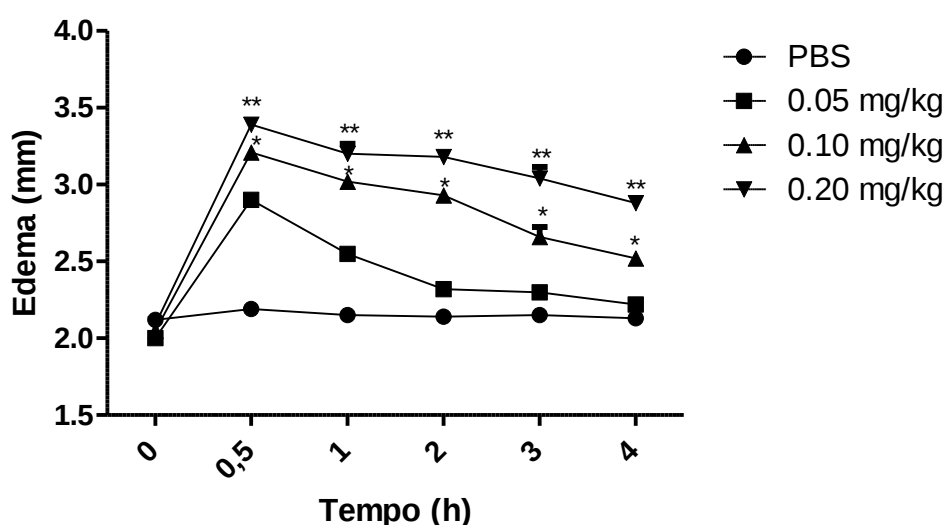


Figura 8 – Determinação da DEM induzida pela peçonha de *Botrophi atrox*.

Tratamentos: PBS= 50μL PBS; 0,05 mg/Kg/50 μL PBS; 0,10 mg/Kg/50 μL PBS; 0,20 mg/Kg/50μL. N= 12. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão.

A avaliação do efeito do soro antibotrópico sobre a atividade edematogênica induzida pela peçonha de *B. atrox*, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo PBA e os do grupo PBSB administrados com o soro antibotrópico. Sendo assim, o soro antibotrópico avaliado, não foi capaz de inibir o edema de pata nos tempos de 0,5; 1; 2; 3 e 4 horas, após a administração da peçonha de *B. atrox* capturada no Estado do Amapá (Figura 9).

Em estudo semelhante, utilizando o soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan de São Paulo-Brasil, PICOLO *et al.* (2002) demonstraram que a neutralização do edema induzido pela peçonha de *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*, só ocorre quando o soro é administrado antes do envenenamento, o que acaba por não refletir a realidade terapêutica.

Rojas e colaboradores (2005) avaliaram o soro antibotrópico, produzido pelo Centro Nacional de Produção de Biológicos do Peru, obtido pela imunização de cavalos com uma mistura das peçonhas de *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti*, *B. brazili* e *B. hyoprora* e o antipeçonha polivalente (*Crotalinae*). Os resultados demonstraram a neutralização da atividade edematogênica induzida pelas peçonhas de *B. brazili*, *B. pictus*, *B. barnetti* e *B. atrox*.

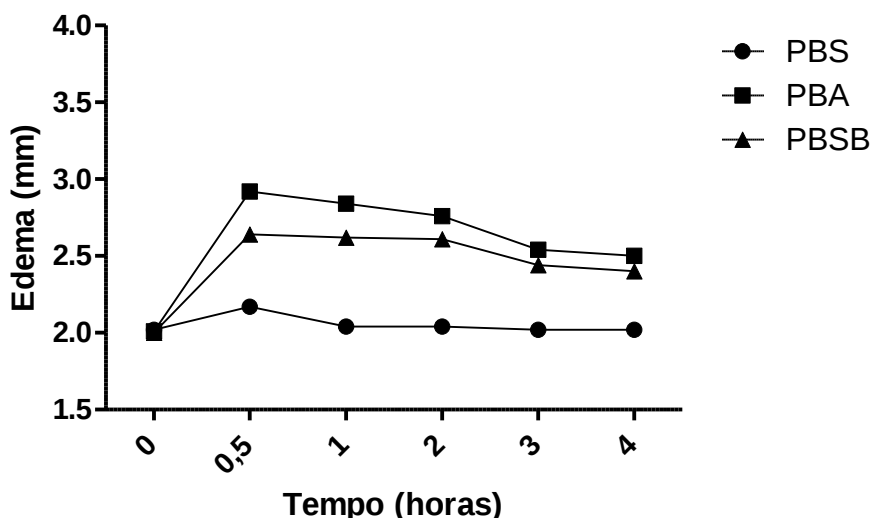


Figura 9 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade edematogênica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; PBSB= 0,20 mg/Kg/50µl + 60 µl soro antibotrópico. N= 9. Cada valor representa a média ± erro padrão.

4.1.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

A peçonha crotálica apresenta substâncias extremamente complexas compostas por enzimas, peptídeos e proteínas com algumas toxinas já identificadas como a crotamina, crotoxina, giroxina, convulsina, crotapotina e fosfolipase A₂ (JORGE & RIBEIRO, 1992).

A peçonha de *C. d. ruruima* pode apresentar duas variedades, denominadas branca ou amarela, de acordo com a sua coloração aparente após extração. Em estudos anteriores, um pool de peçonhas brancas de *C. d. ruruima* demonstrou exibir atividades letal, coagulante, miotóxicas, edematogênica e hemolíticas, muito semelhante à de *C. d. terrificus* (DOS-SANTOS *et al.*, 1993a). Para as peçonhas de variedade amarela, além disso, estavam presentes atividades de hemorragia, necrose, caseinolítica e crotamina (DOS-SANTOS *et al.*, 1993a, b).

No presente estudo, verificou-se que a peçonha da *C.d. ruruima* capturada no Estado do Amapá apresentou uma coloração branca após a extração. Nos ensaios de atividade *in vivo*, os resultados mostraram que a referida peçonha não induziu edema estatisticamente significativo na pata de camundongos, com as concentrações de 0,006; 0,012; 0,025 e 0,05 mg/Kg, quando comparado aos animais do grupo controle administrados somente com PBS (Figura 10). Barraviera (1990) citou que as manifestações locais causadas pela peçonha crotálica são de pequena relevância, o edema quando presente é discreto e na maioria das vezes não há reação local.

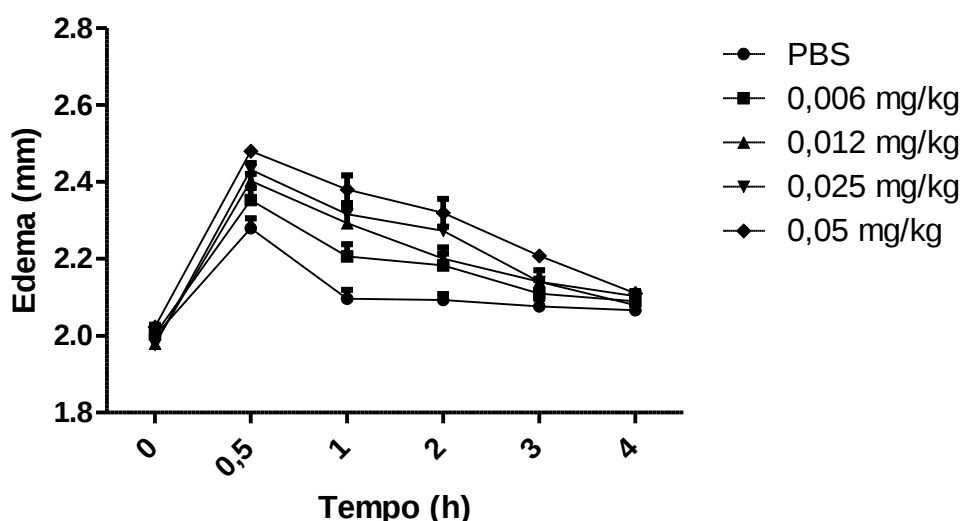


Figura 10 – Determinação da DEM induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,006 mg/Kg/50 µL PBS; 0,012 mg/Kg/50 µL PBS; 0,025 mg/Kg/50 µL PBS; 0,05 mg/Kg/50µL PBS. N= 12. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Dos Santos e colaboradores (2005) estudaram as atividades biológicas das peçonhas de seis espécimes de *C. d. ruruima* da mesma região geográfica e observou que a atividade edematogênica foi mais pronunciada nas amostras 82w e 68y, alcançando valores máximos após 30 e 60 min, respectivamente. Efeitos menos pronunciados foram observados com as peçonha 69y, 110w e 173w.

Outros estudos mostraram que as PLA₂, de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus*, foram capazes de produzir um efeito edematizante, miotóxico e até letal (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004a).

Sendo assim, os resultados encontrados com o presente estudo, em relação a atividade edematogênica, ratificaram a existência de variabilidade considerável dentro das populações de *C. d. ruruima*, que segundo Dos Santos e colaboradores (2005), poderia explicar diversidade qualitativa e quantitativa dos sintomas observados em pacientes picado por essa subespécie, mesmo na mesma localidade.

Como nenhuma das concentrações utilizadas produziu um edema estatisticamente significativo, não foi possível realizar a avaliação do soro anticrotálico na neutralização desta atividade.

4.2 ATIVIDADE NOCICEPTIVA

4.2.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

Para avaliar a atividade nociceptiva foi utilizado o teste da formalina, que corresponde a um modelo químico de nocicepção, sendo considerado atualmente o teste que mais se aproxima da dor clínica. Neste teste, o animal apresenta duas fases diferentes de nocicepção que envolve estímulos diferentes (SOARES *et al.*, 2009).

A primeira fase da avaliação da nocicepção (0 a 5 minutos) está relacionada com a excitação direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e de algumas fibras do tipo $A\alpha$ (alfa), estando associada à liberação de óxido nítrico, aminoácidos excitatórios, substância P, entre outros. Esta fase corresponde à dor neurogênica ou aguda. A segunda fase (20 a 30 minutos) está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como a serotonina, bradicinina, prostaglandinas, entre outros (HUNSKAAR, 1985; SOARES *et al.*, 2009).

O presente estudo avaliou a resposta nociceptiva utilizando o teste acima citado, em dois intervalos de tempo, sendo o primeiro de 0 a 5 minutos e o segundo de 20 a 30 minutos, porém substituiu-se a formalina pela peçonha de *Bothrops atrox* ou pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

Os resultados obtidos mostram que na primeira fase da atividade nociceptiva, somente os animais administrados com 0,10 mg/Kg (68.8 ± 14.9 ,

$p < 0,001$) e 0,20 mg/Kg (100.2 ± 11.2 , $p < 0,001$) mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle PBS (0.4 ± 0.54) (Figura 11A).

Na segunda fase (Figura 11B), os resultados mostraram que a peçonha de *B. atrox* induziu uma resposta nociceptiva nos animais estudados, sendo selecionada a DNM de 0,10mg PBBa/Kg, por ter sido a menor concentração capaz de induzir a nocicepção nos dois intervalos de tempo avaliados.

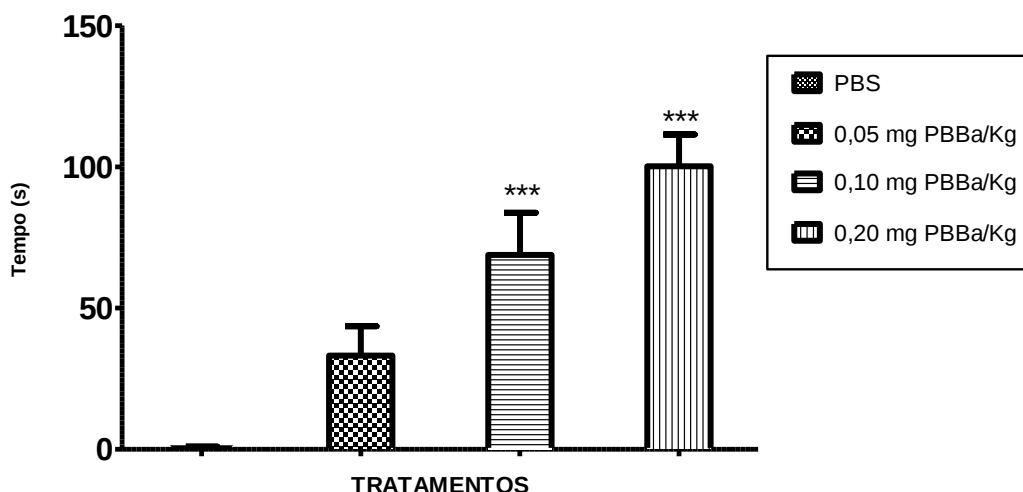


Figura 11A – Dose nociceptiva mínima (DNM) induzida pela peçonha da serpente *Bothrops atrox* – intervalo de 0-5 minutos.

Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50µL PBS. PBBa (Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*). N= 20. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,001$ (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer).

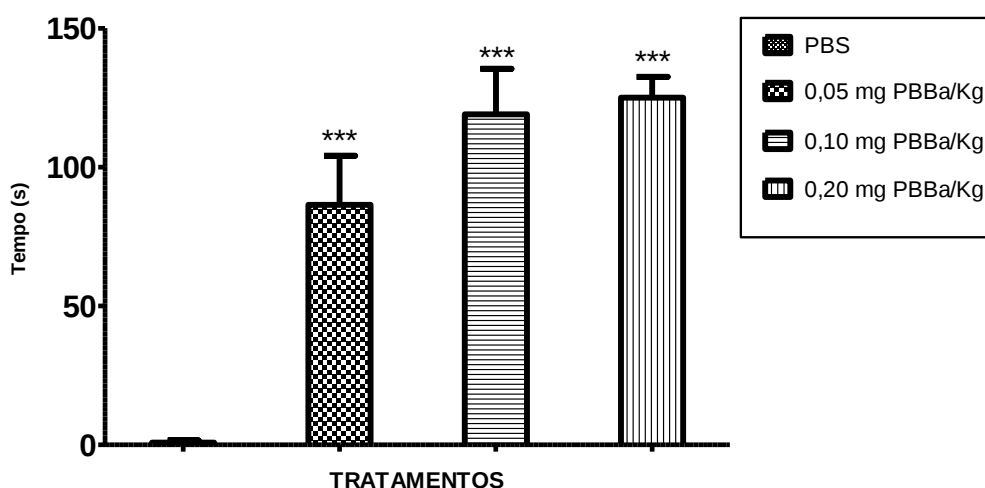


Figura 11B – Dose nociceptiva mínima (DNM) da peçonha da serpente *Bothrops atrox* – intervalo de 20-30 minutos.

Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg PBBa/Kg/50 µL PBS; 0,20 mg PBBa/Kg/50µL PBS. PBBa (Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*). N= 20. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,001$ (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer).

Nos ensaios utilizando-se o soro antibotrópico, observou-se que o mesmo não foi eficaz na neutralização da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *B. atrox*, no primeiro intervalo de tempo avaliado (0-5 min), quando se comparou os resultados obtidos com os apresentados pelos animais do grupo controle peçonha PBA (Figura 12A).

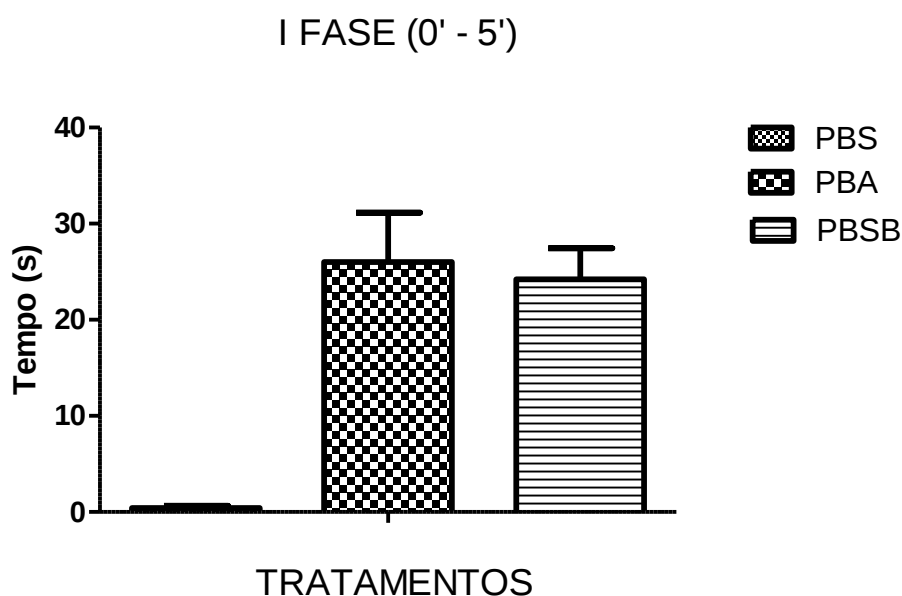


Figura 12A – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* – intervalo de 0-5 minutos.
Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; PBSB= 0,20 mg/Kg/50µl + 60 µl soro antibotrópico. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Os animais do grupo PBSB, apresentaram redução estatisticamente significativa somente na segunda fase da atividade nociceptiva (11.6 ± 0.68 , $p < 0,001$), quando comparado com os animais do grupo PBA (56.8 ± 1.89), sugerindo que a ação do soro antibotrópico é neutralizar a ação inflamatória causada pelos componentes da peçonha e não a ação neurogênica ocorrida nos primeiros 5 min. do envenenamento (Figura 12B).

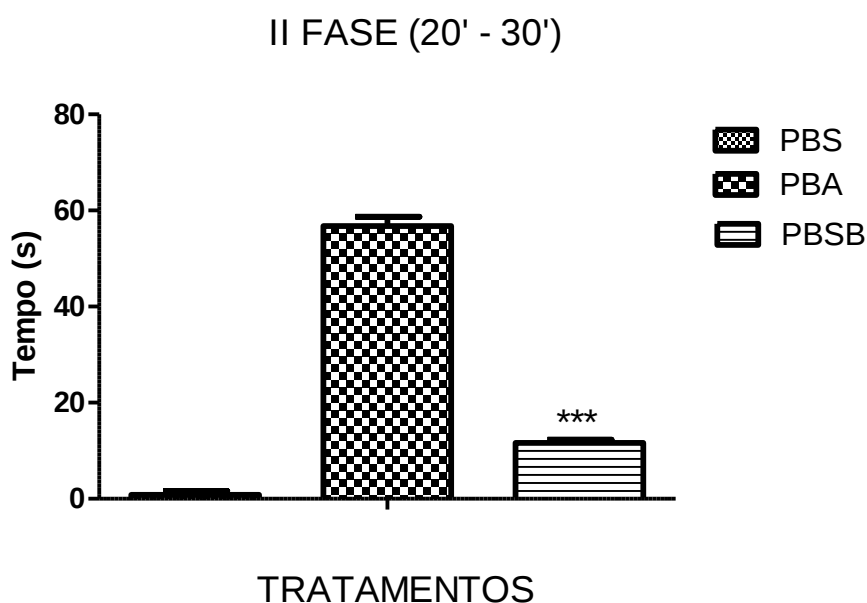


Figura 12B – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade nociceptiva induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* – intervalo de 20-30 minutos.
Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; PBSB= 0,20 mg/Kg/50µl + 60 µl soro antibotrópico. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão.

4.2.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Nos ensaios de atividade nociceptiva, realizados *in vivo*, os resultados mostraram que a peçonha de *C.d. ruruima* capturada no Estado do Amapá não induziu nocicepção na pata de camundongos, com as concentrações de 0,006; 0,012 e 0,025 mg/Kg, quando comparado aos animais do grupo controle administrados somente com PBS. Ressalta-se que os camundongos não lambeiram em nenhum momento a pata administrada com peçonha nos tempos avaliados de 0 a 5 minutos (primeira fase) e de 20 a 30 minutos (segunda fase).

Os resultados verificados no presente estudo corroboram a citação de Barravieira (1990) que diz que as manifestações locais do envenenamento crotálico são de pequena relevância, diferindo das peçonhas botrópica e laquética, pois a dor é geralmente inexistente e, quando esta existe, é de baixa intensidade.

Segundo Rosenfeld (1971) e o Ministério da Saúde (2001) a peçonha das serpentes da espécie *Crotalus durissus*, ao contrário das peçonhas de outras espécies, não provoca dor ou destruição tecidual no local da inoculação, mas sim uma sensação de parestesia na área afetada pela picada.

Sendo assim, diversos estudos têm sido realizados demonstrando um efeito analgésico associado às toxinas presentes na peçonha de serpentes *Crotalus*. Giorgio e colaboradores (1993) demonstraram que compostos com peso molecular inferior a 3000 Da, presentes na peçonha de *C.d. terrificus* apresentaram efeitos antinociceptivos em ratos, possivelmente mediados por receptores opióides. Estudos de Picolo *et al.* (2002) demonstraram que esse efeito antinociceptivo envolve pelo menos parcialmente, uma cascata de eventos moleculares caracterizado pela ativação local de receptores opióides δ e κ , seguido por uma estimulação da via neuronal L-arginina-óxido nítrico GMPc, com consequente abertura de canais de K⁺ ATP-sensível.

A crotamina, isolada da peçonha de *C.d.terrificus* produz paralisia em ratos com doses muito elevadas, porém apresenta efeito analgésico em doses inferiores, sem qualquer toxicidade *in vivo*. O efeito antinociceptivo da crotamina (i.p.) é cerca de 30 vezes mais elevada que a morfina, envolvendo ações centrais (teste da placa quente) e periféricas (método de contorção por ácido acético) (MANCINI *et al.*, 1998).

Em estudo realizado com um teste de Hargreaves modificado avaliou o efeito antinociceptivo da crotoxina de *C. d. terrificus*, onde os resultados mostraram um aumento no tempo de retirada da pata após um estímulo calórico nos animais administrados a crotoxina estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado aos animais do grupo solução salina (WOLZ-RICHTER *et al.*, 2013).

Como nenhuma das concentrações da peçonha de *C. d. ruruima* utilizadas induziu a nocicepção, não foi possível realizar a avaliação do soro anticrotálico na neutralização desta atividade.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

4.3.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

A resposta inflamatória é um dos principais sinais induzido pelo envenenamento botrópico, e se não controlado pode levar ao aparecimento da síndrome compartimental e/ou pode evoluir para necrose tecidual, ocasionando a perda de função da região afetada ou até mesmo a amputação do membro

(FURTADO *et al.*, 1991a; DA COSTA *et al.*, 2008; NUÑÉZ *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2012). Segundo Furtado e colaboradores (1991b), esse efeito é mais intenso nos acidentes ocasionados pela serpente *Bothrops atrox*.

Peçonhas de serpentes da família Viperidae contém PLA₂, que compartilham características estruturais com PLA₂ presentes no exsudato inflamatório em mamíferos (KINI, 1997). Essas enzimas possuem um papel relevante na resposta inflamatória e têm sido encontradas envolvidas em funções dos macrófagos (MOREIRA *et al.*, 1994).

Os macrófagos são células multifuncionais e desempenham um papel importante na resposta imune, exercendo função de defesa através de várias atividades, que incluem a fagocitose, produção de agentes antimicrobianos, a secreção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, e apresentação e processamento de antígenos (SETÚBAL *et al.*, 2013). O mecanismo pelo qual as PLA₂s estimulam a fagocitose ainda não está bem elucidado.

Setúbal e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos das fosfolipases A₂, BaltTXI e BaltTXII, isoladas da peçonha de *Bothrops alternatus* sobre as funções dos macrófagos, tais como fagocitose e produção de superóxido. Os resultados mostraram que em concentrações não-citotóxicas, estas PLA₂ exercem uma ação estimuladora sobre as funções dos macrófagos. As toxinas não afetaram a viabilidade dos macrófagos, indicando sua baixa toxicidade neste tipo de célula.

Os resultados do presente estudo mostraram que a peçonha de *B. atrox*, em diferentes concentrações, promoveu uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal dos animais submetidos à administração da mesma, quando comparados aos camundongos do grupo controle, administrados somente com PBS. Tal fato pode ser constatado, pelo aumento do número total de leucócitos (Figura 13), diminuição do número de células mononucleares (Figura 14) e o aumento da migração de células polimorfonucleares (Figura 15) nos animais administrados com a peçonha de *B. atrox*.

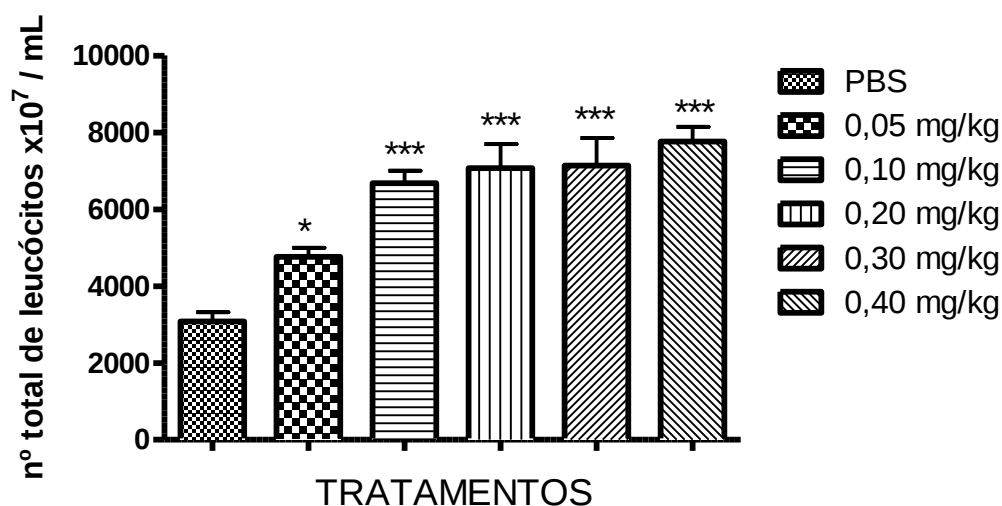


Figura 13 – Dose inflamatória mínima (DIM) da peçonha da serpente *Bothrops atrox*. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg/Kg/50 µL PBS; 0,20 mg/Kg/50µL; 0,30 mg/Kg/50 µL PBS; 0,40 mg/Kg/50 µL PBS. N= 30. Cada valor representa a média ± erro padrão. *p<0,05; *** p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS.

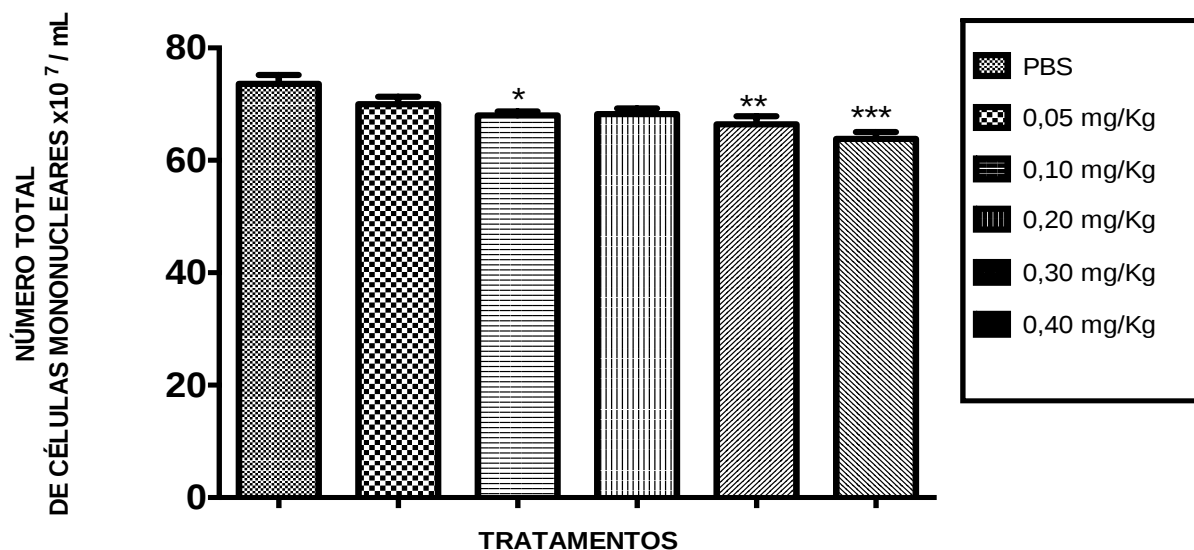


Figura 14– Efeito da administração da peçonha da serpente *Bothrops atrox* sobre a migração de células mononucleares para cavidade peritoneal de camundongos. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,05 mg/Kg/50 µL PBS; 0,10 mg/Kg/50µL; 0,20 mg/Kg/50µL; 0,30 mg/Kg/50 µL PBS; 0,40 mg/Kg/50 µL PBS. N= 30. *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS. Cada valor representa a média ± erro padrão.

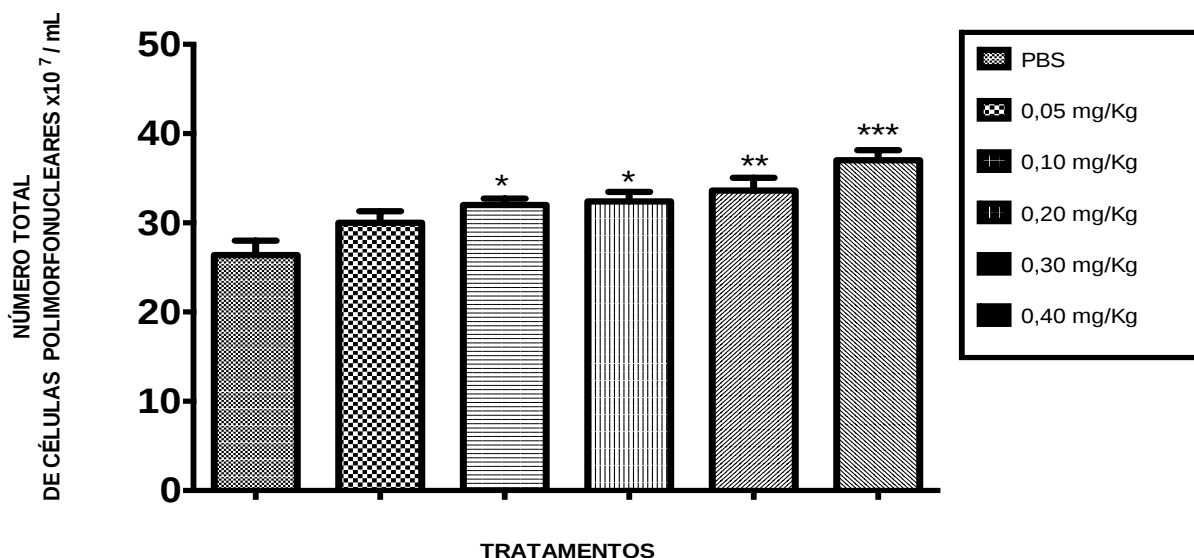


Figura 15 – Efeito da administração da peçonha da serpente *Bothrops atrox* sobre a migração de células polimorfonucleares para cavidade peritoneal de camundongos. Tratamentos: PBS= 50μL PBS; 0,05 mg/Kg/50 μL PBS; 0,10 mg/Kg/50 μL PBS; 0,20 mg/Kg/50μL; 0,30 mg/Kg/50 μL PBS; 0,40 mg/Kg/50 μL PBS. N= 30. *p<0,05; ** p<0.01; *** p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Tais resultados corroboram os estudos realizados por Kanashiro e colaboradores (2002), que isolaram e identificaram dois compostos (BaPLA₂I e BaPLA₂III) envolvidos na indução da reação inflamatória induzida pela peçonha de *B. atrox* e que estão relacionadas com a liberação da histamina decorrente da desgranulação dos mastócitos, além de promoverem a elevação dos níveis de creatina quinase.

Segundo Albertini *et al.* (2007) e Leite *et al.* (2007), a reação inflamatória é um fenômeno de natureza complexa que envolve interações entre células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e monócitos/macrófagos) e sistema vascular.

A migração de leucócitos nos tecidos é um processo de múltiplas etapas mediadas por uma interação dinâmica entre moléculas de adesão expressas por leucócitos e células endoteliais (BEVILACQUA & NELSON, 1993). A expressão dessas células de adesão é regulada por citocinas pró-inflamatórias (POBER, 1987; RIDGER *et al.*, 2001) e quimiocinas (HICKEY *et al.*, 1997; KONSTANTOPOULOS & MCINTIRE, 1997).

Após a análise estatística dos resultados encontrados no presente estudo, verificou-se que a dose inflamatória mínima para a indução da referida atividade foi a de 0,10 mg/kg, capaz de induzir um aumento no número de leucócitos totais do lavado peritoneal coletado dos animais administrados com a peçonha botrópica

(6680 ± 325.8 , $p < 0,001$) quando comparado aos resultados apresentados pelos animais do grupo controle PBS (3080 ± 241.7).

Estudos realizados por Branco *et al.* (2011) demonstraram que camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George, da Universidade Federal de Paraíba, apresentavam uma contagem total de leucócitos de $6.000/\text{mm}^3$. Em relação à contagem de células diferenciais, os resultados do estudo citado mostraram que o percentual de células mononucleares foi de 76,8% e de células polimorfonucleares foi 23,2%.

No presente estudo, verificou-se que o percentual de células mononucleares nos camundongos administrados somente com PBS foi de 73% e de células polimorfonucleares foi 27%, corroborando com os resultados mostrados por Branco *et al.*, 2011. Os animais que receberam diferentes concentrações da peçonha de *B. atrox* apresentaram uma diminuição no número de células mononucleares e um aumento no número de células polimorfonucleares, caracterizando o desenvolvimento de um processo inflamatório.

Na avaliação do efeito do soro antibotrópico sobre a atividade inflamatória induzida pela administração da peçonha de *B. atrox* na cavidade peritoneal de camundongos (Figura 16), os resultados mostraram que houve redução estatisticamente significativa no número total de leucócitos nos animais administrados com o soro antibotrópico (3360 ± 191.3 , $p < 0,001$) quando comparado aos animais do grupo controle peçonha (6160 ± 592.1). Porém, uma redução estatisticamente significativa não foi observada em relação às células mononucleares (Figura 17) e polimorfonucleares (Figura 18).

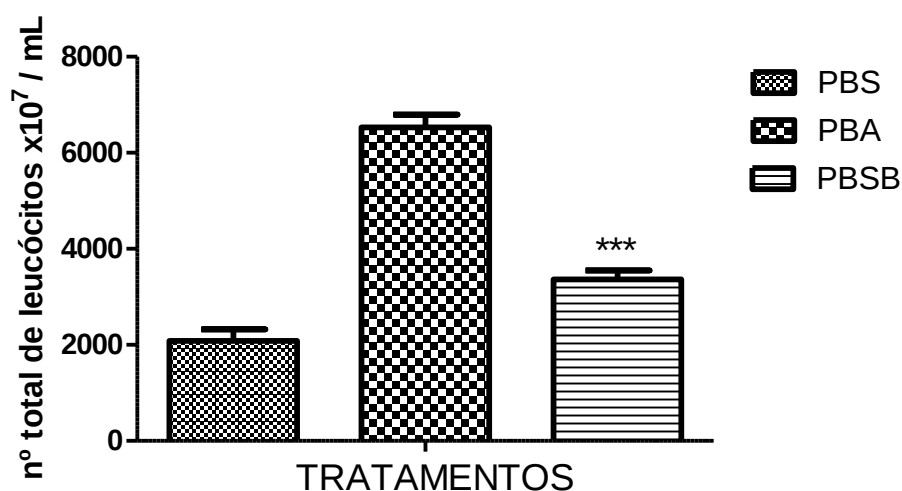


Figura 16 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; PBSB= 0,20 mg/Kg/50µl + 60 µl soro antibotrópico. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão.

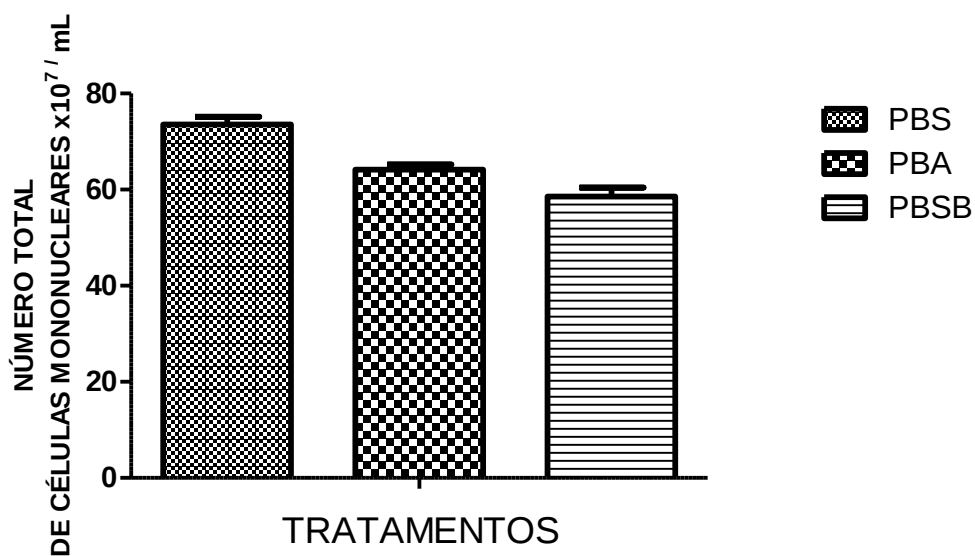


Figura 17 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da migração de células mononucleares induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; PBSB= 0,20 mg/Kg/50µl + 60 µl soro antibotrópico. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão

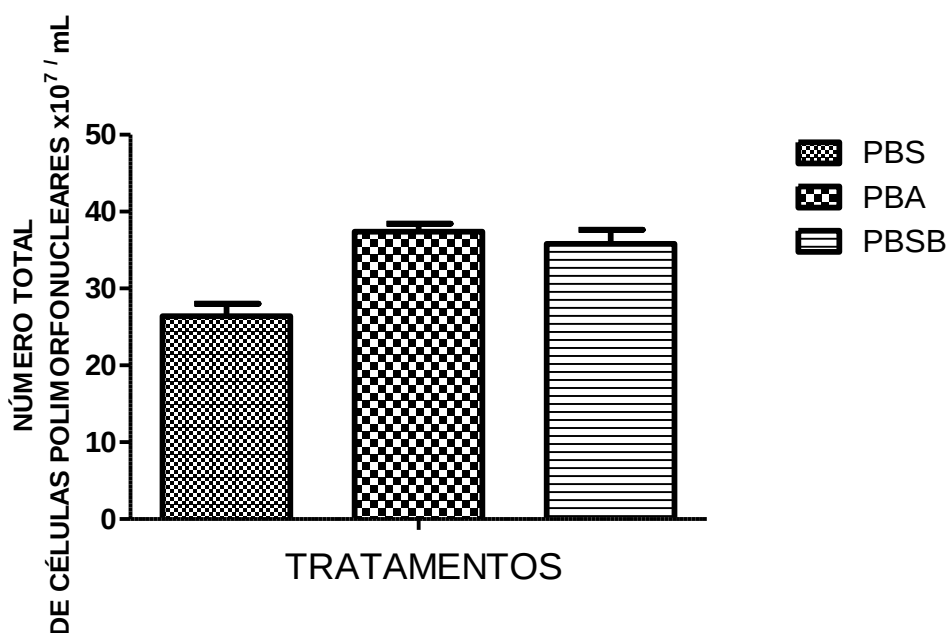


Figura 18 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da migração de células polimorfonucleares induzidas pela peçonha de *Bothrops atrox*. Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 0,20 mg/Kg/50µl PBS; PBSB= 0,20 mg/Kg/50µl + 60 µl soro antibotrópico. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão

A literatura descreve que os sintomas locais do envenenamento botrópico são os mais difíceis de neutralizar, uma vez que estas peçonhas atuam muito rapidamente e alguns desses efeitos são causados por mediadores endógenos da resposta inflamatória liberados pelo tecido lesado, em resposta à ação destas peçonhas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988; PICOLO *et al.*, 2002).

De Sousa *et al.* (2012), avaliaram o efeito do soro antibotrópico e do laser de baixa potência Arseneto de Gálio na neutralização da peçonha de *Bothrops atrox* na atividade inflamatória, constatando que na contagem total de leucócitos o grupo peçonha de *Bothrops atrox* (1510±33.1) apresentou aumento significativo do número de leucócitos e após 72h observou-se redução estatisticamente significativa do número total de leucócitos no grupo de animais onde administrou-se soro antibotrópico (1040±50.1, $p < 0.001$).

4.3.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Modelos inflamatórios utilizando a peçonha de *Crotalus durissus ruruima* não têm sido estudados. A literatura existente até o presente momento relata apenas os

efeitos inflamatórios e antiinflamatórios da peçonha de outras subespécies de *Crotalus durissus*.

Cruz e colaboradores (2005) estudaram os efeitos da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* em relação à sensibilidade e aos mediadores inflamatórios envolvidos em um modelo experimental de envenenamento grave em camundongos. Os referidos autores concluíram que o envenenamento por *C.d. terrificus* mostrou uma dominância de citocinas pró-inflamatórias (2 primeiras horas após a administração da peçonha) e com o aumento do tempo, ocorre uma predominância de citocinas anti-inflamatórias, proporcionando mais evidências para o papel desempenhado por esta peçonha na modulação do equilíbrio de citoquinas pro/anti-inflamatórias.

Nunes e colaboradores (2010) investigaram os componentes responsáveis pelas propriedades antiinflamatórias da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e demonstraram que a crotoxina inibiu significativamente o edema e migração de células inflamatórias quando administrada antes ou depois da injeção de carragenina em ratos e também inibiu a adesão celular, demonstrando que a referida toxina é o componente responsável pela atividade antinflamatória de longa duração da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

Silva e colaboradores (2012) administraram diferentes concentrações de crotoxina (5µg, 10µg, 20µg, 40µg e 80µg) na pele do dorso de camundongos, as quais foram submetidas à análise histopatológica. Os resultados obtidos com o referido trabalho mostraram que a crotoxina (PLA₂) causou relevantes alterações teciduais e inflamatórias sobre o modelo estudado. A reação inflamatória foi mais evidente a partir do grupo tratado com 10µg pela presença de um infiltrado de leucócitos com predomínio de neutrófilos.

Poucos autores se referem ao comportamento dos leucócitos no envenenamento crotálico e quando o fazem é apenas como um dado complementar. No entanto, alterações no número de leucócitos são esperadas, na qual a leucocitose por neutrofilia está presente (AZEVEDO-MARQUES, 2003).

Após análise estatística, verificou-se que a menor dose capaz de induzir um processo inflamatório na cavidade peritoneal foi a de 0,006 mg/kg (4416±204, p<0,05) quando comparado aos animais do grupo controle administrados somente com PBS (3080±241.66). Os resultados do presente estudo mostraram que a

peçonha de *C.d. ruruima*, administrada por via intraperitoneal em camundongos, foi capaz de induzir uma resposta inflamatória aguda, observada através do aumento do número total de leucócitos (Figura 19), diminuição do número de células mononucleares (Figura 20) e aumento de células polimorfonucleares (Figura 21).

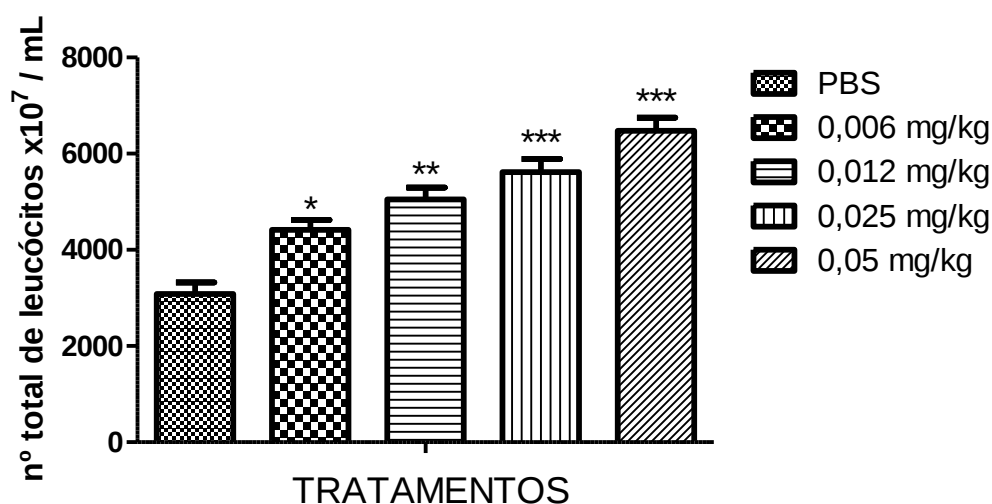


Figura 19 – Dose inflamatória mínima (DIM) da peçonha da serpente *Crotalus durissus ruruima*. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,006 mg/Kg/50 µL PBS; 0,012 mg/Kg/50 µL PBS; 0,025 mg/Kg/50 µL PBS; 0,05 mg/Kg/50 µL PBS. N= 25. Cada valor representa a média ± erro padrão.*** p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS.

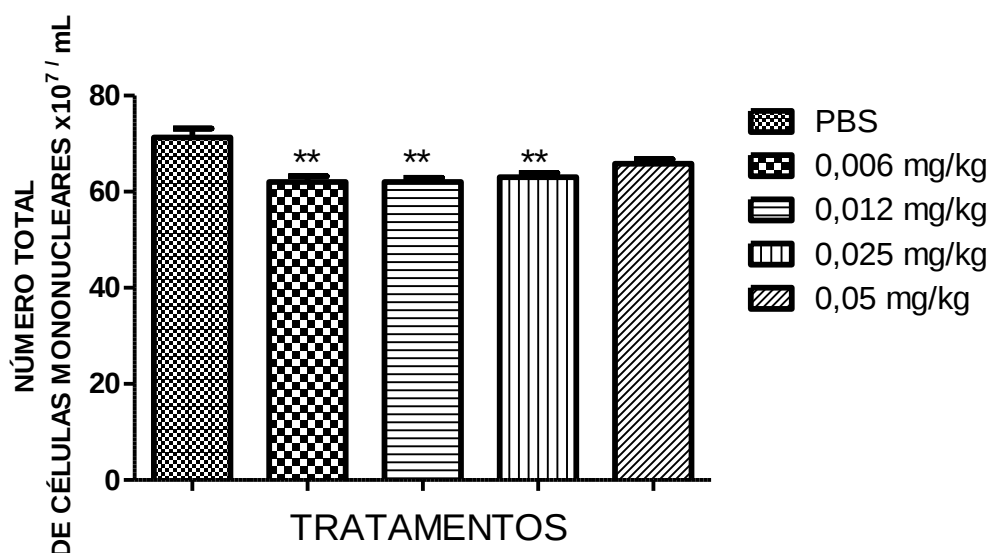


Figura 20 – Efeito da administração da peçonha da serpente *Crotalus durissus ruruima* sobre a migração de células mononucleares para cavidade peritoneal de camundongos. Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,006 mg/Kg/50 µL PBS; 0,012 mg/Kg/50 µL PBS; 0,025 mg/Kg/50 µL PBS; 0,05 mg/Kg/50 µL PBS. N= 25. *p<0,05; ** p<0.01; *** p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS. Cada valor representa a média ± erro padrão.

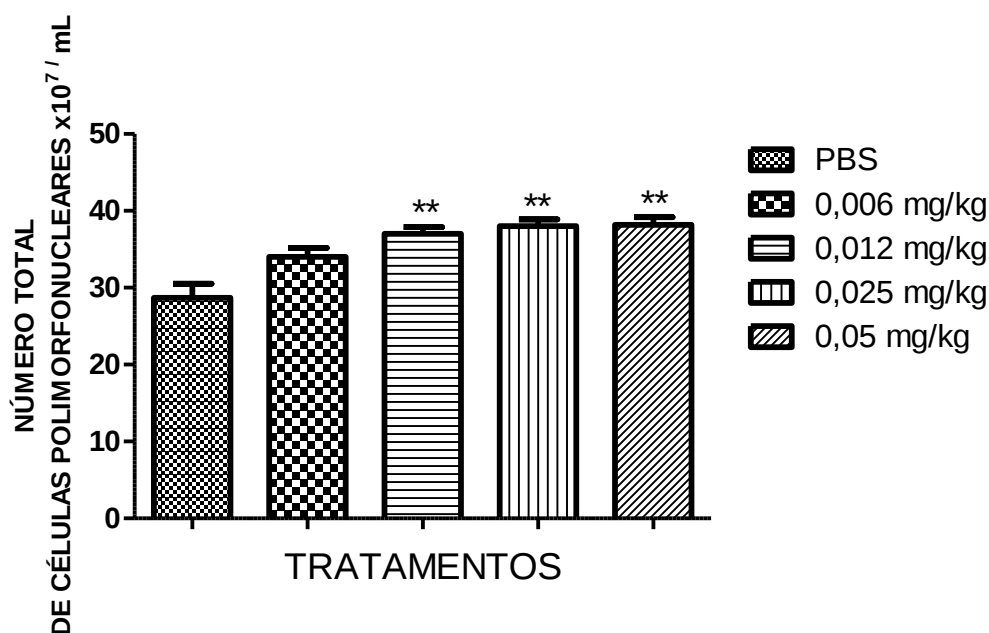


Figura 21 – Efeito da administração da peçonha da serpente *Crotalus durissus ruruima* sobre a migração de células polimorfonucleares para cavidade peritoneal de camundongos.

Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,006 mg/Kg/50 µL PBS; 0,012 mg/Kg/50 µL PBS; 0,025 mg/Kg/50 µL PBS; 0,05 mg/Kg/50 µL PBS. N= 25. *p<0,05; ** p<0.01; *** p<0,001 (Teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer) quando comparados com o grupo PBS. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Na avaliação do efeito do soro anticrotático sobre a atividade inflamatória induzida pela administração da peçonha de *C.d. ruruima* na cavidade peritoneal de camundongos (Figura 22), os resultados mostraram que não houve redução estatisticamente significativa no número total de leucócitos nos animais administrados com o soro antibotrópico, quando comparado aos animais do grupo controle peçonha. Não houve alteração também no número de células mononucleares (Figura 23) e polimorfonucleares (Figura 24) entre os animais administrados com o soro e os do grupo controle peçonha.

Sampaio *et al.* (2003) mostrou em seus estudos, que o soro anticrotático reduziu em 53% a migração de macrófagos na região peritoneal em ratos, administrados com a peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

Antunes (1987) demonstrou que o soro anticrotático não neutraliza a atividade liberadora de histamina induzida pela crotamina, isolada das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus cascavella*.

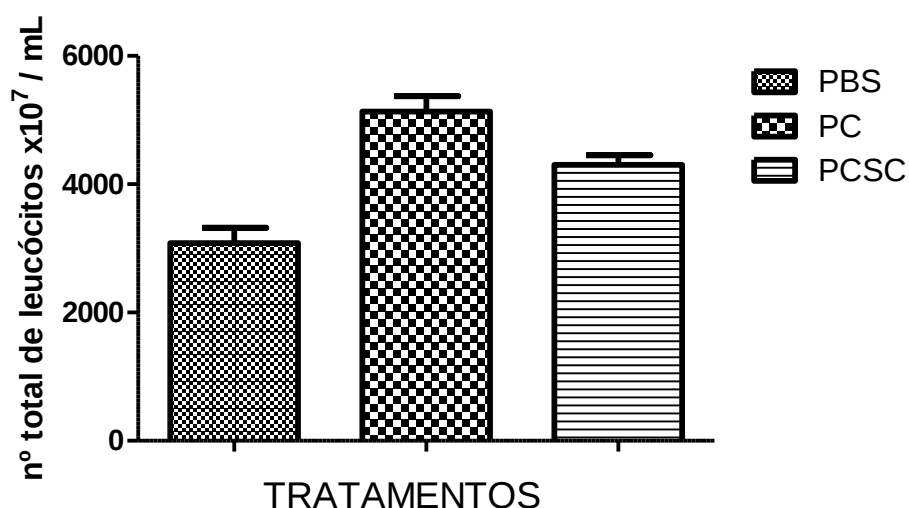


Figura 22 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da atividade inflamatória induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PC= 0,012 mg/Kg/50µl PBS; PCSC= 0,012 mg/Kg/50µl + 60 µl soro anticrotático. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão.

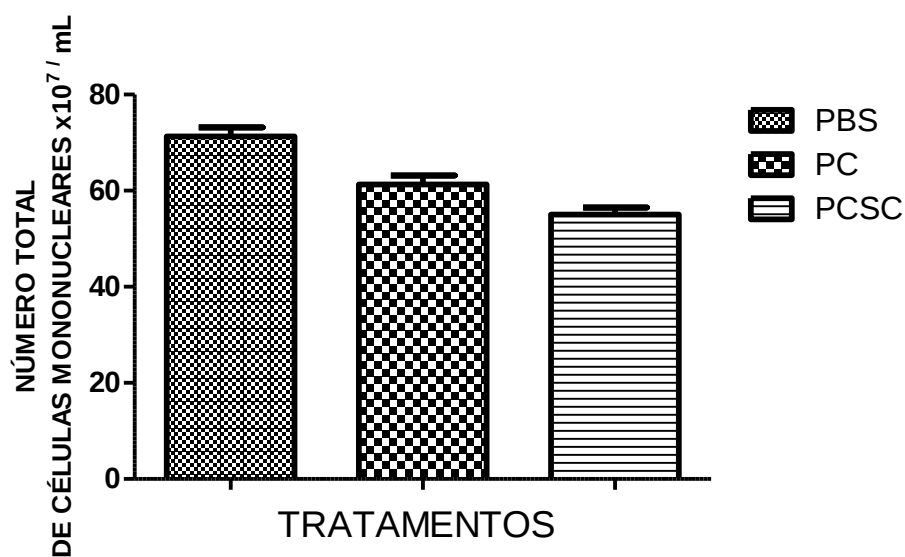


Figura 23 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da migração de células mononucleares induzidas pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PC= 0,012 mg/Kg/50µl PBS; PCSC= 0,012 mg/Kg/50µl + 60 µl soro anticrotático. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão

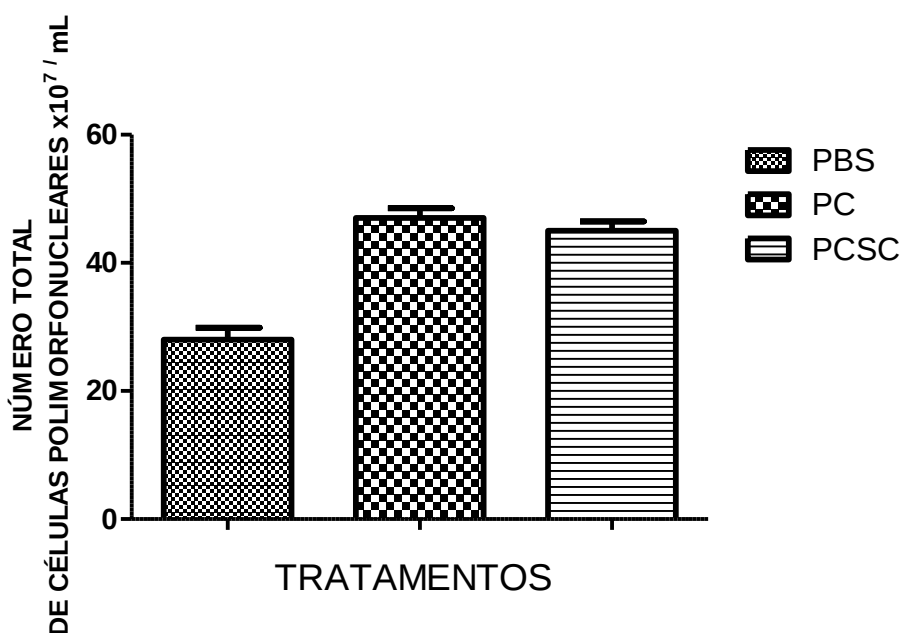


Figura 24 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da migração de células polimorfonucleares induzidas pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*. Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PC= 0,012 mg/Kg/50µl PBS; PCSC= 0,012 mg/Kg/50µl + 60 µl soro anticrotático. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão

4.4 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

4.4.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

O mais sério efeito sistêmico e a mais comum complicação envolvida nos casos letais dos envenenamentos botrópicos são a hemorragia, levando ao choque cardiovascular e à falência renal aguda secundariamente à necrose tubular aguda e ocasionalmente glomerulonefrite (WARRELL, 2004; GUTIÉRREZ, 1995a; AMARAL, 1986).

A hemorragia nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* são causados pela ação de metaloproteases que provavelmente degradam o colágeno e outros componentes da lâmina basal de vasos capilares. Como consequência, os capilares são rompidos e ocorre a hemorragia (GUTIÉRREZ, 1990).

As metaloproteases (SVMP's) são enzimas proteolíticas conhecidas como hemorraginas e são divididas em quatro classes: Classe PI (massa molecular entre 20 a 30 kDa); Classe PII (massa molecular entre 30 a 50 Kda); Classe PIII (massa molecular entre 50 a 80 kDa) e classe PIV (massa molecular entre 80 a 100 kDa).

Estão envolvidas em diversos processos como degradação de fatores da cascata da coagulação sanguínea; inibição da agregação plaquetária; necrose tecidual, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (KANASHIRO *et al.*, 2002; BALDO *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2012).

Atroxina, uma enzima proteolítica, foi isolada da peçonha de *B. atrox* por Pantigoso *et al.* (1996) exercendo efeito hemorrágico e necrótico em ensaios biológicos em camundongos. Patiño e colaboradores (2010) isolaram a Batx-I da peçonha de *B. atrox*, uma SVMP's pertencente à classe I que apresentou efeitos hemorrágicos e fibrinogenolíticos.

Os resultados do presente estudo mostraram que a concentração de peçonha de *B. atrox*, capaz de induzir uma lesão hemorrágica com halo de 10 mm de diâmetro foi de 0,20 mg/Kg/ 50 µL PBS sendo, portanto, considerada como a dose hemorrágica mínima (Figura 25). Em estudo realizado por Da Silva (2005), foi verificado que a dose hemorrágica mínima da peçonha da serpente *B. atrox*, proveniente do Instituto Butantan, correspondeu a 0,32 mg/Kg, comprovando a variabilidade biológica na composição das peçonhas de serpentes.

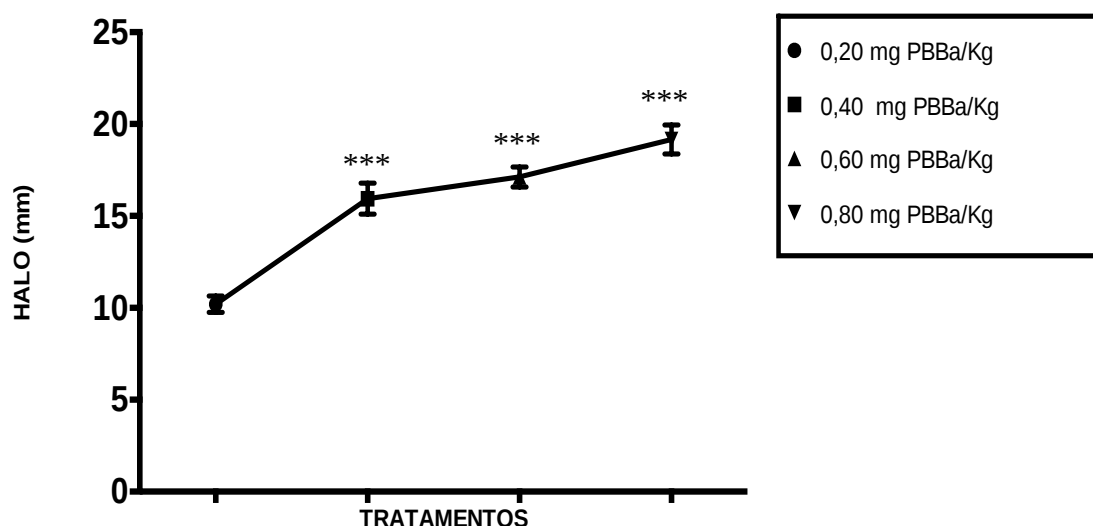


Figura 25 – Determinação da dose hemorrágica (DHM) induzida pela peçonha de *B. atrox*. Tratamentos: 0,20 mg PBBa/Kg/50µl PBS; 0,40 mgPBBa/Kg/50µl PBS; 0,60 mg PBBa/Kg/50µl PBS; 0,80 mg PBBa/Kg/50µl PBS. PBBa (Peçonha Bruta de *Bothrops atrox*). N= 25. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Para avaliação da habilidade do soro antibotrópico administrou-se 60 µL do referido soro 30 minutos após a administração de 2 DHM da peçonha de *Bothrops atrox* (0,40mg PBA/Kg/ 50 µL PBS) para avaliação da atividade hemorrágica. A

figura 26 mostra a lesão hemorrágica na pele do dorso dos animais após administração da peçonha de *Bothrops atrox*.

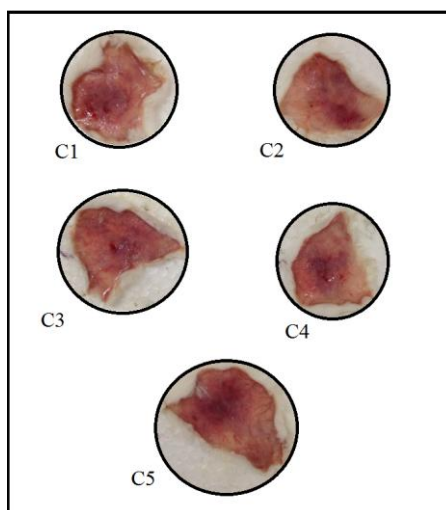


Figura 26 – Halos hemorrágicos formados após administração da peçonha *Bothrops atrox*.
Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento efetuado com o grupo soro PBSB (0 ± 0.000 , $p < 0,001$) e o grupo PBA (19.8 ± 0.7176) havendo neutralização de 100% da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. atrox* (Figura 27).

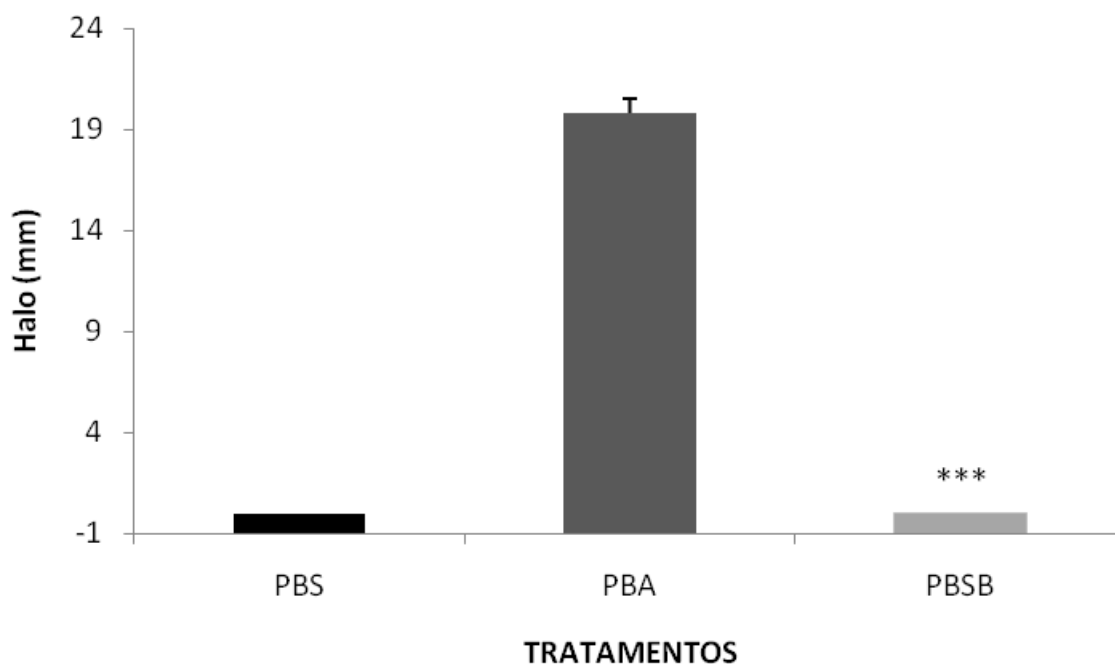


Figura 27 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.
Tratamentos: PBS= 50µl PBS; PBA= 0,40mg/Kg/50µL PBS; PBSB= 0,40mg/Kg/50µL PBS + 60 µl soro antibotrópico. N= 15. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão.

Fernandes e colaboradores (2010), comprovaram a capacidade de 3 anticorpos monoclonais de neutralizar a hemorragia induzida por uma metaloproteína isolada da peçonha de *Bothrops asper*. Porém, os referidos anticorpos monoclonais não foram capazes de neutralizar a atividade hemorrágica quando induzida pela peçonha de *Bothrops asper*.

Colombini (2001) demonstrou que a atividade hemorrágica induzida pela peçonha de *B. atrox* foi neutralizada por anti-peçonhas de *Bothrops atrox* e *Lachesis muta muta*, sendo a anti-peçonha de *B. atrox* mais eficaz em concentrações elevadas, enquanto que em menores doses, o anti-peçonha *Lachesis muta muta* apresentou melhor neutralização.

Frauches *et al.* (2013) mostraram que diferentes concentrações de um anticorpo (mAb 59/2-E4) purificado do soro antibotrópico, cedido pelo Instituto Butantan, neutralizou a hemorragia induzida por 5µg da peçonha de *Bothrops atrox*. Outros estudos demonstraram que o soro antibotrópico polivalente testado em camundongos por Schneider *et al.* (2012) reduziu a hemorragia causada pela peçonha de *Bothrops andianus*.

Dos-Santos *et al.* (2011) demonstraram que anti-peçonhas poliespecíficos produzidos pela purificação de imunoglobulinas do plasma de animais imunizados com misturas de peçonhas mostrou um alto título de anticorpos e capacidade de neutralização da atividade hemorrágica e coagulante melhor do que anti-peçonhas produzidos com misturas de anticorpos purificados de plasmas de animais imunizados separadamente com peçonhas simples.

Porém, os resultados do presente estudo, demonstraram que o soro antibotrópico avaliado, proveniente do Instituto Vital Brazil S.A., e produzido a partir de imunoglobulinas obtidas de soros de equinos imunizados com peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops newviedi* foi muito eficaz, pois conseguiu neutralizar em 100% a hemorragia induzida pela peçonha de *B. atrox* proveniente do Estado do Amapá.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lira *et al.* (2007), pois a hemorragia induzida pelas peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops insularis* foi neutralizada pelo anti-peçonha botrópico produzido pelo instituto Butantan na imunização de cavalos com a mistura das peçonhas de *Bothrops jararaca* (50%),

Bothrops jararacussu (12.5%), *Bothrops moojeni* (12.5%), *Bothrops neuwiedi* (12.5%) e *Bothrops alternatus* (12.5%).

4.4.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Segundo Dos Santos *et al.* (1993a,b), a peçonha de *Crotalus durissus ruruima* de variedade branca não apresenta atividade hemorrágica.

Tal característica foi encontrada no presente estudo, após a administração de 0,006; 0,012; 0,025; 0,05 ou 0,10 mg/Kg/50µl PBS da peçonha de *C.d. ruruima* por via intradérmica no dorso de camundongos. Nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de desenvolver halos hemorrágicos, sendo assim não foi possível realizar a avaliação do efeito do soro anticrotálico sobre esta atividade.



Figura 28 – Ausência de halo hemorrágico observado após administração de 0,05 mg/Kg/50µl PBS da peçonha de *C.d. ruruima*
Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

4.5 ATIVIDADE MIOTÓXICA

4.5.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

As miotoxinas são componentes das peçonhas de serpentes que apresentam uma ação específica sobre o músculo esquelético, e o efeito produzido por estas é denominado de miotoxicidade. As miotoxinas são proteínas com estrutura de fosfolipase A₂ da classe II, que atuam nas células musculares causando

necrose no tecido muscular (mionecrose) (MEBS & OWNBY, 1990; LOMONTE et al., 1990).

A maioria das peçonhas de serpentes apresentam as fosfolipases A_2 que são enzimas que catalisam a hidrólise na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. Esse processo resulta na liberação do ácido araquidônico, precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, iniciando uma série de reações inflamatórias. As fosfolipases A_2 podem produzir miotoxicidade, neurotoxicidade, hemólise, hipotensão, efeito anticoagulante, edema e efeitos na agregação plaquetária (CARREIRO, COGO & JÚNIOR, 2005; SANTOS-FILHO, 2008). A fosfolipase (PLA_2) constitui o maior componente presente na peçonha de serpente e tem sido extensivamente investigado não só por ser mais abundante, mas por exibir uma ampla gama de efeitos biológicos (FONSECA, 2011).

Entretanto, a miotoxicidade pode ser resultado da interação de outras toxinas da peçonha com células do tecido muscular. Segundo Gutiérrez e Lomonte (1995b), esta atividade pode também ser atribuída indiretamente à atividade de componentes hemorrágicos das peçonhas, como proteases, resultando em um processo de isquemia, em que o suprimento de sangue ao tecido muscular estaria comprometido em função de alterações vasculares, como ruptura do endotélio, necrose arterial ou trombose.

Estudos para avaliação da miotoxicidade podem ser realizados através da determinação dos níveis séricos ou plasmáticos de creatina quinase (CK). Esta enzima está concentrada no músculo cardíaco, no músculo esquelético e no cérebro. O aumento dos níveis de CK são observados no sangue, quando células contendo a enzima são lesadas, ou quando a permeabilidade da membrana dessas células está aumentada (NOAKES, 1987).

No presente trabalho, o efeito miotóxico da peçonha de *B. atrox* foi avaliado através da atividade de CK após a administração da referida peçonha no músculo gastrocnêmio de camundongos. Os resultados encontrados foram comparados aos dos animais do grupo controle administrados somente com PBS (Figura 29).

Após análise dos resultados, verificou-se que dose miotóxica mínima foi 0,10 mg/Kg/50µL PBS (1654 ± 180.6 , $p < 0,001$), pois esta foi a menor concentração de

peçonha capaz de promover uma elevação estatisticamente significativa nos níveis de CK, quando comparados aos animais do grupo controle PBS (129 ± 30.1).

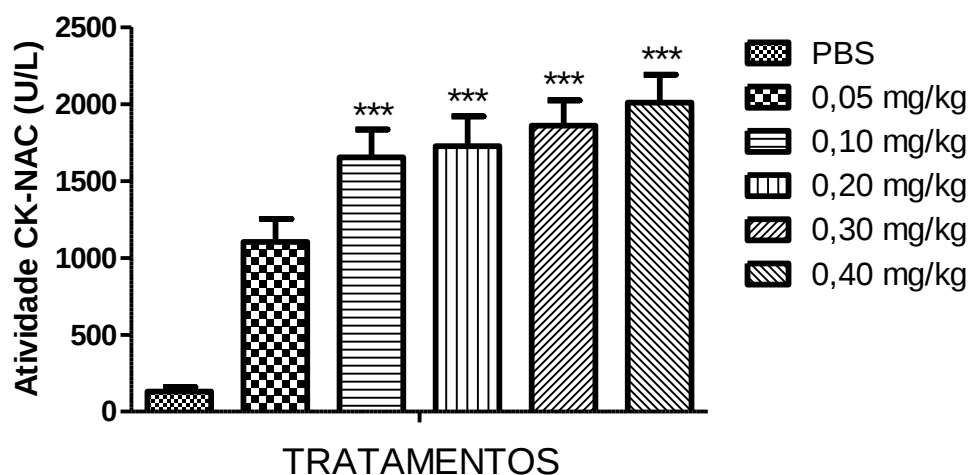


Figura 29 – Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Tratamentos: PBS= 50μL PBS; 0,05 mg/Kg/50 μL PBS; 0,10 mg/Kg/50 μL PBS; 0,20 mg/Kg/50μL; 0,30 mg/Kg/50μL; 0,40 mg/Kg/50μL PBS. N= 30. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão.

Para avaliação da habilidade do soro antibotrópico em neutralizar a atividade miotóxica, administrou-se 60 μL do referido soro, 30 minutos após a injeção de 2 DMM da peçonha de *Bothrops atrox* (0,20mg/Kg/ 50 μL PBS) no músculo gastrocnêmio de camundongos.

Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento efetuado com o grupo PBSB (922.7 ± 92.05 , $p < 0,01$) e o grupo PBA (1726 ± 193.9) havendo uma diminuição nos níveis de CK (Figura 30) após a administração do soro antibotrópico.

Porém, observou-se que a inibição promovida pelo soro antibotrópico não foi total, quando comparamos aos resultados apresentados pelos animais administrados somente com PBS. Tal fato pode ter ocorrido devido os componentes da peçonha não terem sido completamente neutralizados pelo soro antibotrópico, o qual é produzido a partir de um pool de peçonhas que não incluem a de *B. atrox*.

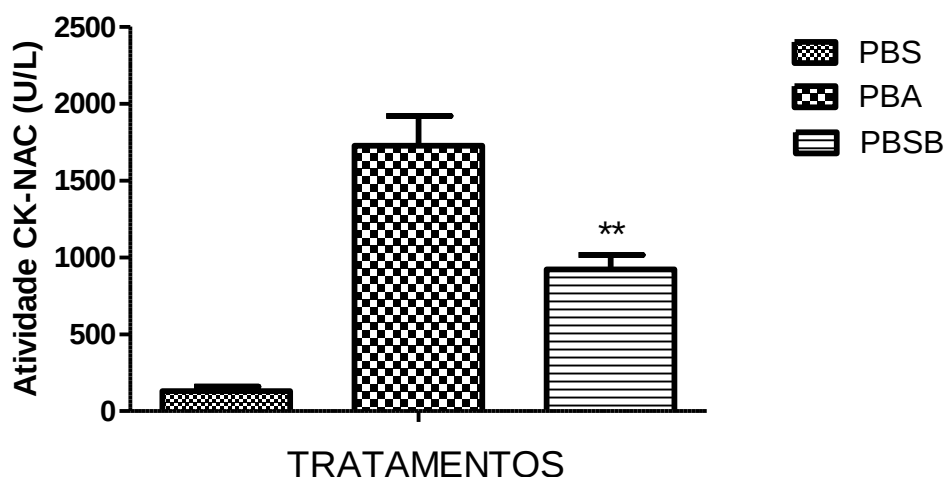


Figura 30 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 0,20 mg/Kg/50µL; PBSB= 0,20 mg/Kg/50µL + 60µl soro antibotrópico. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Em estudo realizado por Rojas *et al.* (2005) o anti-peçonha botrópico, obtido pela imunização de cavalos com uma mistura das peçonhas de *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti*, *Bothrops brazili* e *Bothrops hyoprora* e o anti-peçonha polivalente (*Crotalinae*), obtido por imunização de cavalos com uma mistura das peçonhas *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* e *Lachesis stenophrys*, ambos produzidos pelo Centro Nacional de Produção de Biológicos do Peru, neutralizaram a atividade miotóxica de *Bothrops brazili*, *Bothrops atrox* e *Bothrops barnetti*.

Em outro estudo realizado por Ponte e colaboradores (2010), foi avaliada a capacidade de um soro polivalente (PAV) produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, de proteger contra os danos tissulares locais, especialmente a miotoxidade, induzida pelas peçonhas de *B. rhinoceros*, *B. arietans* e *B. nasicornis*. Os resultados do estudo mostraram que a administração intravenosa de PAV 1h antes da injeção intramuscular da peçonha, proporcionou uma proteção significativa contra miotoxidade, especialmente no caso de *B. arietans*. Um efeito antimiotóxico também foi observado, embora reduzido, quando o PAV foi aplicado 1h após a injeção da peçonha.

A peçonha de *Bothrops alcatraz*, uma serpente do Arquipélago de Alcatraz, localizado na costa sudeste do Brasil, causou progressivo e irreversível bloqueio neuromuscular de preparações de músculos biventer-cervicis isolados de pintos. A

peçonha também inibiu a contração exógena de ACh (110 mM) and KCl (20 mM), causou danos em miofibrilas e aumentou a liberação de creatina quinase. O referido estudo demonstrou que o antipeçonha botrópico comercial produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, neutralizou a atividade neuromuscular induzida pela peçonha, dependendo da concentração utilizada, demonstrando que com a maior dose (100 µg/mL) a neutralização foi limitada (MORAES *et al.*, 2012).

4.5.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Envenenamentos por subespécies de *Crotalus durissus* são associados com severa neurotoxicidade e miotoxicidade, coagulopatia e insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003). Em contraste, envenenamentos por *Bothrops* sp são caracterizados por um padrão semelhante de alterações fisiopatológicas, como proeminente dano tissular local e efeitos sistêmicos (sangramento, coagulopatia, choque cardiovascular e insuficiência renal (OTERO *et al.*, 2002; FRANÇA e MÁLAQUE, 2003; GUTIÉRREZ, 2009c). Então, na América do Sul é possível diferenciar entre envenenamentos induzidos por *Bothrops* sp e *Crotalus* sp com base nas manifestações clínicas.

O efeito miotóxico das peçonhas de serpentes *Crotalus* é causado pela crotamina, que apresenta atividade sinérgica a da crotoxina. Ela é capaz de induzir a despolarização do potencial de membrana das células musculares. Esta ação provavelmente é exercida sobre os canais de sódio, pela indução do influxo deste cálcio (LOMONTE *et al.*, 2003; VITAL BRAZIL, 1971).

A miotoxicidade ocorre, pois são produzidas lesões nas fibras musculares estriadas esqueléticas (rabdomiólise) que geram a liberação de enzimas e mioglobina para o soro do paciente que são posteriormente excretadas na urina. Referências experimentais especificam a ação miotóxica da peçonha como decorrente das frações crotoxina e crotamina (MAGALHÃES, 2010).

Além de ter um efeito neurotóxico, a crotoxina é também miotóxica e afeta diretamente as células do músculo esquelético (GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1981). Evidências clínicas claramente indicam que o envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* é caracterizado por uma miotoxicidade sistêmica, demonstrada pela presença de mioglobinúria, mioglobinemia e por um drástico aumento no nível

sérico de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003). Os sinais clínicos evidentes da ação miotóxica são dores musculares generalizadas (mialgias), urina que apresenta uma cor avermelhada ou de tonalidade mais escura (mioglobinúria) - manifestação clínica mais evidente da necrose de musculatura esquelética (rabdomiólise). Desde que a crotoxina representa uma grande porcentagem desta peçonha, é provável que essa miotoxicidade se dê pela ação da crotoxina nas células musculares. A PLA₂ induz danos nos músculos de ratos, enquanto a crotapotina é destituída de efeito miotóxico (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986), mas ela potencializa a atividade miotóxica da PLA₂.

Gutiérrez & Ownby (2003), demonstraram que a PLAB₂B F6 de *Crotalus durissus collilineatus* é a responsável pela miotoxicidade sistêmica da peçonha, sendo altamente específica e não sequestrada por nenhum tipo de aceptores na corrente sanguínea ao unir-se com uma alta afinidade a receptores presentes no músculo esquelético de camundongo.

Soto (2005) realizou a determinação dos níveis de CK plasmáticos em camundongos inoculados por via intramuscular (miotoxicidade local) e intravenosa (miotoxicidade sistêmica) com a PLA₂ D49 FB6B de *Crotalus durissus collilineatus* e a Bt II-2 de *Bothrops alternatus* (atividade miotóxica). A sequência da PLA₂ F6 mostrou uma alta identidade sequencial (85–90%), com a crotoxina B, caracterizada previamente por Aird e Kaiser (1985) e Aird *et al.* (1989). A F6 apresentou a região C terminal rica em lisina, que – segundo Lomonte *et al.* (1994); Gutierrez e Lomonte (1995), Selistre de Araújo *et al.* (1996) – é responsável pelo processo de miotoxicidade.

No presente estudo, constatou-se que a concentração que elevou os níveis de CK foi a dose de 0,025 mg/Kg/50µL PBS (1414±135) sendo, assim, considerada como a dose miotóxica mínima da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* (Figura 31).

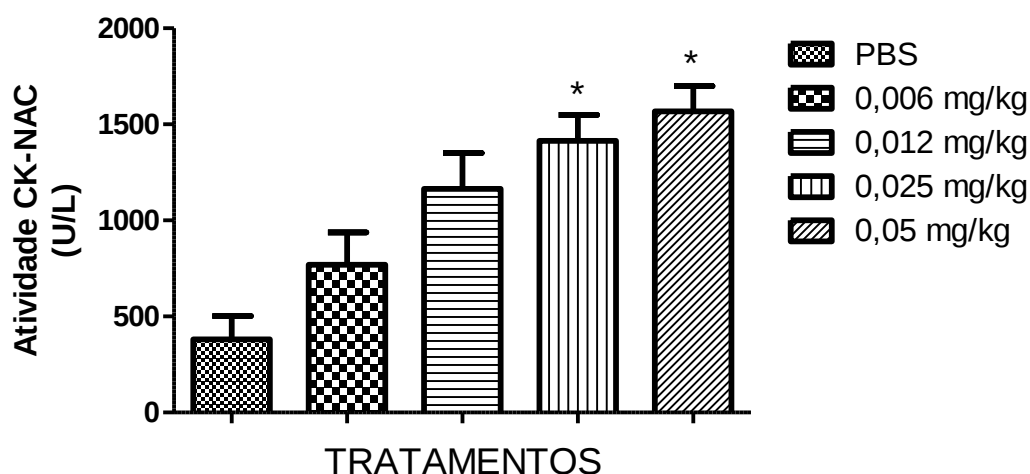


Figura 31 – Determinação da dose miotóxica mínima (DMM) induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

Tratamentos: PBS= 50µL PBS; 0,006 mg/Kg/50 µL PBS; 0,012 mg/Kg/50 µL PBS; 0,025 mg/Kg/50 µL PBS; 0,05 mg/Kg/50 µL PBS. N= 25. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Para avaliação da habilidade do soro anticrotálico administrou-se 60 µL do referido soro 30 minutos após a administração de 2 DMM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* (0,05 mg/Kg/50 µL PBS) para avaliação da atividade miotóxica.

Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento efetuado com os animais do grupo soro PCSC (472.3±56.9, $p<0,001$) e os animais do grupo PC (1743±149.9) havendo uma redução nos níveis de CK (Figura 32).

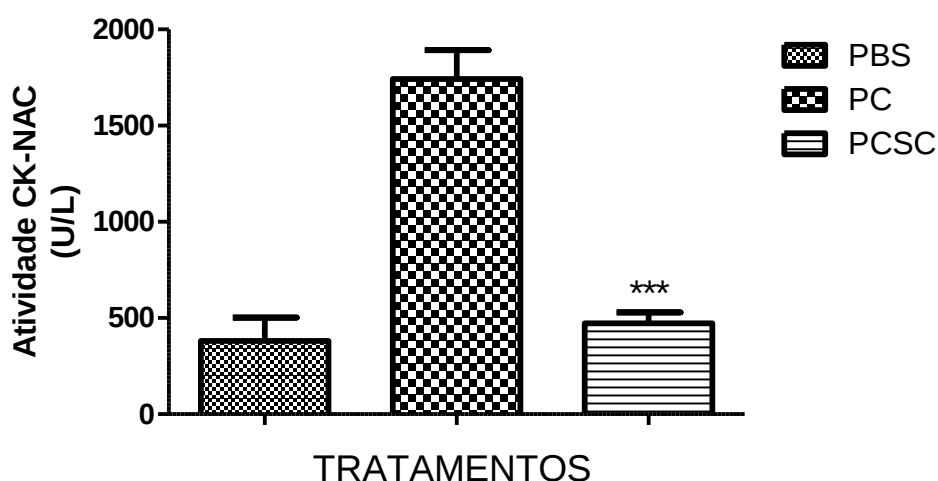


Figura 32 – Habilidade do soro anticrotálico na neutralização da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

Tratamentos: PBS= 50 µL PBS; PC= 0,05 mg/Kg/50µL PBS; PCSC= 0,05 mg/Kg/50µL PBS + 60 µL soro anticrotálico. N= 15. Cada valor representa a média ± erro padrão.

No presente estudo o soro anticrotálico utilizado foi capaz de neutralizar os efeitos biológicos da atividade miotóxica induzida pela peçonha de *C.d. ruruima*. Do mesmo modo, Franco (1997) avaliou a capacidade de neutralização dos soros antiofídicos comerciais e específicos na atividade miotóxica da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* obtendo como resultado que os soros específicos mostraram-se eficientes em neutralizar a miotoxidade e o bloqueio neuromuscular característico da peçonha e toxina estudada.

4.6 LETALIDADE

4.6.1 Determinação da DL_{50} induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Segundo Brasil (2010), os acidentes ofídicos ocorrem em todo o país, porém verifica-se variação significativa por região, com os coeficientes mais elevados no Norte e Centro-oeste. A distribuição por gênero de serpente peçonhenta, entre os casos notificados, indica predomínio do acidente botrópico (73,5%), seguido do crotálico (7,5%), laquético (3,0%), elapídico (0,7%) e por serpentes não peçonhentas (3,0%). A letalidade geral é baixa (0,4%). O tempo decorrido entre o acidente e o atendimento e o tipo de envenenamento podem elevar a letalidade em até oito vezes essa taxa, como no envenenamento crotálico, quando o atendimento é realizado mais de 6 a 12 horas após o acidente (4,7%).

Desta maneira, a peçonha produzida pelas serpentes do gênero *Crotalus*, por ser a mais letal dentre todas as outras existentes no Brasil, torna-se importante epidemiologicamente, e desta maneira fez-se necessário submeter a mesma aos ensaios de letalidade, e assim avaliar a eficácia do soro anticrotálico na neutralização desta.

O envenenamento crotálico caracteriza-se por uma discreta reação local, ocultando a real gravidade do mesmo, desencadeado por ações neurotóxicas e hemolíticas.

Tradicionalmente, o ensaio biológico de letalidade é muito usado para avaliar o efeito letal das peçonhas ofídicas em animais de experimentação, e é desencadeado por todo um conjunto de efeitos que juntos promovem o óbito. A

injeção da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* no camundongo mata o animal por parada respiratória, decorrente do bloqueio neuromuscular pré e pós-sináptico (VITAL BRASIL, 1966, 1971; CHANG & LEE, 1977; BON *et al.* 1979).

No presente estudo, para determinar a dose letal média (DL₅₀), foram administrados por via intraperitoneal, diferentes concentrações da peçonha de *C. d. ruruima* a grupos de 4 camundongos cada. O número de animais mortos e vivos foi registrado durante um período de 24 h, e a DL₅₀ foi calculada através do método de PROBITOS. Após análise dos resultados, observou-se que a DL₅₀ da peçonha de *C. d. ruruima* capturada no Estado do Amapá correspondeu à concentração de 0,05 mg/kg (Figura 33).

Dos Santos e colaboradores (2011) relataram em seu estudo que a DL₅₀ da peçonha de *C. d. ruruima* capturada em Boa Vista, Estado de Roraima, foi de $58 \pm 11 \mu\text{g}$, corroborando os resultados encontrados na presente pesquisa para a peçonha de *C. d. ruruima* capturada no município de Porto Grande, Estado do Amapá, que foi de 50 μg .

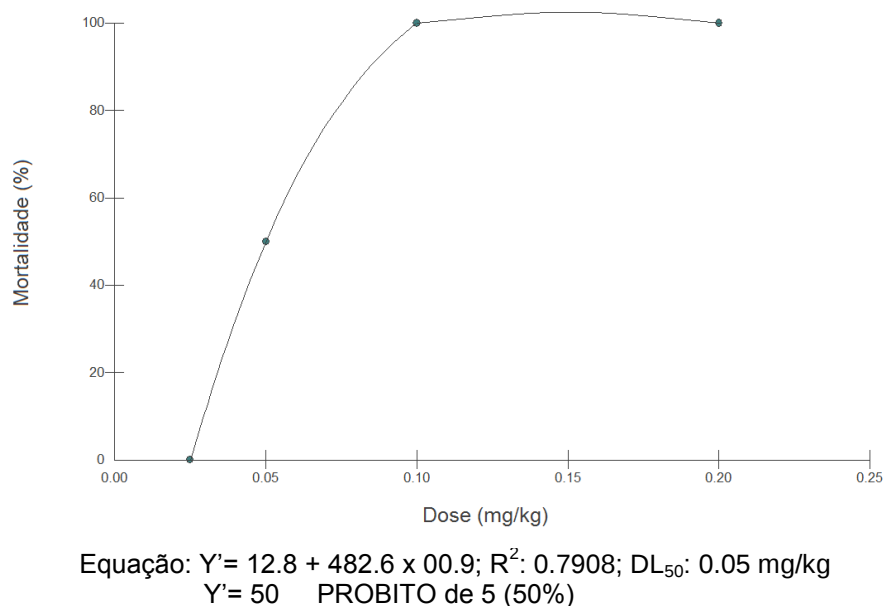


Figura 33 – DL₅₀ da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* administrada por via intraperitoneal em camundongos
 Tratamentos: 0,025 mg/Kg/50 μL PBS; 0,05 mg/Kg/50 μL PBS; 0,10 mg/Kg/50 μL PBS; 0,20 mg/Kg/50 μL PBS. N= 16. (Teste regressão linear simples).

Para avaliação da habilidade do soro anticrotálico em neutralizar a letalidade, administrou-se 2 DL₅₀ da peçonha de *C.d. ruruima* (0,10 mg/Kg/50 μL PBS) a grupos de 4 animais. 30 minutos depois, administrou-se os volumes de 60;

120; 240 ou 480 μL do referido soro por via intraperitoneal aos camundongos. A observação para verificar a ocorrência ou não de óbitos entre os animais foi realizada em um período de 24 horas.

Sendo assim, os resultados mostraram que o soro anticrotático, em todas as doses administradas, foi 100% eficaz na neutralização da atividade letal induzida pela peçonha de *C.d. ruruima* proveniente do Estado do Amapá (Figura 34).

Chipaux & Goyffon (1998) citaram que a forma mais utilizada para neutralizar a ação de peçonhas animais é a administração de antipeçonhas específicas para cada espécie. Além de ser a forma mais eficiente de tratar casos de envenenamento por animais, esse tratamento reduz drasticamente a letalidade e as sequelas resultantes do acidente.

Os resultados apresentados por Guidolin e colaboradores (2013) mostraram que o volume do soro anticrotático (mL) necessário para neutralizar 1 mg da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* foi 2,18 mL. No presente estudo, o volume de soro anticrotático necessário para neutralizar 1 mg da peçonha de *C.d. ruruima* foi de 600 μL (0,6 mL).

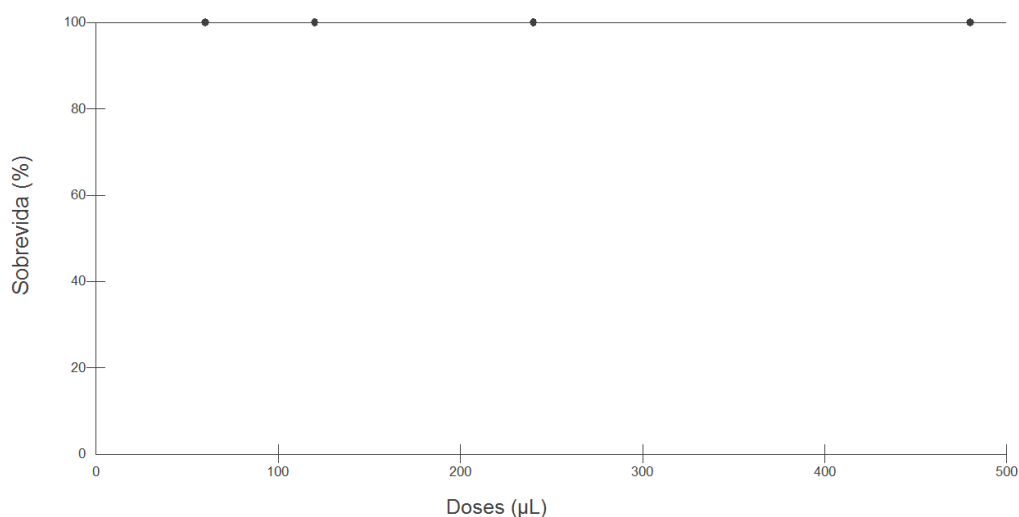


Figura 34 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da letalidade induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Tratamentos: PC= 0,10 mg/Kg/50 μL PBS; PCSC1= 0,10 mg/Kg/50 μL PBS + 60 μl soro anticrotático; PCSC2= 0,10 mg/Kg/50 μL PBS + 120 μl soro anticrotático; PCSC3= 0,10 mg/Kg/50 μL PBS + 240 μl soro anticrotático; PCSC4= 0,10 mg/Kg/50 μL PBS + 480 μl soro anticrotático. N=20. (Teste regressão linear simples).

4.7 ATIVIDADE COAGULANTE

4.7.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

As enzimas trombina-like presentes na peçonha de serpentes da família *Viperidae* pertencem a uma classe de serinoproteases que, *in vitro*, causam coagulação do sangue, porém, *in vivo*, tornam o sangue incoagulável, pois, esgota o fibrinogênio (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

A ação coagulante do envenenamento botrópico é decorrente da ação da peçonha que age sobre pontos específicos da cascata da coagulação, ativando o fator X, a protrombina e a agregação plaquetária. O fibrinogênio é convertido em fibrina de forma direta. Como consequência do consumo dos fatores da coagulação, ocorre o estado de incoagulabilidade sanguínea (FRANÇA & FAN, 1992; BARRAVIERA & PEREIRA, 1991, 1994; MOREIRA *et al.* 1994).

O estado de incoagulabilidade sanguínea associada com a atividade hemorrágica podem acarretar sangramento em qualquer região do organismo e afetar, com isso, órgãos essenciais e promover insuficiência renal e choque, sendo essas as complicações sistêmicas mais frequentes, que podem levar à morte (FRANÇA & FAN, 1992). A insuficiência renal é uma complicação do acidente botrópico que ocorre em 0,5 a 13,8% dos pacientes, dependendo da espécie agressora (FRANÇA & MÁLAQUE, 2003).

A trombocitina, serinoprotease isolada da peçonha de *Bothrops atrox* é um forte ativador do fator V, que também ativa fatores VIII e XIII, cliva protrombina sem ativação, mostra uma fraca atividade sobre o fibrinogênio e induz agregação plaquetária e outras reações (STOCKER, 1994).

Outra seriprotease isolada da peçonha de *B. atrox* foi a Batroxobina, que cliva o fibrinogênio semelhante à trombina e apresenta aplicação prática como droga hemostática (Reptilase) ou desfibrinogenante (Defibrase) (MATSUI *et al.*, 2000). A batroxase, uma metaloprotease isolada da peçonha de *B. atrox*, foi eficaz na dissolução de coágulos de fibrina com atividade fibrin(ogen)olítica e trombolítica (CINTRA *et al.*, 2012).

No presente estudo foi avaliado o tempo de coagulação de diferentes concentrações da peçonha de *B. atrox* (1,5; 2,5; 5,0; 6,5; 10,0; 12,5 µg/ 50µL PBS)

quando em contato com o plasma humano. Após análise dos resultados, verificou-se que a concentração de 1,5 µg/25 µL PBS (Figura 35) promoveu a coagulação do plasma humano em 60 segundos (54.3 ± 2.0), sendo, portanto, considerada como a dose coagulante mínima da peçonha de *Bothrops atrox*.

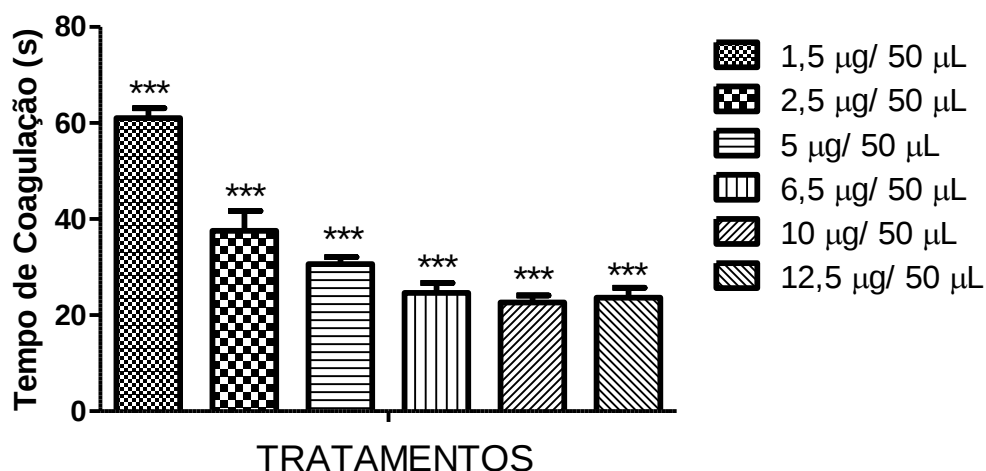


Figura 35 – Dose coagulante mínima (DCM) da peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

Tratamentos: 1,5µg/50µL PBS; 2,5µg/50µL PBS; 5,0µg/50µL PBS; 6,5µg/50µL PBS; 10,0µg/50µL PBS; 12,5µg/50µL PBS. (Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão

Para avaliar a habilidade de neutralização do soro antiofídico sobre a atividade coagulante, utilizou-se a dose de 3,0µg/50µL PBS que representa 2DCM. Os resultados obtidos mostraram que o soro antiofídico neutralizou totalmente a atividade coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* quando comparado ao controle PBA (30.6 ± 0.33), pois as amostras PBSB não apresentaram coagulação do plasma mesmo 1h após incubação (Figura 36).

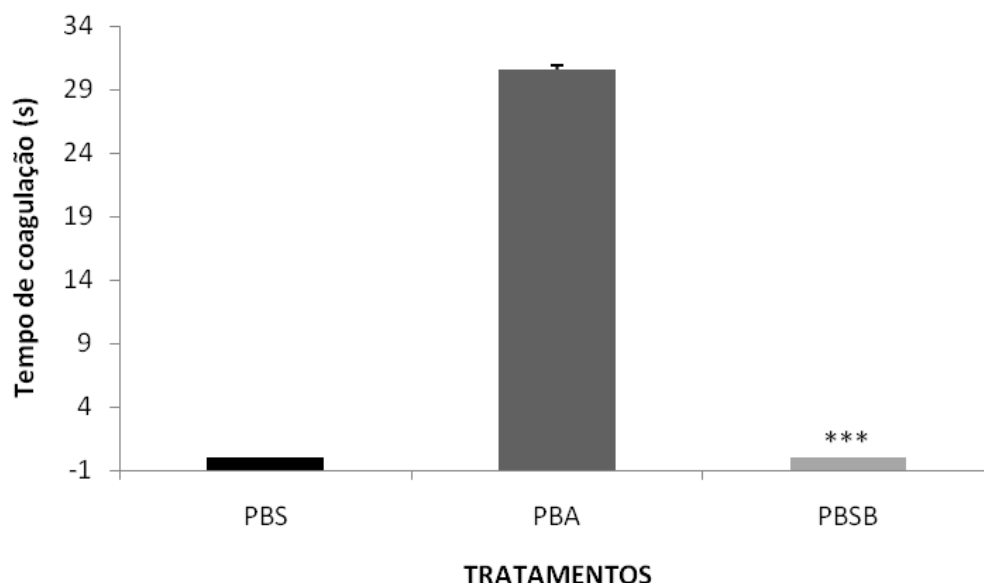


Figura 36 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.
Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PBA= 3,0µg/50µL PBS; PBSB= 3,0µg/50µL + 25µl soro antibotrópico. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Colombini e colaboradores (2001) demonstraram que os soros antiofídicos produzidos a partir das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Lachesis muta muta* neutralizaram a atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. atrox*, sendo o soro antibotrópico o mais eficiente, corroborando com os resultados da presente pesquisa onde o soro antibotrópico foi eficaz na neutralização da referida atividade.

Segura *et al.* (2010) verificou que os anti-peçonhas botrópico, brotrópico bivalente, botrópico/crotálico, botrópico polivalente e anti-peçonha polivalente foram eficazes na neutralização das peçonhas *B. asper*, *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. neuwied* em relação a atividade coagulante.

4.7.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

No envenenamento crotálico alterações da coagulação podem causar incoagulabilidade sanguínea ou aumento do tempo de coagulação, porém são raros os sangramentos e geralmente restritos as gengivas (gengivorragia) (AMARAL *et al.*, 1986).

Estudos feitos com a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* evidenciaram alterações locais irrelevantes, sendo a peçonha caracterizada mais por seus potentes efeitos neurotóxicos e atividades de mioxicidade sistêmica do que por

alterações renais e transtornos da coagulação sanguínea (GUTIÉRREZ & OWNBY, 2003; FAN, *et al.*, 1995).

A peçonha de *C. d. terrificus* contém tromboproteases do tipo Ancrod e Batroxobina, as quais são responsáveis pelas alterações de coagulação que incidem de 25% (BARRAVIERA, 1990) a 31% (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989) no acidente crotálico.

No presente estudo foi avaliado o tempo de coagulação de diferentes concentrações da peçonha de *C. d. ruruima* (2,5; 5,0; 6,5; 10,0; 12,5 µg/ 50µL PBS) quando em contato com o plasma humano. Os resultados mostraram que a concentração de 2,5 µg/25 µL PBS (Figura 37) promoveu a coagulação do plasma humano em 60 segundos (117 ± 1.7), sendo, portanto, considerada como a dose coagulante mínima.

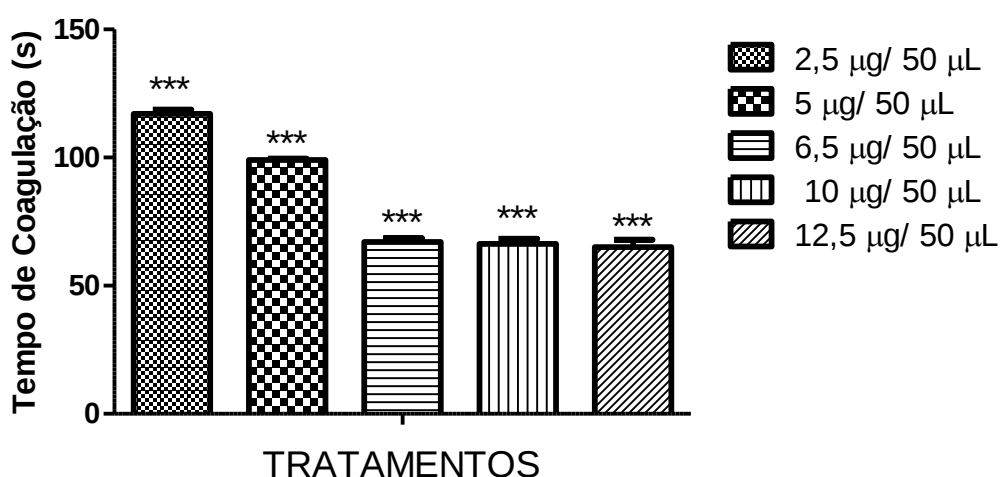


Figura 37 – Dose coagulante mínima (DCM) da peçonha da serpente *Crotalus durissus ruruima*. Tratamentos: 2,5µg/50µL PBS; 5,0µg/50µL PBS; 6,5µg/50µL PBS; 10,0µg/50µL PBS; 12,5µg/50µL PBS. (Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey-Kramer). Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão

Para avaliar a habilidade de neutralização do soro anticrotálico sobre a atividade coagulante, utilizou-se a dose de 5,0µg/50µL PBS que representa 2DCM. Os resultados obtidos demonstraram que o soro anticrotálico foi capaz de inibir totalmente a atividade coagulante induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima* quando comparado ao controle PC (49 ± 1.0), pois as amostras PCSC não apresentaram coagulação do plasma mesmo 1h após incubação (Figura 38).

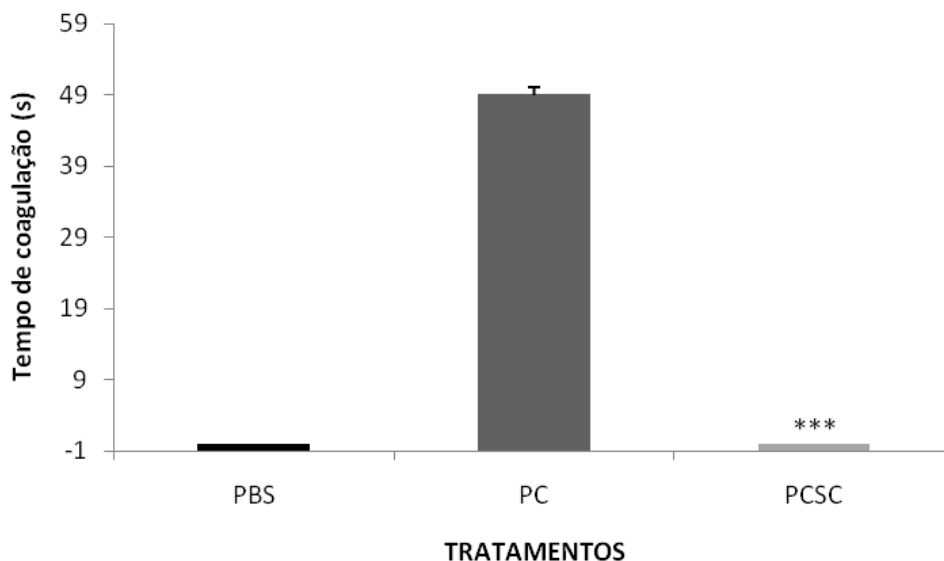


Figura 38 – Habilidade do soro anticrotálico na neutralização da atividade coagulante induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.
Tratamentos: PBS= 50 µl PBS; PC= 5,0µg/50µL PBS; PCSC= 5,0µg/50µL + 25µl soro anticrotálico. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados por Dos-Santos *et al.* (2011), os quais demonstraram a neutralização de anti-peçonhas preparados com a mistura das peçonhas de *B. asper*, *C. simus* e *C. durissus ruruima* na atividade coagulante induzida pela peçonha de *B. asper* (467±49).

Estudos prévios mostraram elevado grau de neutralização entre toxinas hemorrágica e coagulante de peçonhas crotálicas, evidenciando a capacidade de neutralizar os efeitos de peçonhas heterólogas (RUCAVADO *et al.*, 1995).

4.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA POR FOSFOLIPASES A₂

4.8.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

Dentre as proteínas com atividades enzimáticas encontradas nas peçonhas de serpentes, as fosfolipases A₂ são particularmente abundantes nas peçonhas do gênero *Bothrops*. Estas enzimas têm sido muito estudadas devido suas propriedades químicas e atividades biológicas, tais como, neurotóxica, miotóxica, hemolítica, anticoagulante e edematogênica (VALENTIN & LAMBEAU, 2000a).

Nos envenenamentos ofídicos, que envolvem a fosfolipase A₂ com atividade hemolítica, a hidrólise da ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, liberando ácidos

graxos e lisofosfolípídeos. Os fosfolípídeos são compostos tenso-ativos que, mesmo em doses pequenas alteram a permeabilidade das membranas celulares, produuzindo hemólise indireta (KANASHIRO, 2002).

Dentre os ácidos graxos liberados está o ácido araquidônico, que funciona como um segundo mensageiro e como o precursor de eicosanóides, que são potentes mediadores da inflamação (TEIXEIRA, 2009; NUNES *et al.*, 2011).

No presente estudo, a atividade fosfolipásica A_2 foi avaliada *in vitro* e se baseou no método de hemólise radial indireta, utilizando-se como substrato uma suspensão de gema de ovo incorporada em gel de agarose. Diferentes concentrações da peçonha de *B. atrox* (8; 10; 15; 20; 25; 30 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS) foram avaliadas quanto a capacidade de produzir um halo translúcido no referido meio. Após análise dos resultados, foi selecionada a concentração de 10 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS (13 $\pm$ 0.33, $p<0,001$) como a dose hemolítica indireta mínima (Figuras 39 e 40).

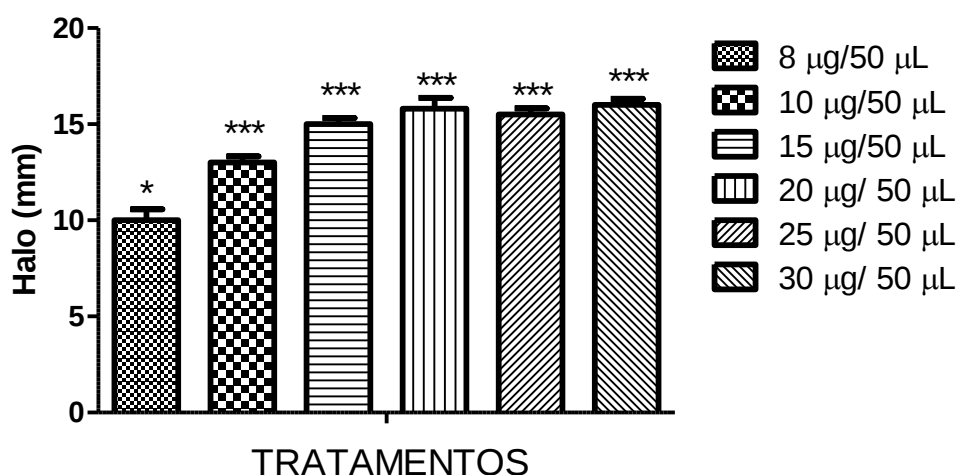


Figura 39 – Dose hemolítica indireta mínima (DHeM) induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*. Tratamentos: 8 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS; 10 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS; 15 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS; 20 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS; 25 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS; 30 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ PBS. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão.

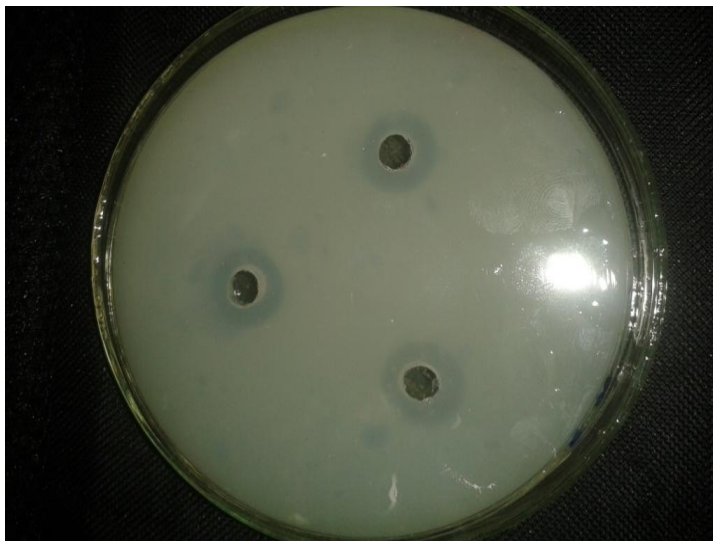


Figura 40 – Placa de petri contendo meio com suspensão de gema de ovo incorporada em gel de agarose, onde se visualiza halo translúcido de 10 mm produzido pela peçonha *Bothrops atrox* (10µg/50µL PBS).

Fonte: DE OLIVEIRA, NKS

Muniz *et al.* (2000) avaliaram a atividade PLA_2 (método hemolítico indireto) do soro antiofídico comercialmente produzido pela Divisão de Imunobiológicos da FUNED, a partir da imunização de cavalos com um antígeno contendo as peçonhas de *B. alternatus* (12.5%), *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12.5%), *B. neuwiedii* (12.5%) e *B. moojeni* (12.5%). Os referidos autores constataram que a quantidade de peçonha (mg) por 1 ml antipeçonha necessário para reduzir 50% da atividade PLA_2 da peçonha bruta de *Bothrops atrox* foi de 3,2 mg/mL.

Considerando que a DHeM da peçonha de *B. atrox* capturada no Estado do Amapá foi de 10µg/ 50µL PBS, constatou-se que a dose de antiveneno necessária para reduzir em 50% a atividade PLA_2 seria de 60 µL, baseado nos estudos de Muniz *et al.* (2000).

Para avaliação da habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A_2 , misturou-se 2 DHeM da peçonha de *Bothrops atrox* (20µg/ 50 µL PBS) com diferentes volumes de soro antibotrópico (25; 40; 60 ou 80µL) e imediatamente após, a amostra foi aplicada no meio em placa de petri.

Os resultados mostraram que as doses de 60 e 80 µL promoveram uma inibição total (100%) da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *Bothrops*

atrox (0 ± 0.0). Sendo assim, a dose de 60 μ L apresentou uma efetividade maior sobre a referida peçonha, quando comparado aos resultados encontrados por Muniz *et al.* (2000) (Figura 41).

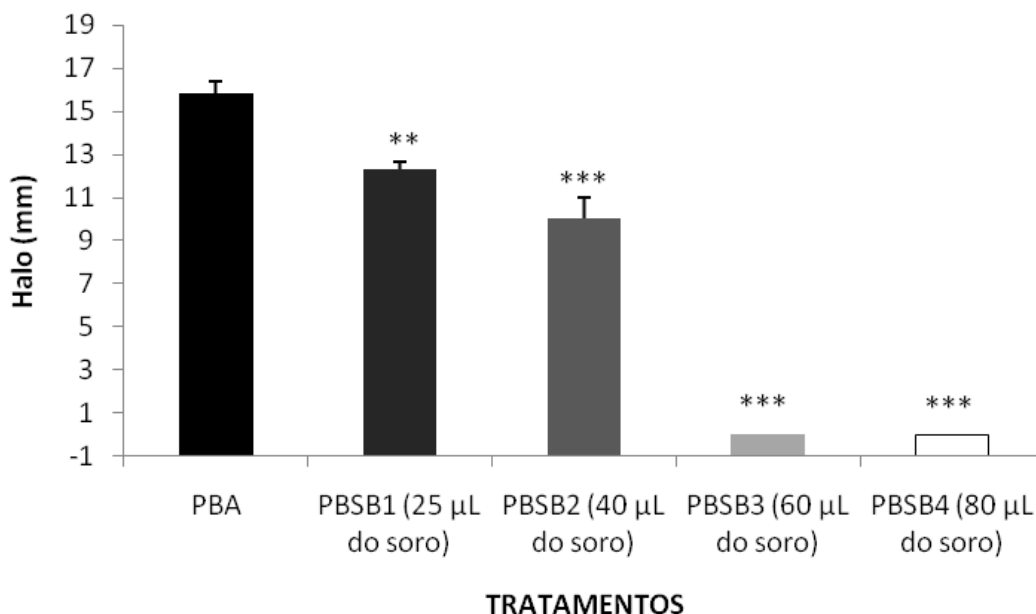


Figura 41 – Habilidade do soro antiofídico na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipase A_2 induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Tratamentos: PBA= 20 μ g/25 μ L PBS; PBSB1= 20 μ g (PBA)/25 μ L PBS + 25 μ L soro antiofídico; PBSB2= 20 μ g (PBA)/25 μ L PBS + 40 μ L soro antiofídico; PBSB3= 20 μ g (PBA)/25 μ L PBS + 60 μ L soro antiofídico; PBSB4= 20 μ g (PBA)/25 μ L PBS + 80 μ L soro antiofídico. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão.

Em estudo semelhante um anti-peçonha preparado do plasma de cavalos imunizados com uma mistura das peçonhas de *Crotalus simus*, *Lachesis stenophrys* e *Bothrops atrox* foi eficaz na neutralização da atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de serpentes da família Viperidae: *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas* e *Cerrophidion sasai* (GUTIÉRREZ, 2013).

Noronha (2008) ratifica os resultados deste estudo, ao descrever a eficácia neutralizante do anti-peçonha líquido para uso veterinário, sobre a atividade fosfolipásica A_2 da peçonha de *Bothrops atrox*.

4.8.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

A atividade fosfolipásica é amplamente encontrada nas peçonhas crotálicas (VALENTIM & LAMBEAU, 2000b). Algumas das funções biológicas das fosfolipases são mediadas por receptores que têm sido encontrados em várias espécies, esses

receptores são classificados em tipo neuronal, que são altamente expressos no tecido cerebral e tipo muscular, identificado pela primeira vez em músculo esquelético de coelhos (DUNN & BROADY, 2001).

Segundo Diz Filho (2009) a crotoxina é o componente mais tóxico das peçonhas de cascavéis sul-americanas da espécie *Crotalus durissus*, e é composta por duas diferentes subunidades, a crotapotina (componente ácido) e uma fosfolipase A₂ (componente básico). As fosfolipases A₂ são as enzimas mais estudadas destas peçonhas, sendo a maior responsável por sua toxicidade. Dentre seus principais efeitos, estão neurotoxicidade, miotoxidade, citotoxicidade, agregação plaquetária, anticoagulante e bactericida.

No presente estudo, diferentes concentrações da peçonha de *C. d. ruruima* (10; 15; 20; 25; 30 µg/ 50µL PBS) foram avaliadas quanto à capacidade de produzir um halo translúcido no meio contendo gema de ovo e agarose. Após análise dos resultados, foi selecionada a concentração de 20µg/ 50µL PBS (10.14±0.29, p<0,001) como a dose hemolítica indireta mínima (Figura 42).

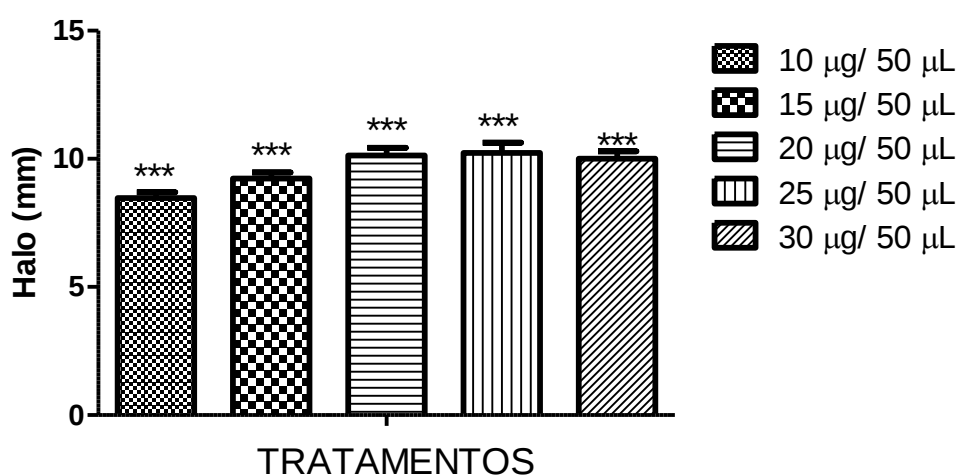


Figura 42 – Determinação da dose hemolítica indireta por fosfolipase A₂ mínima (DHeM) induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.
Tratamentos: 10µg/50µL PBS; 15µg/50µL PBS; 20µg/50µL PBS; 25µg/50µL PBS; 30µg/50µL PBS. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Para avaliação da habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipases A₂, misturou-se 2 DHeM da peçonha de *Crotalus durissus ruruima* (40µg/50 µL PBS) com diferentes volumes de soro anticrotálico (5; 10; 15 ou 25µL) e imediatamente após, a amostra foi aplicada no meio em placa de petri.

Os resultados mostraram que as doses de 15 e 25 μL promoveram uma inibição total (100%) da atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima* (0 ± 0.00). Sendo assim, a dose de 15 μL foi a menor dose efetiva que neutralizou em 100% a referida peçonha, quando comparado aos resultados encontrados por Muniz *et al.* (2000) (Figura 43).

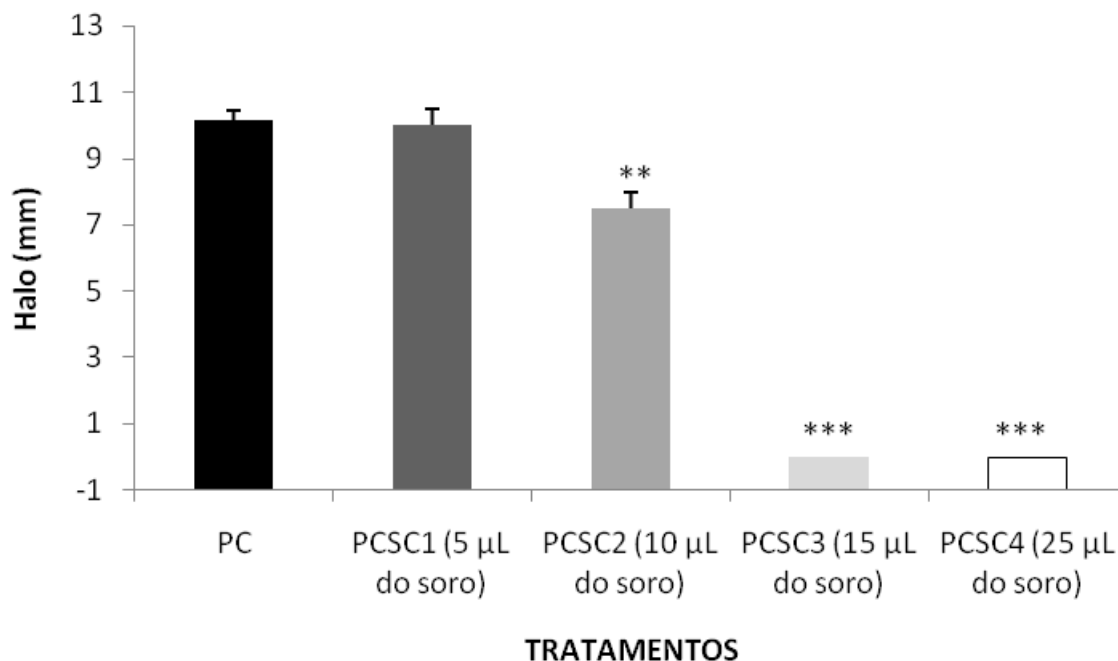


Figura 43 – Habilidade do soro anticrotático na neutralização da atividade hemolítica indireta por fosfolipase A_2 induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

Tratamentos: PC= 40 μg /25 μL PBS; PCSC1= 40 μg (PC)/25 μL PBS + 5 μL soro anticrotático; PCSC2= 40 μg (PC)/25 μL PBS + 10 μL soro anticrotático; PCSC3= 40 μg (PC)/25 μL PBS + 15 μL soro anticrotático; PCSC4= 40 μg (PC)/25 μL PBS + 25 μL soro anticrotático. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão.

Noronha (2008) descreveu a eficácia neutralizante do anti-peçonha líquido para uso veterinário, sobre a atividade fosfolipásica A_2 da peçonha de *C.d. ruruima*.

Dos Santos *et al.* (1993b) avaliaram a atividade PLA₂ (método hemolítico indireto) do soro anticrotático e antibotrópico/anticrotático produzidos pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Os referidos autores constataram que 10 mL de soro anticrotático neutralizou 122,8 mg da peçonha de *C.d. ruruima* (variação amarelo). Em relação ao soro antibotrópico/anticrotático, 10 mL neutralizou 106,1 mg da mesma peçonha.

Ao transformar estes valores para microgramas, verificou-se que 10.000 μL do soro anticrotático neutralizaram 122.800 μL da peçonha amarela de *C.d. ruruima*, ou seja, para neutralizar 40 μg da peçonha, a dose efetiva seria de 3,2 μL de soro.

Porém, os resultados do presente estudo mostraram que foram necessários 15 µL de soro anticrotálico para a neutralização, portanto, provavelmente a peçonha amarela da *C.d. ruruima* capturada no Estado do Amapá, possui uma maior atividade PLA₂ quando comparada a peçonha amarela de *C.d. ruruima* utilizada nos estudos de Dos Santos *et al.* (1993b).

4.9 ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA

4.9.1 Peçonha de *Bothrops atrox*

As hialuronidases são enzimas que naturalmente degradam o ácido hialurônico, o maior componente da matriz extracelular dos vertebrados, é um mucopolissacarídeo que liga-se a glicosaminoglicanas e forma a substância fundamental do tecido conjuntivo, sendo mais abundante na pele, líquido sinovial, humor vítreo e cordão umbilical. A hialuronidase está presente nas peçonhas de serpentes e de outros animais, sua ação consiste em facilitar a dispersão das toxinas da peçonha entre os tecidos da presa, pois a mesma degrada o ácido hialurônico e consequentemente distorce a integridade da matriz extracelular (CASTANHEIRA *et al.* 2000). A hialuronidase é uma enzima presente nas peçonhas de serpentes (GIRISH *et al.*, 2004) e sua atividade específica é bastante variável entre as diferentes espécies, inclusive entre aquelas pertencentes ao mesmo gênero (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2007).

A extensa degradação de hialuronidase da matriz extracelular no local da picada contribui para a destruição tecidual local severa, algumas vezes de forma permanente. Além disso, a entrada de hialuronidase de peçonha na corrente sanguínea degrada o hialuronan circulante, podendo causar colapso sistêmico da vítima (HARRISON, 2007).

O isolamento e consequente caracterização biológica dessas enzimas em peçonhas de serpentes, incluindo o gênero *Bothrops*, são dificultados em detrimento da instabilidade enzimática e da fácil degradação, apesar de hialuronidases das peçonhas de *Naja naja* e *Agkistrodon contortrix contortrix* já terem sido purificadas (STERN & JEDRZEJAS, 2006; WAGSTAFF *et al.*, 2009).

No presente estudo foi avaliada a dose de peçonha capaz de reduzir em 50% a turbidez da solução de ensaio, expressa como a porcentagem de ácido hialurônico restante, comparando-se os resultados obtidos com a absorbância do tubo no qual não foi adicionado peçonha, considerado como 100% turvo. Para tanto, foram utilizadas diferentes concentrações da peçonha de *B. atrox* (4; 8; 12; 24; 36; 48; 60 μg). Após análise dos resultados, verificou-se que a DHdM foi 36 μg , promoveu redução de 52% quando comparado ao tubo turvo (atividade hialuronidásica de 24 URT/mg) (Figura 44).

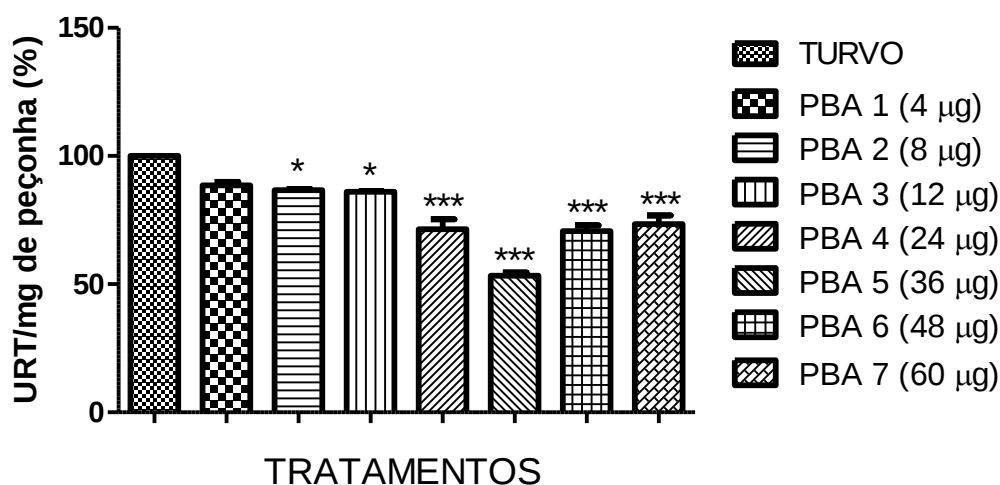


Figura 44 – Dose hialuronidásica mínima (DHdM) da peçonha da serpente *Bothrops atrox*.

Tratamentos: Turvo= 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA; PBA 1= 4 μg PBA + 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA; PBA 2= 8 μg PBA + 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA; PBA 3= 12 μg PBA + 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA; PBA 4= 24 μg PBA + 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA; PBA 5= 36 μg PBA + 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA; PBA 6= 48 μg PBA + 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA; PBA 7= 60 μg PBA + 80 μl de tampão acetato + 20 μl ácido hialurônico + 200 μL de BCTA. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão. *** $p < 0,001$

Estudos realizados por Queiroz *et al.* (2008) mostraram que na maioria das peçonhas de *Bothrops spp.* analisadas, a atividade hialuronidásica variou entre 48 e 190 URT/mg. As peçonhas de *B. jararaca* e *B. insularis* foram mais ativas, com atividades acima de 140 URT/mg. Em contraste, a atividade hialuronidásica baixa foi detectada nas peçonhas de *B. moojeni*, *B. brazili* e *B. pirajai* com atividades abaixo de 60 URT/mg. Resultados similares não foram obtidos por Lira *et al.* (2007), uma vez que estes autores não detectaram atividade hialuronidásica nas peçonhas de *B. jararaca* e *B. insularis*. Queiroz *et al.* (2008), relataram que tais diferenças podem ser devido a métodos diferentes usados para mensuração da atividade ou variação

intraespecífica na composição das peçonhas.

Após a determinação da DHdM, foram realizados outros ensaios *in vitro* para avaliar a habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hialuronidásica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox* (36µg).

Os resultados mostraram que o soro antibotrópico não foi eficaz na neutralização da atividade hialuronidásica induzida pela peçonha de *B. atrox* (Figura 45), pois não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo PBSB e o grupo PBA.

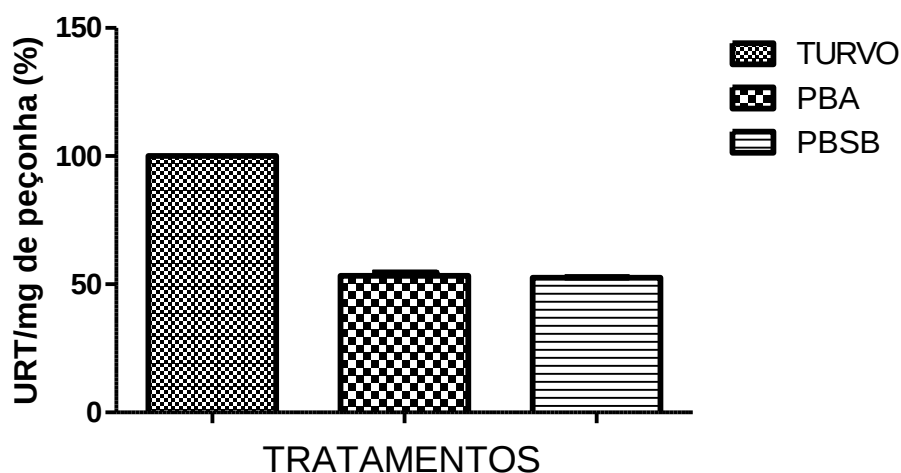


Figura 45 – Habilidade do soro antibotrópico na neutralização da atividade hialuronidásica induzida pela peçonha de *Bothrops atrox*.

Tratamentos: Turvo= 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PBA= 36µg PBA + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PBSB= 36µg PB + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA + 2.8µl soro antibotrópico. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Pereira (2006) analisou as peçonhas coletadas de filhotes de serpentes adultas *Bothrops insularis* capturadas na Ilha da Queimada Grande (machos e intersexos) e mantidas em cativeiro. Foram selecionadas para análise, as peçonhas correspondentes as idades de 4, 10, 15, 20, 24, 33 e 41 meses. Os resultados mostraram uma maior atividade hialuronidásica nas peçonhas de *Bothrops insularis* jovens (10 meses de idade) concluindo que as hialuronidases, não têm expressão pronunciada na fase adulta dos animais (41 meses).

4.9.2 Peçonha de *Crotalus durissus ruruima*

Hialuronidases não são enzimas tóxicas, mas potencializam indiretamente a toxicidade das peçonhas ao atuarem como "fator de espalhamento", contribuindo para o envenenamento local ou sistêmico por facilitar a difusão das toxinas nos tecidos e na circulação das presas/vítimas (GIRISH *et al.*, 2004).

A neutralização efetiva da atividade hialuronidásica de peçonhas deve ter prioridade clínica após acidentes ofídicos, visto que há relatos de que a inibição da hialuronidase diminui o dano tecidual, a difusão e os efeitos letais de peçonhas ofídicas (GIRISH & KEMPARAJU, 2006).

Pelo fato de a produção de anti-peçonhas ser baixa e a picada de serpentes ser uma ameaça presente em muitas comunidades, tanto de nações desenvolvidas como subdesenvolvidas, espera-se que estudos bioquímicos, farmacológicos e moleculares da hialuronidase presente na peçonha de serpentes do gênero *Crotalus* colaborem para a otimização de terapias para o envenenamento ofídico (CHEN *et al.*, 2002).

A hialuronidase CdtHya1, presente na peçonha de cascavel *Crotalus durissus terrificus*, é uma hialuronidase crotálica que apresenta alta atividade antiedematogênica, possuindo um elevado potencial de aplicação biotecnológica podendo ser utilizada terapeuticamente na redução de edema. Também apresentou aumento na difusão e potencialização da ação de toxinas, assim, o uso de inibidores de CdtHya1 poderiam ser utilizados para reduzir os danos teciduais locais, a difusão de toxinas e os efeitos letais das peçonhas (BORDON, 2012).

No presente estudo foi avaliada a dose de peçonha capaz de reduzir em 50% a turbidez da solução de ensaio, expressa como a porcentagem de ácido hialurônico restante, comparando-se os resultados obtidos com a absorbância do tubo no qual não foi adicionado peçonha, considerado como 100% turvo. Para tanto, foram utilizadas diferentes concentrações da peçonha de *C. d. ruruima* (4; 8; 12; 24; 36; 48; 60 µg) (Figura 46). Após análise dos resultados, verificou-se que a DHdM foi 36 µg, promoveu redução de 59% quando comparado ao tubo turvo (atividade hialuronidásica de 27 URT/mg) (Figura 47).

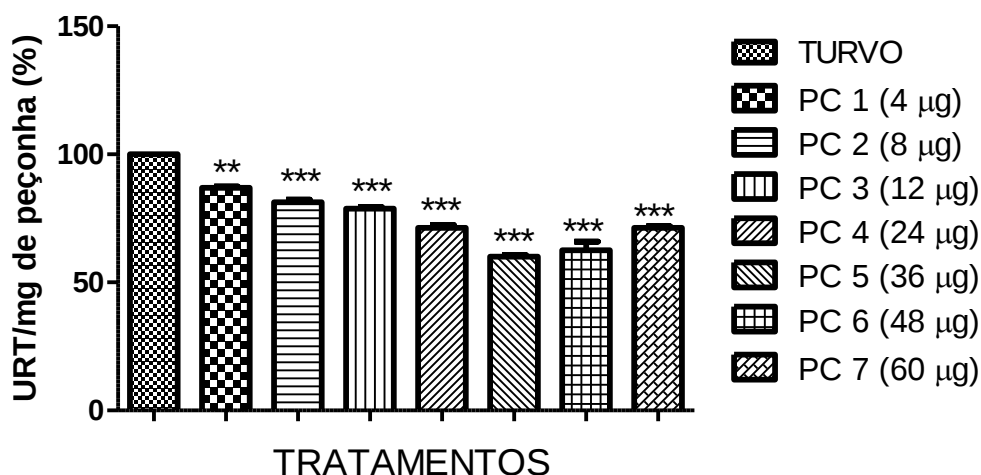


Figura 46 – Dose hialuronidásica mínima (DHdM) da peçonha da serpente *Crotalus durissus ruruima*.

Turvo= 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC 1= 4µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC 2= 8µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC 3= 12µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC 4= 24µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC 5= 36µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC 6= 48µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC 7= 60µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA. Cada valor representa a média ± erro padrão.*** p<0,001

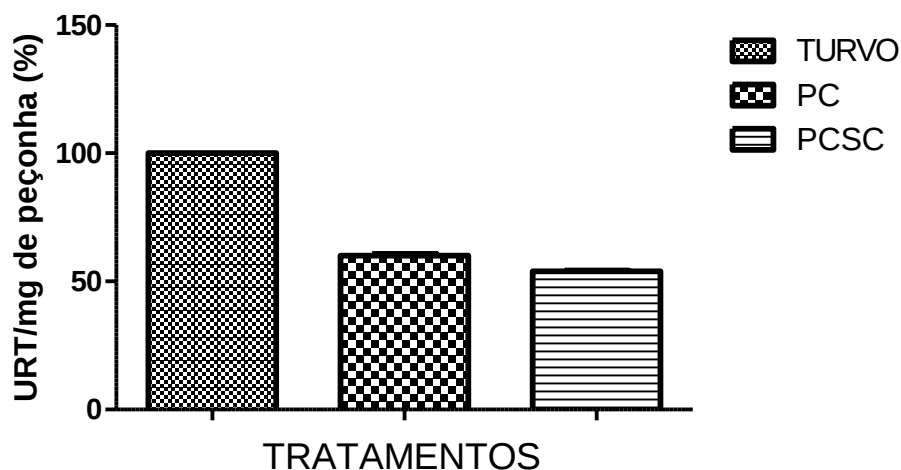


Figura 47 – Habilidade do soro anticrotático sobre a atividade hialuronidásica induzida pela peçonha de *Crotalus durissus ruruima*.

Tratamentos: Turvo= 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PC= 36µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA; PCSC= 36µg PC + 80µl de tampão acetato + 20µl ácido hialurônico + 200 µL de BCTA + 2.8µl soro anticrotático. Cada valor representa a média ± erro padrão.

Segundo Bordon (2012) a peçonha de *C.d. ruruima* apresenta peculiaridades nas atividades farmacológicas e, aparentemente, não é bem neutralizada pelos soros anticrotáticos comerciais. Corroborando os resultados encontrados no

presente estudo onde o soro anticrotálico não foi eficaz na neutralização da atividade hialuronidásica induzida por esta peçonha. Tal fato pode ter ocorrido porque a composição da peçonha pode variar de acordo com a localização, presa e idade da serpente devido a aspectos evolutivos (JIA *et al.*, 2008).

Em estudos experimentais, a neutralização da hialuronidase por anticorpos monoclonais inibiu o dano tecidual, a difusão e os efeitos letais de peçonhas ofídicas (GIRISH & KEMPARAJU, 2006). A inibição da hialuronidase aumentaria a eficiência da terapia antiofídica por retardar a difusão das toxinas e atenuar os efeitos adversos desta terapia, visto que uma menor dose seria capaz de neutralizar a peçonha (GIRISH; KEMPARAJU, 2011).

Uma vez que os soros são produzidos usando diferentes misturas imunizantes de peçonha, um soro efetivo contra uma peçonha numa região particular pode não ser efetivo contra uma peçonha diferente em outro país ou região (THEAKSTON & PUGH, 1987).

4.10 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DAS PEÇONHAS

A eletroforese é uma técnica laboratorial que possibilita a separação ou fracionamento de materiais de origem orgânica tal como proteínas, enzimas, DNA e RNA, com cargas elétricas definidas por pHs específicos através de sua migração através dos poros de um gel, em resposta a um campo elétrico (RIBEIRO JÚNIOR, 2008).

Na Figura 48 é mostrado o perfil eletroforético das proteínas presentes nas peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* capturadas no Estado do Amapá, comparando-as aos padrões de peso molecular, em PAGE-SDS a 17,5%.

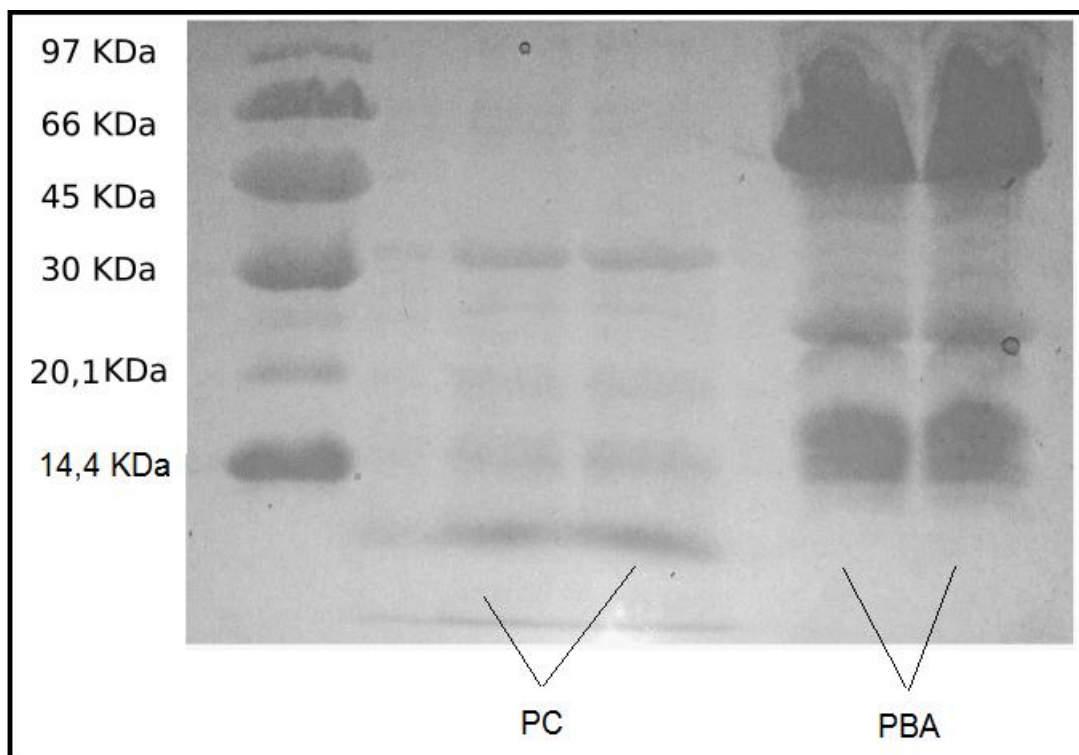


Figura 48 – Perfis eletroforéticos das peçonhas totais de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* em PAGE-SDS 17,5% com voltagem constante de 90 V
PBA= Peçonha *Bothrops atrox* (10 μ g); PC= Peçonha *Crotalus durissus ruruima* (10 μ g)

No presente estudo, verificou-se que as proteínas presentes na peçonha de *B. atrox*, apresentaram peso molecular de aproximadamente 14, 23 e 50 kDa.

Patiño et al. (2010) isolaram uma metaloproteinase da peçonha de *B. atrox* colombiana, denominada Batx-I, utilizando cromatografia de troca iônica e de afinidade. Esta metaloproteinase apresentou peso molecular de 23 kDa quando analisado por SDS-PAGE.

Cintra et al. (2012) isolaram uma metaloproteinase da peçonha de *B. atrox* proveniente do município de Santarém, Pará, que apresentou uma forte atividade fibrinolítica, sendo denominada de Batroxase. Esta enzima apresentou uma cadeia simples composta por 202 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 22.9 kDa, determinado por espectrometria de massa, com ponto isoelétrico de 7.5.

No presente estudo, foi observado no perfil eletroforético da peçonha de *B. atrox* amapaense, uma proteína com o peso molecular de aproximadamente 23 kDa, semelhante aos resultados apresentados pelos autores citados acima.

Em relação ao perfil eletroforético da peçonha de *C.d. ruruima*, verificou-se a presença de proteínas com peso molecular aproximado de 10 kDa (provavelmente

devido à presença de crotamina), 14 kDa (provavelmente devido à presença de crotoxina) e outra proteína com peso aproximado de 32 kDa.

A análise de SDS-PAGE realizada por Dos Santos *et al.* (2005) com peçonhas de seis espécimes de *Crotalus durissus ruruima* da mesma região geográfica localizada no Estado de Roraima, Brasil, mostraram que diferenças quantitativas e qualitativas foram encontradas e verificou-se a presença de isoformas de crotoxinas, corroborando a existência de uma variabilidade intrapopulacional considerável.

No perfil eletroforético apresentado no estudo realizado por Dos Santos *et al.* (2005) não foi demonstrada a presença de crotamina em nenhuma das peçonhas estudadas. A análise de SDS-PAGE revelou proteínas com peso molecular aparente de 14 KDa, esperado para moléculas semelhantes à crotoxina.

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicaram que o soro antibotrópico foi eficaz na neutralização das atividades nociceptiva (2ª fase), inflamatória (peritonite), hemorrágica, miotóxica, coagulante e hemolítica indireta por fosfolipases A₂. Porém, o mesmo não conseguiu neutralizar a atividade edematogênica, a 1ª fase da nocicepção e a atividade hialuronidásica. O perfil eletroforético das proteínas presentes apresentaram peso molecular de aproximadamente 14, 23 e 50 kDa.

Em relação ao soro anticrotático, observou-se que o mesmo foi eficaz na neutralização das atividades miotóxica, letal, coagulante e hemolítica indireta por fosfolipases A₂, porém não foi observada a neutralização da atividade inflamatória (peritonite) e hialuronidásica. Os resultados também mostraram que a peçonha de *C. d. ruruima* não induziu edema, nocicepção e hemorragia, sendo assim, não foram realizados os ensaios com o soro anticrotático na neutralização destas atividades. O perfil eletroforético da peçonha de *C.d. ruruima* apresentou proteínas com peso molecular aproximado de 10, 14 e 32 kDa.

Portanto, os resultados deste estudo demonstraram que tanto o soro antibotrópico quanto o soro anticrotático foram terapeuticamente eficazes na neutralização da maioria dos efeitos desencadeados pelas peçonhas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* capturadas no Estado do Amapá. Tais informações contribuem para os estudos envolvendo envenenamentos humanos e eficácia da soroterapia, considerando que características filogenéticas, ontogenéticas, sexuais, ambientais ou de dieta podem alterar a composição das peçonhas de serpentes. Além disso, o *pool* de antígenos utilizado na produção dos soros antibotrópico e anticrotático não contém as peçonhas de *Bothrops atrox* e de *Crotalus durissus ruruima*.

Este estudo possui relevância por ser pioneiro ao contribuir com literaturas voltadas para o conhecimento de importantes espécies de serpentes existentes no Estado do Amapá, a análise da efetividade de neutralização da soroterapia na toxicidade destas peçonhas pode servir como base científica para realização de futuras pesquisas com toxinas de peçonhas e soroterapia.

REFERÊNCIAS

AIRD, S.D.; KAISER, I.I. Comparative studies on three rattlesnake toxins. **Toxicon**. v.23, n.3, p.361-74, 1985.

AIRD, S.D.; STEADMAN, B.L.; MIDDAUGH C.R.; KAISER I.I. Comparative spectroscopic studies of four crotoxin homologs and their subunits. **Biochim Biophys Acta**. v.997, n.3, p.211-8, 1989.

ALVES, C.D. **Estudo dos efeitos renais do peçonha da serpente *Lachesis muta muta***. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Fortaleza, 2010.

AMAPÁ. Governo do Estado. **Amapá sustentável para o século 21**. Macapá, 2000. 62p.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; SILVA, A.O.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; REIS, R.J. et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.28, p.220–7, 1986.

AMORA, D.N.; SOUSA, T.M.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.F.; MAGALHÃES, M.R.; TOYAMA, M.H.; FONTELES, M.C.; MENEZES, D.B.; MONTEIRO, H.S.A. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v.47, p.260-264, 2005.

ANTUNES, Edson. **Poder neutralizante de soros antiofídicos sobre a atividade liberadora de histamina de peçonhas ofídicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1987.

ARMELIN, M.J.C. **Identificação e caracterização de áreas e comunidades com potencial para o desenvolvimento de sistemas comunitários de produção florestal no Estado do Amapá**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

AVILA-PIRES, T.C.S.; HOOGMOED, M.S. & VITT, L. Herpetofauna da Amazônia. In *Herpetologia no Brasil II* (L.B. Nascimento & M.E. Oliveira, eds). **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, Belo Horizonte, p. 13-43, 2007.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. Acidente crotálico. 2003. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. **Animais Peçonhetos no Brasil. Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. Sarvier e FAPESP, São Paulo, p. 91–98.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LÉON, I.R.; BATISTA, I.F.C.; DELLA-CASA, M.S. *et al.* BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54-65, 2008.

BARBOSA, A.M.; VILLA VERDE, A.B.; GUIMARÃES-SOUZA, L.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C. *et al.* Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 1236-1244, 2008.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. **Arq Bras Med Hyg.** v.64, p.14-20, 1990.

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

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro, EPUC, 1994.

BOLAÑOS, R. Peçonha de serpientes. Estrutura química y actividades biológicas y farmacológicas. In: Universidad de Costa Rica (Ed.). **Serpientes, Peçonhas y Ofidismo em Centro América**. San José, p.45-81, 1984.

BOLDRINI-FRANÇA, J. **Characterization of hyaluronidase activity from several Viperidae snake venoms and partial isolation of hyaluronidase from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom**. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 36, 2007, Salvador. *Anais*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2007. N-140, p. 112.

BON, C.; CHANGUEUS, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.** v.99, n.3, p.471-481, 1979.

BORDON, K.C.F. **Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus***. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BRANCO, C.S.C.A.; DINIZ, M.F.M.F.; DE ALMEIDA, N.R.; SANTOS, B.H.; DE OLIVEIRA, M.K. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: Zoonoses**, p. 116, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS. GUIA DE BOLSO. 8ª edição revista Série B. Textos Básicos de Saúde. 2010.

BRAZIL, O.V. Peçonhas. In: COBERT, C.E. (Ed.). **Farmacodinâmica**. 6ed, São Paulo, Guanabara Koogan, 1044-1074, 1984.

CABRAL, G.A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sci.** v. 77, n. 14, p. 1699-710, 2005.

CALVETE, J.J.; SANZA, L.; PÉREZA, A.; BORGESB, A.; VARGASC, A.M. *et al.* Snake population venomomics and antivenomics of Bothrops atrox: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**. 2011.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. New York: Cornell University Press. p.709-715, 2004.

CARREIRO, R.S.; COGO, J.C.; JÚNIOR, A.C.G.P. Estudo da miotoxicidade induzida pelo veneno de Bothrops jararaca: análise quantitativa de fibras lesadas. **V Encontro Latino Americano de Pós-graduação-Universidade do vale do Paraíba**, 2005.

CASTANHEIRA, L.E.; BRANDEBURGO, M.I.H.; ÁVILA, V.M.R.; HAMAGUCHI, A. **Purificação e caracterização enzimática e biológica parciais da hialuronidase presente na peçonha de Crotalus durissus collilineatus**. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 2000.

CHANG, C.C.; LEE, J.D. Crotoxin, The Neurotoxin of South American Rattlesnake Venom, is a Presynaptic Toxin Acting Like β -Bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedeberg. Arch.Pharmacol.** v.296, p.159-168, 1977.

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

CHIPAUX, J.P.; GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**. v.36, n. 6, p. 823-846, 1998.

CINTRA, A.C.O.; DE TONI, L.G.; SARTIM, M.A.; FRANCO, J.J.; CAETANO, R.C. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from B. atrox snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v.60, p. 70-82, 2012.

COLOMBINI, M.; FERNANDES, I.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A.M. *Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. **Toxicon**, v. 39, p. 711-719, 2001.

COSTA, T.R. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

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

CUNHA, E.M.; MARTINS, O.A. Principais compostos químicos presente nos peçonhas de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 02, p. 2237-3462, 2012.

DA COSTA, H.N.R.; DOS SANTOS, M.C.; ALCÂNTARA, A.F.C.; SILVA, M.C.; FRANÇA, R.C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (LAMIACEAE). **Quim. Nova**, v. 31, n. 4, p. 744-750, 2008.

DA ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Individual characterization of *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril venoms, according to their geographic distribution in Brazil (Serpentes, Viperidae). **Rev. Bras. Zool.** v.22, n.2, Curitiba June 2005.

DA ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Análise das atividades biológicas dos peçonhas de *Philodryas offersii* (Lichstenstein) e *P. patagoniensis* (Girad) (Serpentes Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 24, n.2, p. 410-418, 2007.

DA SILVA, J.O. **Avaliação do efeito de extrato de *Pentaclethra macroloba* W. (Mimosaceae) sobre as atividades letal e miotóxica induzidas pelo peçonha de *Bothrops atrox***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

DA SILVA, J.O. **Isolamento e identificação de componentes antibotrópicos de *Pentaclethra macroloba* W. (Mimosaceae)**. Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP. 2005.

DA SILVA, N.M.V.; ARRUDAD, E.Z.; MURAKAMIA, Y.L.B.; MORAESA, R.A.M.; TOMAZA, M.A. *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, p. 196–205, 2007a.

DA SILVA JUNIOR, P.G.P. **Efeitos do Ar-Turmerone, Isocurcumenol e Soro Antibotrópico em coelhos após inoculação do peçonha de *Bothrops Jararaca***. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007b.

DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; MASO, V.; DAMICO, D.C.; BALDASSO, P.; VEBER, C.L. *et al.* Molecular modeling and inhibition of phospholipase A2 by polyhydroxy phenolic compounds. **Eur. J. of Med. Chem.** v.44, p. 312-321, 2009.

DA SILVA, J.O.; DE OLIVEIRA, N.K.S.; RIBEIRO, J.R.; MACHADO, J.A.H; SOUSA, E.A. *et al.* Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado do Amapá em 2010. In: XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2011, São Paulo. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 24. p. 354, 2011.

DA SILVA, I.R.F.; LORENZETTI, R.; RENNO, A.L.; BALDESSERA JUNIOR, L.; FERRANO, S.M.T.; HYSLOP, S. BJ-PI2, A non hemorrhagic metalloproteínase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 11, p. 1809-1821, 2012.

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

DE PAULA, R.C. **Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do peçonha da serpente *lachesis muta***. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

DE SOUSA, Elziliam Aranha; BITTENCOURT, José Adolfo Homobono Machado; DE OLIVEIRA, Nayana Keyla Seabra; HENRIQUES, Shyanne Vanessa Correia; PIKANÇO, Leide Caroline Dos Santos *et al.* Influence of a low-level semiconductor gallium arsenate laser in experimental envenomation induced by *Bothrops Atrox* snake venom. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 4, p. 141-148, 2012.

DIZ FILHO, E.B.S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D.O.; FAGUNDES, F.H.R.; OLIVEIRA, S.C.B. *et al.* Enzymatic and structural characterization of new PLA₂ isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon** v.53, p. 104-114, 2009.

DO NASCIMENTO, S.P. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima, Brasil, entre 1992 e 1998. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, jan-mar. v.16, n.1, p.271-176, 2000.

DOS SANTOS, M.C.; FERREIRA, L.C.L.; DIAS DA SILVA, W.; FURTADO, M.F.D. Caracterización de las actividades biológicas de los peçonhas amarillo y blanco de

Crotalus durissus ruruima comparados con el peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, **Toxicon** v.31, p. 1459-1469, 1993a.

DOS-SANTOS, M.C.; MORHY, L.; FERREIRA, L.C.L.; OLIVEIRA, E.B. Purification and properties of a crotamine analog from *Crotalus durissus ruruima* venom. **Toxicon**, v.31, p.166, 1993b.

DOS-SANTOS, M.C.; ASSIS, E.B.; MOREIRA, T.D.; PINHEIRO, J.; FORTES-DIAS, C.L. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. **Toxicon**, v. 46, p. 958-961, 2005.

DOS-SANTOS, M.C.; ARROYO, C.; SOLANO, S.; HERRERA, M.; VILLATA, M. *et al.* Comparison of the effect of *Crotalus simuse* *Crotalus durissus ruruima* venoms on the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom: Implications for the production of polyspecific snake antivenoms. **Toxicon**, v. 57, p. 237-243, 2011.

DUNN, R.D.; BROADY, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A2 enzymes. **Biochim Biophys Acta** v.1533, p.29-37, 2001.

EVANS, Jason; OWNBY, Charlotte L. Neutralization of edema, hemorrhage and myonecrosis induced by North American crotalid venoms in simulated First-aid treatments. **Toxicon**, v.37, p.633-650, 1999.

FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C. (1995). Clinical toxicology of snake bites in South America. In: (MEIER, J; WHITE, J.) **Handbook of Clinical Toxicology of Animals Venoms and Poisons**, Boca Raton CRC Press. p.667-688.

FERNÁNDEZ, G.P.; SEGURA, A.; HERRERA, M.; VELASCO, W.; SOLANO, G. *et al.* Neutralization of *Bothrops mattogrossensis* snake venom from Bolivia: Experimental evaluation of llama and donkey antivenoms produced by caprylic acid precipitation. **Toxicon**, v. 55, p. 642-645, 2010.

FERNANDES, I.; ASSUMPÇÃO, G.G.; SILVEIRA, C.R.F.; FAQUIM-MAURO, E.L.; TANJONI, I. *et al.* Immunochemical and biological characterization of monoclonal antibodies against BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 56, p. 1059-1065, 2010.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**, third ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

FONSECA, F.V. **Modificação estrutural de PLA2 de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis* com p-bromofenacil e cumarinas sintéticas – Caracterização bioquímica e biológica. Estudo da agregação plaquetária e efeito edematogênico.** Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade

Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular – Área de Bioquímica. 2011.

FRANCO, Y.O. **Atividade neurotóxica e miotóxica dos peçonhas de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu* e de suas principais toxinas, perante anti-peçonhas.** Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1997.

FRANÇA, F.O.S.; FAN, H.W. Acidente Botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos.** São Paulo, Editora Sarvier, p. 149-160, 1992.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. 2003. In: CARDOSO, JLC; FRANÇA, F.O.S.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. **Animais Peçonhetos no Brasil. Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** Sarvier e FAPESP, São Paulo, p. 72–86.

FRAUCHES, T.S.; PETRETSKI, J.H.; ARNHOLDT, A.C.V.; LASUNSKAIA, E.B.; DE CARVALHO, E.C.Q. *et al.* Bothropic antivenom based on monoclonal antibodies, is it possible? **Toxicon**, v. xxx, p. 2-8, 2013.

FURTADO, M.F.; COLLETO, G.M.D.D.; SILVA, W.D. Controle de qualidade dos peçonhas animais e dos correspondentes anti-peçonhas: I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos peçonhas de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 53, p. 149-159, 1991a.

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

FURTADO, M.F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**. v.48, n.4, p. 401–410, 2006c.

GIRISH, K.; KEMPARAJU, K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: role in the management of poisonous bite. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 78, n. 13, p. 1433-40, 2006.

GIRISH, K.S. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**, Paris, v. 86, n. 3, p. 193-202, 2004.

GIRISH, K.S; KEMPARAJU, K. Overlooked issues of snakebite management: time for strategic approach. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 11, n. 20, p. 2494-2508, 2011.

GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. **Toxicon** v.16, p. 81-84, 1978.

GOMES, M.S.R. **Purificação e caracterização bioquímica de bthmp: uma nova metaloproteinase do peçonha de *bothrops moojeni* (caíçaca)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2006.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B.J.; THEAKSTON, R.D.G. Specificity of antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. **Toxicon** v.19, p.131-139, 1981.

GUIDOLIN, F.R.; TAMBOURGI, D.V.; GUIDOLIN, R.; MARCELINO, JR; OKAMOTO, C.K. *et al.* Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**, v. 66, p. 7-17, 2013.

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. Alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica, **Toxicon**. Vol. 26, p. 411 – 413, 1988.

GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENE, J.; CHAVES, F. La evolución de La capacidad neutralizante de los antivenenos em America. San José, Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, **Publication Offset**, p.1-21, 1990.

GUTIÉRREZ, J.M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier J, White J, editors. **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. Boca Raton: CRC Press, p. 645–65, 1995a.

GUTIÉRREZ, J.M; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v.33, n.11, p.1405-24, 1995b.

GUTIÉRREZ, J.M; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. v.42, n.8, p. 915-31, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage, **Toxicon**, v.45, 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**. v.54, p.976-86, 2009a.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G. Snake antivenoms: technological, clinical and public health issues. In: de Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., Martin-Euclaire, M.F., Zingali, R.B., Rochat, H. (Eds.), *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Editora UFMG, Belo Horizonte, Brasil, pp. 393–421, 2009b.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G. Snake antivenoms: technological, clinical and public health issues. 2009c. In: DE LIMA, ME; PIMENTA, AMC; MARTIN-EUCLAIRE, MF; ZINGALI, RB; ROCHAT, H. *Animal Toxins: State of the Art*. Perspectives in Health and Biotechnology. Editora UFMG, Belo Horizonte, Brasil, p. 393–421.

GUTIÉRREZ, J.M.; TSAI, W.; PLA, D.; SOLANO, G.; LOMONTE, B. *et al.* Preclinical assessment of a polyspecific antivenom against the venoms of *Cerrophidion sasai*, *Porthidium nasutum* and *Porthidium ophryomegas*: Insights from combined antivenomics and neutralization assays. *Toxicon*, v. 64, p. 60-69, 2013.

HARBERMANN, E; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantification of phospholipases. *Anal Biochem*. v.50, p.163-173, 1972.

HARRISON, R.A. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: Cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. *Gene, Amsterdam*, v. 392, p.22-33, 2007.

HICKEY, M.J.; SHARKEY, K.A.; SIHOTA, E.G.; REINHARDT, P.H.; MACMICKING, J.D.; NATHAN, C.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte–endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J.*, v.11, n.12, p.955-964, 1997.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. The formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. *J Neurosci Meth*. v.14, p. 69076-69083, 1985.

JANUÁRIO, A.H.; SANTOS, S.L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M.V.; PIETRO, R.C.L.R. *et al.* Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, v. 150, p. 243-251, 2004.

JIA, Y.; CANTU, B.A.; SANCHEZ, E.E.; PÉREZ, J.C. Complementary DNA Sequencing and Identification of mRNAs from the Venomous Gland of *Akistrodon piscivorous leucostoma*. *Toxicon*. v. 51, p. 1457-1466, 2008.

JOHNSON, M.K.; THOMSON, A.J.; WALSH, T.A.; BARBER, D.; GREENWOOD, C. Electron paramagnetic resonance studies on *Pseudomonas* nitrosyl nitrite reductase. Evidence for multiple species in the electron paramagnetic resonance spectra of nitrosyl haemoproteins. *J. Biochem*. v.189, p. 285-294, 1980.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Revista Instituto Medicina Tropical**. São Paulo, v.35, p.347-354, 1992.

KAMIGUTI, A.S.; SILVA, M.V.; CARDOSO, J.L.C. Desfibrinação no envenenamento acidental por serpentes *Bothrops jararaca* filhotes. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.** v.19, n. 28, p. 383-390, 1986a.

KAMIGUTI, A.S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I.S.; NAHAS, L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. **Brazilian J. Med. Res.**, v.19, p.199-204, 1986b.

KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C. Haemostatic changes caused by the venoms of south american snakes. **Toxicon**, v.27, p.955-963, 1989.

KANASHIRO, M.M.; ESCOCARD, R.C.M.; PETRETSKI, J.H.; PRATES, M.V.; ALVES, E.W. *et al.* Biochemical and biological properties of phospholipases A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p.1179-1186, out./2002.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. Enzimas. In: **Química Clínica – Técnicas de Laboratório – Fisiopatologia – Métodos de Análises**. Buenos Aires: Médica Panamericana, p. 1273, 1986.

KING, T.C. **Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

KINI, R.M. Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism. **John Wiley & Sons**, New York. 1997.

KISNER, C.; COLBY, L.A. **Exercícios terapêuticos: fundamentos e técnicas**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 2005.

KOHLHOFF, M.; BORGES, M.H.; YARLEQUE, A.; CABEZAS, C.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of proteomics**, v. 75, p. 2181-2195, 2012.

KONDO, H. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v.13, p. 43-51, 1960.

KONSTANTOPOULOS, K; MCINTIRE, L.V. Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. **J. Clin. Invest.** v.100, p.19-23, 1997.

KOUYOUMDJIAN, J.A.; HARRIS, J.B.; JOHSON, M.A. Muscle necroses caused by the subunits of crotoxin. **Toxicon** v.24, p.575-583, 1986.

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

LALLOO, D. Venomous bites and stings. **Medicine**. v. 33, p. 74-76, 2009.

LIRA, M.S.; FURTADO, M.F.; MARTINS, L.M.P.; LOPOES-FERREIRA, M.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. **Toxicon**, v. 49, p. 982-994, 2007.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.; OTERO, R.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M.E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**. v. 28, p.1113-1146, 1990.

LOMONTE, B.A.; TARKOWSKI L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom: Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** v.17, n.2, p.93-105, 1993.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual expresión patterns of myotoxin in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.102B, n.2, p.325-329, 1994a.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.** v.269, p.29867–29873, 1994b.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; FURTADO, M.F.; OTERO, R.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O. *et al.* Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**. v.28, p-1113-1146, 2003.

MACKASSEY, S.P. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern pacific rattlesnakes (*Crotalus viridis oreganus*). **Comp. Biochem. Physiol.** v.106B, n.1, p. 181-189, 1993.

MACKASSEY, S.P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K.G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*. A case of venom Paedomorphosis? **Copeia** v.4, p. 769-782, 2003.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H.P.B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R.N. *et al.* Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.146, p. 565-575, abr./2007.

MAGALHÃES, A.L. **Avaliação do potencial anti-inflamatório de *Marsypianthes chamaedrys* (VAHL) Kuntz (LAMIACEAE) frente ao peçonha de *Bothrops atrox***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

MAGALHÃES, A.; SANTOS, G.B.; VERDAMC, M.C.S.; FRAPORTID, L.; MALHEIRO, A. Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.134, p.82–88, 2011.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1477, p. 146-156, 2000.

MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms; their biochemical and biological activities. **Pharmac. Ther.**, v.48, p.223-236, 1990.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, no. 7203, p. 428-35, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação de Saúde, 2001.

MOREIRA, L.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pathological changes induced by Ba H1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, v. 32, p.977-987, 1994.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M.C.; NASCIMENTO, N.G.; DA SILVA, H.B.; FERNANDES, C.M.; LIMA, M.R.D.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12-20, 2012.

MUNIZ, E.G.; MARIA, W.S.; ESTEVÃO-COSTA, M.I.; BUHRNHEIM, P.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antiotherapeutic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 38, p. 1859-1863, 2000.

NADUR-ANDRADE, N.; BARBOSA, A.M; PEREIRA, C.F.; LIMA, C.J.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. **Lasers Medicine Science**, 2011.

NATAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 826-852, 2002.

NEIVA, M.; ARRAES, F.B.M.; SOUZA, J.V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A.R.B. *et al.* Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**. v. 53, p. 427-436, 2009.

NETO, G.B. **Serpentes**. Agudos, 2001.

NOAKES, T.D. Effects of exercise on serum enzyme activities in humans. **Sport Medicine**, v.4, p. 245-267, 1987.

NORONHA, M.D.N. **Eficácia dos Soros Antiofídicos de uso Veterinário na Neutralização das Atividades Biológicas dos Peçonhas de *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) e *Crotalus durissus ruruima* (Hoge, 1965)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e recursos naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, 2008.

NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; DE LA TORRE, P.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 57-78, 2009.

NUNES, F.P.B.; ZYCHAR, B.C.; DELLA-CASA, M.S.; SAMPAIO, S.C.; GONÇALVES, L.R.C.; CIRILLO, M.C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: Involvement of formyl-peptide receptors. **Toxicon**, p.1-7, 2010.

NUNES, D.C.O.; RODRIGUES, R.S.; LECENA, M.N.; COLOGNA, C.T.; OLIVEIRA, A.C.S. *et al.* Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.154, p.226-233, sep./2011.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; MESA, M.B.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; ARANGO, J.L. *et al.* Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia: a clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon** v.40, p.1107–1114, 2002.

PAIVA, R.M.A.; FIGUEIREDO, R.F.; PAIVA, H.H.; BIANCHI, M.L.P.; RODRIGUES, K.C. *et al.* Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93, p. 941-947, 2011.

PANTIGOSO, C.; ESCOBAR, E.; MALAGA, O.; YARLEQUE, A. Isolation and some properties of the proteinase atroxin from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Acta Cient. Venez.**, v. 47, p. 67-73, 1996.

PATÍÑO, A.C.; PEREAÑEZ, J.A.; NÚÑEZ, V.; BENJUMEA, D.M.; FERNANDEZ, M.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 936-94, 2010.

PEREIRA, A.Z.P. **Análise da variabilidade ontogenética do peçonha de *Bothrops Insularis* (Amaral, 1921) (Serpentes,Viperidae): Implicações adaptativas aos itens alimentares.** Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, 2006.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, no. 10, oct. 2002.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 47, n 1, jan./mar., 2001.

POBER, J.S. Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. **Ciba Found. Symp.** v.131, p.170–184. 1987.

PONTE, C.G.; NÓBREGA, E.L.; FERNANDES, V.C.; DA SILVA, W.D.; SUAREZ-KURTZ, G. Inhibition of the myotoxic activities of three African Bitis venoms (*B. rhinoceros*, *B. arietans* and *B. nasicornis*) by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v.55, p. 536–540, 2010.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARRELL, D.A.; DESAKORN, V.; MCMICHAEL, A.J.; WHITE, N.J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some southeast Asian snake venoms. **Toxicon**. v.26, p. 629 – 637, 1988.

QUEIROZ, GISELLE PIDDE; PESSOA, LUCAS ALVES; PORTARO, FERNANDA CV; FURTADO, MARIA DE FÁTIMA; TAMBOURGI, DENISE V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v.52,p.842–851, 2008.

RAEL, E.D.; KNIGHT, R.A.; ZEPEDA, H. Eletrophoretic variations of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venoms and migration differences of Mojave toxin. **Toxicon**, v.22, n.6, p. 980-985, 1984.

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

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D.F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v.44, n.6, p.609-16, 2004.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Epidemiologia e quadros clínicos dos acidentados por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, p. 436-442 1990.

RIBEIRO JÚNIOR, Marcos Antonio. **Estudo comparativo do peçonha de *Bothrops Jararaca* do continente e de espécimes da Ilha de São Sebastião**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade São Paulo, 2008.

RIDGER, V.C.; WAGNER, B.E.; WALLACE, W.A.; HELLEWELL, P.G. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. **J. Immunol.** v.166, n.5, p.3484–3490, 2001.

ROCK, K.L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

ROJAS, E.; QUESADA, L.; ARCE, V.; LOMONTE, B.; ROJAS, G. *et al.* Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú. **Acta Tropica**, v. 93, p. 85-95, 2005.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl, W., Buckley, E. (Eds). **Venomous Animals and their Venoms**. Academic Press, New York, 1971. v. 2, p. 345-384.

RUCAVADO, A.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Immunological studies on BaH1 and BaP1, two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon** v.33, p.1103-1106, 1995.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRI_ZAJ, I.T. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, p. 1-19, 2011.

SALAZAR, A.M.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; GIRÓN, M.E.; AGUILAR, I.; GUERRERO, B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 95-104, 2007.

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

SANTOS-FILHO, N.A. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I_2 inductor phospholipase A_2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

SANTOS-FILHO, N.A. **Caracterização Funcional e Estrutural de uma Fosfolipase A_2 Ácida Tóxica Isolada da Peçonha de *Bothrops moojeni***. Dissertação (Mestrado em Toxicologia), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2009.

SANTOS, M.C. Characterization of the biological activities of the *Crotalus durissus ruruima* yellow and white venoms compared with *Crotalus durissus terrificus* venom: neutralizing effect of the antivenoms against *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Venom. Anim. Toxins** v.2, n.2, p.163-163, 1996.

SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERRETTI, M.; BISCOGLIO, M.J.; RIVERA, E. *et al.* Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **Journal of proteomics**. v. 71, p. 46-60, 2008.

SCHNEIDER, F.S.; STARLING, M.C.; DUARTE, C.G.; AVILA, R.M.; KALAPOTHAKIS, E. *et al.* Preclinical testing of Peruvian anti-bothropic anti-venom against *Bothrops andianus* snake venom. **Toxicon**, v. 60, p. 1018-1021, 2012.

SEGURA, A.; CASTILLO, M.C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L.R. *et al.* Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 980-989, 2010.

SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; WHITE, S.P.; OWNBY, C.L. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A_2 myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. **Arch Biochem Biophys**. v.326, n.1, p.21-30, 1996.

SETÚBAL, S.S.; PONTES, A.S.; FURTADO, J.L.; XAVIER, C.V.; SILVA, F.L.; KAYANO, A.M. Action of two phospholipases A_2 purified from *Bothrops alternatus*

snake venom on macrophages. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 2, p. 194-203, 2013.

SILVA, N.M.V. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196-205, 2007.

SILVA, E.S.; BOCHNER, R.; GIMÉNEZ, A.R.M. O ensino das principais características das serpentes peçonhentas brasileiras: avaliação das literaturas didáticas no Ensino Fundamental do Município do Rio de Janeiro. **Educ. Rev.** n.42, Curitiba, Out./Dez., 2011.

SILVA, T.F.; SANTOS, G.T.; MENDONÇA, F.S.; SOARES, A.M.; NEVES, L.M.G. *et al.* Avaliação histológica dos efeitos da crotoxina de – *Crotalus durissus terrificus* na pele do dorso de ratos Wistar. **Scientia Plena** v.8, n., 2, 2012.

SOARES, C.C.; MARQUES, T.M.; RIGOLIN, G.G.; NEIS, E.; FRIANÇA, A.M.V.; SILVA, A.S. *et al.* Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19. p. 77-81. 2009.

SORO ANTIBOTRÓPICO: ampola. Responsável técnico Jorge Luiz Coelho Mattos. Rio de Janeiro: Instituto Vital Brazil S.A., 2009. Bula de remédio.

SOTO, L.A.P. **Estudos estrutura-função de neurotoxinas isoladas de peçonha crotálica e botrópica análise comparativa da neurotoxicidade e miotoxicidade.** Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and actions**. v.17, n.1, p.97-103, 1985.

SOUSA, E.A. **Efeitos do laser de baixa potência arseneto de gálio (AsGa) sobre as manifestações locais agudas induzidas pelo peçonha de *Bothrops moojeni*.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2012.

STÁBELI, R.G. *Bothrops moojeni* Myotoxin-II, a Lys49-Phospholipase A2 Homologue: an Example of Function Versatility of Snake Venom Proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 142, n.3-4, p. 371-381, 2006.

STERN, R.; JEDRZEJAS, M.J. The Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. **Chemical Reviews**. v. 106, p. 818–83, 2006.

STOCKER, K. Inventory of exogenous hemostatic factors affecting the prothrombin activating pathways. **Thromb. Hemost.**, v. 79, p. 257-260, 1994.

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

TEIXEIRA, S.S. **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida isolada do peçonha de *Bothrops pirajai***. São Paulo, 112 p. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. São Paulo, 2009.

THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization** 61. p.949-956, 1983.

THEAKSTON, R.D.G.; PUGH, R.N.H. Antivenom Reaction and Complement Depletion in Snake Bite. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, vol. 81, n. 1, p.73-75, 1987.

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

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

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂? **Biochimie**, v. 82, p. 815-31, 2000.

VILAR, J.C.; CARVALHO, C.M.; FURTADO, M.F.D. Ofidismo e plantas utilizadas como antiofídicas. **Biologia Geral e Experimental**. v. 6, n. 1, 2005.

VITAL BRAZIL. Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 981-92, 1966.

VITAL BRAZIL, O.; EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Physiol.** v.212, p.34-35, 1971.

YAMAKAWA, M.; NOSAKI, M.; HOKAMA, Z. Fractionation of sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal hemorrhagic and edemaforming activities

of the fractions. In: **Animal, Plant and Microbial toxins**. Ohsaka, A., Hayashi, K. and Sawai (Eds.), Plenum Press, New York. v. 1, p. 97, 1976.

WAGSTAFF, S.C.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; HARRISON, R.A.; CALVETE, J.J. Combined Snake Venomics and Venom Gland Transcriptomic Analysis of the Ocellated Carpet Viper, *Echis ocellatus*. **Journal of Proteomics**. v. 71, p. 609-623, 2009.

WALDEZ, F.; VOGT, R.C. As serpentes peçonhentas da reserva piagaçu-purus e acidentes ofídicos na região do baixo rio purus, amazônia central. **Rev. Colombiana cienc. Anim.** v.3, n.2, 2011.

WARREL, D.A. Geographical and intraspecies variation in the clinical manifestations of envenoming by snakes. **Symp. Zool. Soc. Lond.**, v.70, p.189-203, 1997.

WARRELL, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, JA; LAMAR, WW editors. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca (NY) and London: Comstock Publishing Associates; 2004.

WARRELL, D.A. Venomous animals. **Medicine**. v. 35, p. 659-662, 2007.

WARRELL, D.A. Snake bite. **The Lancet**. v. 375, p. 77-88, 2010.

WHO. Progress in Characterization of Venoms and Standardization of Antivenom. Geneva, in: **WHO Offset Publication** v.58, 1981.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; HARRISON, R.; WARRELL, D.A.; WHITE, J.; WINKEL, K.D. *et al.* The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **The Lancet**. v. 375, p. 89-91, 2010.

WOLZ-RICHTER, S.; ESSER, K.H.; HESS, A. Antinociceptive activity of crotoxin in the central nervous system: A functional Magnetic Resonance Imaging study. **Toxicon**, v. 74, p. 44-55, 2013.

ZELANIS, A.P.P. **Análise da variabilidade ontogenética do peçonha de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921): implicações adaptativas aos itens alimentares**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

ZHANG, H.; HAN, R.; CHEN, Z.; CHEN, B.; GU, Z.; REID, P.F.; RAYMOND, L.N.; QIN, Z. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 48, p. 175-182, 2006.

ANEXO A
CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo no. 001/2012 – CEP sobre **"TOXIDADE DOS VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO BOTHROPS E LACHESIS CAPTURADAS NO ESTADO DO AMAPÁ E HABILIDADE DO SORO ANTIBOTRÓPICO E ANTILAQUÉTICO BRASILEIROS NA NEUTRALIZAÇÃO DESTAS ATIVIDADES"**, sob a responsabilidade de **Nayana Keyla Seabra de Oliveira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação de Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal(COBEA), e foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), em reunião realizada em 16/02/2012.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 001/2012 about **"TOXIDADE DOS VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO BOTHROPS E LACHESIS CAPTURADAS NO ESTADO DO AMAPÁ E HABILIDADE DO SORO ANTIBOTRÓPICO E ANTILAQUÉTICO BRASILEIROS NA NEUTRALIZAÇÃO DESTAS ATIVIDADES"**, **Nayana Keyla Seabra de Oliveira** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adapted by Brazilian College of Amino Acid Experimentation(COBEA) and was approved by the Research Ethical Committee(CEP-UNIFAP) in 16/02/2012.

Macapá, 16 de fevereiro de 2012

Assinatura manuscrita em azul do Prof. Msc. Alexandre Souto Santiago.

Prof. Msc. Alexandre Souto Santiago
Coordenador - CEP-UNIFAP

ANEXO B

APROVAÇÃO PARA COLETA E CAPTURA DAS SERPENTES DO SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (SISBIO)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27228-4	Data da Emissão: 26/12/2013 16:26	Data para Revalidação*: 25/01/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Jocivania Oliveira da Silva	CPF: 358.304.412-68
Título do Projeto: ANTIVENENOS VEGETAIS COMO FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS EM ACIDENTES OFÍDICOS	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Selecionar e coletar as espécies botânicas com potencial antiofídico	03/2011	12/2016
2	Recebimento ou captura dos animais	03/2011	12/2016
3	Coleta do veneno das serpentes	03/2011	12/2016
4	Preparação dos extratos vegetais	04/2011	12/2016
5	Realização dos ensaios biológicos para avaliação da atividade antiofídica dos extratos vegetais	05/2011	12/2016
6	Elucidação estrutural dos compostos bioativos isolados das plantas	01/2012	12/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	A coleta das serpentes (2 a 3 exemplares/ espécie) deverá ser realizada por profissionais com experiência em HERPETOLOGIA. Se for profissional do CETAS/IBAMA-AP ou mesmo de outra Instituição a titular deverá incluir os nomes na equipe de trabalho antes da coleta. A pesquisadora fará a coleta de plantas de diversas famílias botânicas. Será coletado cerca de 1 Kg de material vegetal de cada espécie, fora de UC, e não será utilizado nenhuma espécie ameaçada de extinção.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Hugo Alexandre Silva Favacho	Farmacêutico e Pesquisador	741.445.372-34	4721565 ssp-PA	Brasileira
2	José Carlos Tavares Carvalho	Farmacêutico e Pesquisador	208.760.252-20	117846 SEGUP-AP	Brasileira
3	Nayana Keylla Seabra de Oliveira	Pesquisadora	985.055.212-34	143561 SIAC-AP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85267471



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27228-4	Data da Emissão: 26/12/2013 16:26	Data para Revalidação*: 25/01/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Jocivania oliveira da Silva	CPF: 358.304.412-68
Título do Projeto: ANTIVENENOS VEGETAIS COMO FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS EM ACIDENTES OFÍDICOS	
Nome da Instituição : Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

4	JOSE ADOLFO HOMOBONO MACHADO BITTENCOURT	Farmacêutico, Pesquisador e aluno de pós-graduação	777.054.672-91	123127 SEGUP-AP	Brasileira
5	Jose Renato Ribeiro	Médico Veterinário	285.531.952-87	255683 ssp-PI	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CUTIAS	AP	Cutias	Fora de UC Federal
2	FERREIRA GOMES	AP	Ferreira Gomes	Fora de UC Federal
3	LARANJAL DO JARI	AP	Laranjal do Jari	Fora de UC Federal
4	MAZAGAO	AP	Mazagão	Fora de UC Federal
5	PEDRA BRANCA DO AMAPARI	AP	Pedra Branca do Amapari	Fora de UC Federal
6	PORTO GRANDE	AP	Porto Grande	Fora de UC Federal
7	SANTANA	AP	Santana	Fora de UC Federal
8	SERRA DO NAVIO	AP	Serra do Navio	Fora de UC Federal
9	TARTARUGALZINHO	AP	Tartarugalzinho	Fora de UC Federal
10	MACAPA	AP	Macapá	Fora de UC Federal
11	AMAPA	AP	Amapá	Fora de UC Federal
12	PRACUUBA	AP	Pracuuba	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Lachesis, Crotalus, Bothrops
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Lachesis, Bothrops, Crotalus

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Répteis)	Laço com cabo de aço, Puçá, Laço de Lutz
---	------------------------------------	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Federal do Amapá	criadouro científico

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85267471



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27228-4	Data da Emissão: 26/12/2013 16:26	Data para Revalidação*: 25/01/2015
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: jocivania oliveira da silva	CPF: 358.304.412-68
Título do Projeto: ANTIVENENOS VEGETAIS COMO FERRAMENTAS TERAPÊUTICAS EM ACIDENTES OFÍDICOS	
Nome da Instituição : Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

[illegible]

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85267471



Página 3/3