



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOELITON DOS SANTOS CAVALCANTE

**TOXINOLOGIA E TERAPÊUTICA: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO
DA SERPENTE *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae) E
NEUTRALIZAÇÃO DO DANO TISSULAR MODULADO PELO VENENO**

**CAMPINA GRANDE
2019**

JOELITON DOS SANTOS CAVALCANTE

**TOXINOLOGIA E TERAPÊUTICA: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO
DA SERPENTE *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae) E
NEUTRALIZAÇÃO DO DANO TISSULAR MODULADO PELO VENENO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Área de concentração:

Toxinologia e Sistemas biológicos.

Toxinologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dra. Carla de Lima Bicho.

Coorientadores:

Prof. Msc. Cayo Antônio Soares de Almeida

Prof. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

**CAMPINA GRANDE
2019**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C376t Cavalcante, Joeliton dos Santos.
Toxinologia e terapêutica [manuscrito] : Atividades biológicas do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae) e neutralização do dano tissular modulado pelo veneno / Joeliton dos Santos Cavalcante. - 2019.
150 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Carla de Lima Bicho , Departamento de Biologia - CCBS."
1. Jararaca da seca. 2. Fisiopatologia. 3. Terapia antivenômica. 4. Hemorragia. I. Título
21. ed. CDD 571.95

JOELITON DOS SANTOS CAVALCANTE

TOXINOLOGIA E TERAPÊUTICA: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923) (SQUAMATA, VIPERIDAE) E
NEUTRALIZAÇÃO DO DANO TISSULAR MODULADO PELO VENENO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba como requisito parcial à
obtenção do título de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Áreas de concentração:
Toxinologia e Sistemas biológicos.
Toxinologia e Terapêutica.

Aprovado em: 02/05/2019.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Carla de Lima Bicho (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª. Dra. Maria José Lima dos Santos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª. Dra. Priscila Lima Jacob
Instituto de Educação Superior da Paraíba (IESP)

A minha mãe, meu pai e meu irmão pela dedicação,
companheirismo e amizade, DEDICO.

A todos que disseram ou pensaram que eu não conseguiria. Em especial a aqueles que contribuíram construindo obstáculos no meu caminho, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para esse processo de transição e amadurecimento. De forma alguma não poderia deixar de expressar todo meu agradecimento a elas. Expresso todo o meu carinho e gratidão a todos que me ajudaram de forma direta e indireta a superar os momentos difíceis e colaboraram para a realização desse trabalho, e em particular:

A minha orientadora da academia e da vida, Dra. Carla de Lima Bicho, pela sua disponibilidade, mesmo em período de férias, e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Saliento o apoio incondicional prestado, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento como investigador, desde os tempos de quando cursei seu componente curricular. Eternamente grato por todo o apoio.

Ao meu grande “*best friend in science world*” e orientador externo Msc. Cayo Antônio Soares de Almeida, pela orientação, dedicação, paciência e, principalmente, pela amizade durante todo o processo de construção deste trabalho, bem como no processo da minha lapidação para o mundo da ciência e início de minha carreira de Toxinologista! Em parte das minhas conquistas, você é o culpado! Acreditastes em mim, e me apoiastes até quando eu duvidei de mim mesmo. Você é incrivelmente único!

A minha coorientadora e amiga para a vida toda, Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge. Agradeço por cada sugestão para esse trabalho e disponibilidade em orientar. Sua ajuda e apoio foram muito importantes para mim, e nunca vou esquecer tudo que fizestes por mim. Muito obrigado! Com todo o carinho e de coração eu agradeço, e para sempre minha gratidão será sua.

Aos meus pais Severino e Maria José e a meus irmãos Júnior e Gil, pela compreensão da minha ausência na família em datas tão importantes, pelo sentimento de preocupação, saúde e aflição que gerei, além dos demais sentimentos.

A Wesley (Ruan). Sou muito grato por termos “jogado a âncora” e fixado esta amizade... para sempre! Você é incrivelmente único. Olhei para o lado e você estava

presente, não importava o tamanho da dificuldade que tive, sempre estivesse ao meu lado, não me deixando desanimar e desistir.

Agradeço a minha amiga-irmã Jose! Depois de muito tempo encontramos a verdadeira amizade também que não foi uma tarefa fácil. Sempre me aconselhando ou puxando a minha orelha... e muito!

A equipe do Setor de Modo de Ação de Drogas, INFAR/UNIFESP em especial a Ísis, a Ana e ao Dr. Gustavo que abriram as portas dos laboratórios para mim. Agradeço por todo conhecimento teórico-prático repassado para mim.

Meu agradecimento também ao Laboratório de histopatologia da Universidade Estadual da Paraíba que viabilizaram o processamento das amostras para análise histopatológica. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Cassiano e as técnicas Ana e Denise.

Ao Prof. Dr. Walclécio Moraes Lira pelo apoio quanto a infraestrutura para a realização de experimentos, bem como pela colaboração com os animais utilizados no estudo.

Ao Prof. Walter pelo apoio quanto ao espaço para realização de ensaios.

Agradeço ao Laboratório de Ecologia Aquática pelo auxílio. Em especial ao Prof. Dr. Ethan e a Dra. Patrícia.

A Aury por toda assistência no comitê de ética. Agradeço por tornar esse trabalho possível dentro da ética e moral.

A equipe do Laboratório de Neurogenética/UFABC e em especial a Marília pela boa recepção e treinamento científico com técnicas de biologia molecular.

As técnicas da UEPB, Andeilma, Climélia, Lívia, Maria, Renata e as Silvanas.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial a Day, Ranny, Juh e Agnis e aos que já foram e por algum motivo ocorreu afastamento. Saibam que sem vocês tudo teria sido mais difícil.

A Luana, pois quando coloquei meu barco na tempestade e fui em busca de “aventuras”, a cada procura você estava lá, sempre me estendendo a mão.

A minha grande amiga Fleuriane, que me apresentou ao maravilhoso mundo das toxinas animais.

Agradeço a todos os meus amigos, e aos que já foram e por algum motivo ocorreu afastamento. Saibam que sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o auto-controle, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria.

À Universidade quero deixar uma palavra de gratidão, por ter me recebido de braços abertos e com todas as condições que me proporcionou dias de aprendizagem muito ricos.

Aos professores reconheço um esforço gigante com muita paciência e sabedoria. Foram eles que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais todos os dias.

Sempre é preciso saber quando uma etapa chega ao final. Se insistirmos em permanecer nela mais do que o tempo necessário, perdemos a alegria e o sentido das outras etapas que precisamos viver. Encerrando ciclos, revirando o jogo, fechando portas, terminando capítulos - não importa o nome que damos, o que importa é deixar no passado os momentos da vida que já se acabaram. No fechamento de um ciclo seria bom jogar cartas que nos proporcionassem mais tempo (+2 ou +4). Por fim, agradeço ao último presente que a graduação me deu. A turma do UNO! Agradeço a Milton (Jujubão), Sueverton, Lucas, Cassiano, Suel, Katatau e a Carla. Obrigado por cada momento único. Enquanto houver uma carta sempre haverá a amizade. E agora? UNOOO!

“Algumas coisas uma vez que você as amas, tornam-se suas para sempre e se você tentar deixá-las para trás, elas vão dar a volta para você. Elas se tornam parte de quem você é...
Ou elas simplesmente o destroem!”

Allen Ginsberg

RESUMO

Bothrops erythromelas, popularmente conhecida por jararaca-da-seca, é uma serpente endêmica da Caatinga brasileira. O envenenamento causado por ela apresenta um quadro patológico caracterizado por dor local, edema, eritema e equimoses. A ação também induz alterações sistêmicas que resultam em uma coagulopatia de consumo, o qual torna o sangue da vítima incoagulável. O tratamento consiste na administração do antiveneno botrópico, em cujo *pool* não está o veneno de *B. erythromelas*. Mesmo assim, o antiveneno apresenta eficácia para neutralizar os processos fisiopatológicos sistêmicos. Entretanto, exibem reduzida eficácia terapêutica nos danos tissulares no local da picada. Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar a patogênese local e hematológica modulada pelo veneno de *B. erythromelas*, bem como explorar alternativas complementares a antivenômica, que visem a prevenção e o tratamento dos danos causados pela espécie. Para isso, utilizaram-se testes de coagulação (*in vitro*) em modelos experimentais com plasma humano. Após a injeção do veneno intradermicamente do dorso de camundongos *swiss*, foi verificada a resposta hemorrágica. Foram realizados ensaios de indução de edema de pata e hemogramas (*in vivo*) em camundongos. Adicionalmente, tecidos lesionados foram dissecados e submetidos à análise histopatológica. Para os ensaios de neutralização de dano tecidual, foi adotado o teste edema de pata. Para tanto, diferentes concentrações de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) e heparina sódica foram pré-incubadas a 37°C e administradas via intraplantar em camundongos *swiss*. Confirmou-se que o veneno de *B. erythromelas* apresenta um alto potencial coagulotóxico, não sendo possível estimar a dose mínima coagulante. O veneno apresentou uma dose mínima hemorrágica estimada em 3,5 µg, com a hemorragia deflagrada, principalmente, na hipoderme. Quanto ao efeito edematogênico, sua dose mínima foi de 1,75 µg havendo separação dermo-epidérmica. O edema modulado pelo veneno não apresentou resolução em até 12 horas após o envenenamento. Esse efeito foi neutralizado pelo EDTA e pela heparina sódica. O veneno induziu um quadro de leucopenia, caracterizado pela queda de monócitos, neutrófilos e linfócitos. Esse conjunto de dados sugere que o veneno de *B. erythromelas* apresenta um alto potencial coagulante. Durante o estabelecimento da lesão hemorrágica, que foi percebida na hipoderme, o veneno causou alterações na pele de camundongos. Seu efeito edematogênico comprometeu a junção dermo-epidérmica. O EDTA e a heparina sódica se revelaram agentes promissores para serem utilizados na terapia antivenômica, uma vez que inibiram o efeito edematogênico do veneno de *B. erythromelas*.

Palavras-chave: jararaca da seca, fisiopatologia, inflamação, hemorragia, terapia antivenômica.

ABSTRACT

Bothrops erythromelas, popularly known as jararaca-da-seca, is a snake endemic to the Brazilian Caatinga. The poisoning caused by it presents a pathological condition characterized by local pain, edema, erythema and ecchymoses. The action also induces systemic changes that result in consumption coagulopathy, which makes the victim's blood incoagulable. Treatment consists of the administration of the botrópico antiveneno, in whose pool is not the envenoming of *B. erythromelas*. Even so, antivenom is effective in neutralizing systemic pathophysiological processes. However, they exhibit reduced therapeutic efficacy in tissue damage at the site of the bite. Thus, the present study aimed to investigate the local and hematological pathogenesis modulated by *B. erythromelas* venom, as well as to explore complementary alternatives to antivenomics, aiming at the prevention and treatment of the damages caused by the species. For this purpose, coagulation tests (*in vitro*) were used in experimental models with human plasma. After injection of the venom intradermally from the back of swiss mice, the hemorrhagic response was verified. Induction studies of paw edema and hemograms (*in vivo*) were carried out in mice. In addition, injured tissues were dissected and submitted to histopathological analysis. For tissue neutralization tests, the paw edema test was used. To this end, different concentrations of Ethylenediamine Tetra-Acetic Acid (EDTA) and sodium heparin were preincubated at 37 ° C and administered intraplantarly in swiss mice. It was confirmed that *B. erythromelas* venom has a high coagulotoxic potential, and it is not possible to estimate the minimum coagulant dose. The venom presented a minimal hemorrhagic dose estimated at 3.5 µg, with hemorrhage triggered, mainly, in the hypodermis. As for the edematogenic effect, its minimum dose was 1.75 µg with dermo-epidermal separation. Poison modulated edema did not present resolution within 12 hours after poisoning. This effect was neutralized by EDTA and sodium heparin. The venom induced a leukopenia characterized by the fall of monocytes, neurophilic and lymphocytes. This data set suggests that *B. erythromelas* venom has a high coagulant potential. During the establishment of the hemorrhagic lesion, which was noticed in the hypodermis, the venom caused changes in the skin of mice. Its edematogenic effect compromised the dermo-epidermal junction. EDTA and sodium heparin proved to be promising agents for use in anti-venom therapy, since they inhibited the edematogenic effect of *B. erythromelas* venom.

Keywords: jararaca da seca, pathophysiology, inflammation, hemorrhage, antivenomic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Referencial teórico

Figura 1 - Mecanismo de danos a membrana celular pela atividade sinérgica das miotoxinas Asp49 e Lys49. Em A, as toxinas ligam-se à membrana da célula muscular, por mecanismos que ainda são desconhecidos. Cada tipo de toxina por si só tem a capacidade de induzir citotoxicidade *in vitro* ou mionecrose *in vivo* através de danos na membrana. A ligação de miotoxinas Asp49 a membrana gera uma desestabilização na estrutura supramencionada através da hidrólise enzimática dos fosfolipídios (PL) e consequente produção de liso-PL e ácidos graxos (FA). Por outro lado, as miotoxinas Lys49 exercem um mecanismo de permeabilização direta via sua região C-terminal (B). Atuando em associação, os FA gerados pela ação da miotoxina Asp49 geram novos sítios aniônicos (esferas vermelhas) facilitando a ligação da miotoxina Lys49 pelo intermédio de interações eletrostáticas (C). Devido à hidrólise da PL, a membrana torna-se mais instável. Ocorre ainda o acúmulo dos produtos da reação das miotoxinas (lysoPL e FA). Como resultado dessas ações combinadas das miotoxinas Asp49 e Lys49, os danos na membrana são aumentados e a célula torna-se irreversivelmente danificada (D)..... 34

Figura 2 – Classificação das snake venom metaloproteases. SVMPs PI são as mais simples apresentando apenas um domínio de metaloprotease (M) na sua forma madura. SVMP P-II contêm um domínio M seguido por um outro domínio desintegrina (D). Na maioria dos casos, estas sofrem uma proteólise produzindo desintegrinas não enzimáticas que possuem uma forte atividade inibidora da agregação plaquetária. Os SVMP P-III contêm os domínios M, D e ricos em cisteína (C) de desintegrina (R). Os SVMP P-III são ainda divididos em subclasses com base em suas distintas modificações pós-tradução. Fonte: Takeda, 2016..... 36

Figura 3 - Estrutura geral de um típico SVTLE (ID DO PDB: 4E7N). (A) Representação dos desenhos animados. Os resíduos do site ativo são representados como bastões verdes. A N-acetilglucose amina (NAG) e as pontes dissulfureto são representadas por bastões amarelos. As alças que circundam a cavidade do sítio ativo também são indicadas (B). Os resíduos envolvidos na catálise (tríade catalítica) são destacados..... 39

Figura 4 – Representação esquemática da reação catalisada por uma L-aminoácido oxidases. Durante a semi-reação de redução, o substrato de aminoácidos é oxidado a um aminoácido, com uma redução concomitante do cofactor FAD. O iminoácido passa então por hidrólise não enzimática, produzindo α -cetoácido e amônia. Outra meia reação de oxidação completa o ciclo catalítico, reoxidando FADH₂ na presença de oxigênio molecular e, assim, gerando peróxido de hidrogênio. Fonte: Izidoro et al., 2014..... 40

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura de uma L-aminoácido oxidase. (A) Representação dos três domínios da estrutura: coloração magenta representa o domínio de ligação FAD, ciano representa o domínio de ligação do substrato e o verde representa o domínio helicoidal. (B) Representação superficial acessível da estrutura: a entrada de aminoácidos e os pontos de entrada de oxigênio são marcados com setas e o sítio ativo circundado. Fonte: Kang et al., 2011..... 41

Figura 6 - Representação da estrutura cristal da B₂JcuL e do local de ligação de carboidrato. A) A estrutura dscamérica B₂JcuL esquematizada a partir de sua vizualização do eixo quántuplo com cinco monômeros (A a E), no espectro azul e cinco monômeros no fundo (A' a E'), no espectro verde que estão representadas como fita mais 50% de superfície transparente. Os íons cálcio e sódio estão representados por esferas, respectivamente nas cores preta e vermelha. B) Estrutura decamerica da B₂JcuL, interface interpentmero representada como 80% superfície transparente. Lectinas apresentam um sítio de ligação de carboidratos, na estrutura apresentada da B₂JcuL esse sítio está representado em azul claro e a estrutura de RSL em cinza claro. O laço dissulfeto entre os monómeros A e E '(Cys86-Cys86) estão esquematizados como um bastão na cor laranja. Os íons cálcio e sódio estão representados por esferas, respectivamente nas cores preta e vermelha. C) Pentâmeros individuais formados pelos monômeros A-E e A'-E' esquematizados como fita em azul e verde, respectivamente. Sítio de ligação ao Na⁺ da estrutura B₂JcuL está representado em azul claro e a estrutura RSL em cinza claro. Átomos de oxigênio e nitrogênio de ambas as estruturas estão representados nas cores vermelho e azul escuro, respectivamente. O íon sódio está representado como esfera vermelha. Vetores mostrando o sentido de rotação de monómeros B₂JcuL quando comparados com a estrutura de RSL são representados como setas cor de rosa. Fonte: Sartim et al., 2017... 42

Capítulo II: *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Serpentes: Viperidae): Veneno e envenenamento

Figura 1 - Alinhamento sequencial do subdomínio desintegrina (Da) da berythactivase em comparação com a jararagina. Destacado em amarelo resíduos que correspondem a uma região homóloga ao loop RGD das desintegrinas clássicas. As alterações de resíduos que estão acessíveis para a ligação MAJar 3 estão sublinhadas. Reproduzido de Moura-da-Silva et al., (2008). Copyright, 2008, Elsevier..... 65

Figura 2 - Estruturas terciária da berythactivase. (A) Estrutura da bertractivase representada pela superfície acessível ao solvente. O anticorpo MAJar 3 não reconhece o subdomínio Da. Imagens em A: MP, domínio de metaloprotease (vermelho); Ds (roxo), Da (ciano) e Cw (azul escuro) são subdomínios correspondentes a Takeda et al., (2006); Domínio rico em cisteína rico em Cys (branco). (E) Superposição do subdomínio Da da bertractivase (branco). Visualização da superfície acessível do subdomínio Da (vista externa, domínio MP atrás). (B) Superposição do subdomínio Da jararagina (preto) e bertractivase (branco). Visualização da superfície acessível do subdomínio Da (vista lateral, domínio MP acima). Em (B) as superfícies correspondentes às mudanças de resíduos que são acessíveis para a ligação MAJar 3 (resíduos sublinhados em (A)) são representadas. Um conjunto de alterações relevantes pôde ser encontrado, e os resíduos correspondentes foram coloridos conforme indicado nas legendas abaixo das imagens. (C) Representação da superfície do subdomínio Da da bertractivase. (C): os potenciais eletrostáticos negativos são representados em potenciais eletrostáticos vermelho e positivo em azul. Reproduzido de Moura-da-Silva et al., (2008). Copyright, 2009, Elsevier. 65

Figura 3 - Ação do veneno de *Bothrops erythromelas* na progressão do ciclo celular de células de câncer cervical da linhagem SiHa. As células na fase G1 durante a exposição ao veneno que entram no estágio subsequente são interrompidas e entram em apoptose, não havendo progressão de células nas fases G2 / M e S. O veneno causa inibição na função mitocondrial, levando a redução do potencial de membrana mitocondrial das células SiHa através da despolarização, induzindo conseqüentemente a morte celular por apoptose através da via mitocondrial. O processo inicia-se com alterações fisiológicas mitocondriais

que leva à liberação do citocromo C para o espaço citosólico. Após liberado no citosol, as moléculas do citocromo C associam-se com proteínas citoplasmáticas, às Apaf-1, formando uma estrutura conhecido por apoptossomo. O apoptossomo, conhecido também como a roda da morte, procede então para realizar a conversão de uma enzima inativa para sua forma ativa, a procaspase 9. Quando convertida de procaspase 9 para caspase 9 pelo apoptossomo, a caspase 9 cliva a procaspase 3 iniciando uma cascata de conversão de procaspases para caspases. Uma vez ativa, as caspases atuam sobre os substratos de morte levando a formação de corpos apoptóticos. Além da liberação do citocromo C, a mitocôndria libera ainda um grupo de proteínas, às Smac/DIABLO que inativam um segundo grupo de proteínas que atuam inibindo a atividade das caspases, às proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). Fonte: Bernardes-Oliveira et al., 2016. Weinberg, 2013. Ilustração: Joeliton Cavalcante, 2019. 69

Capítulo III: Efeitos coagulante, locais e hematológicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae)

Figura 1 - Avaliação da atividade coagulante do veneno de *Bothrops erythromelas* em função da dose/tempo- resposta..... 94

Figura 2 - Avaliação da dose-resposta para atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops erythromelas*: Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH). 95

Figura 3 - Análise macroscópica e microscópica da lesão hemorrágica induzida pelo veneno da de *Bothrops erythromelas*. O veneno de *Bothrops erythromelas* foi injetado via intradérmica no dorso em camundongos *swiss* após a região ser tricomicizada. O desenvolvimento da lesão hemorrágica da face interna foi acompanhado por 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção (Figuras B, C, D e E, respectivamente) 96

Figura 4 - Avaliação da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops erythromelas*: (A) Perfil temporal da resposta edematogênica induzida por diferentes doses do veneno de *Bothrops erythromelas*. (B) Manifestações hemorrágicas modulada pelo veneno de *Bothrops erythromelas* durante o ensaio da atividade edematogênica. Fotos: Originais de Joeliton Cavalcante, 2018. 98

Figura 5 - Avaliação da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops erythromelas*: Determinação da dose mínima edematogênica. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001..... 99

Figura 6 – Análise histopatológica dos microambientes tissualeres da pata de camundongos *swiss* afetados com a injeção do controle (A) e 1,25 (B), 2,5 (C) e 5,0 µg (D) de veneno de *Bothrops erythromelas*. Setas pretas indicam a separação dérmico-epidérmica, exceto no controle, no qual a seta indica a junção supramencionada sem alterações. Setas cinzas indicam a presença de hemorragia (células inflamatórias e eritrócitos extravasados) na derme e hipoderme... 101

Figura 7 - Avaliação da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops erythromelas*: Análise microscópica quantitativa da separação dermo-epidérmica induzida nas patas de camundongos *swiss*. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 pontos distintos da separação dermo-epidérmica. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001..... 102

Figura 8 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos dos eritrócitos totais (RBC) circulantes, níveis de hemoglobina (HGB) e hematócrito (HCT). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001. 103

Figura 9 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos de plaquetas totais circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001. 103

Figura 10 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos de leucócitos totais circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001. 104

Figura 11 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de neutrófilos circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001.105

Figura 12 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de monócitos circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001.105

Figura 13 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos totais circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001..... 106

Figura 14 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos e relativos de linfócitos típicos (A e B) e atípicos (C e D) circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001..... 107

Figura 15 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de eosinófilos circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001.107

Figura 16 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de basófilos circulantes. Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. *p<0.1; **p<0.01; ***p<0.001 e ****p<0.0001.108

Capítulo IV: Alternativas perspectivas para o tratamento do dano tecidual modulado pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae)

Figura 1 - Avaliação da atividade edematogênica modulada pelo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. Ns $p>0,5$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o *software* GraphPad Prism versão 7.00. 135

Figura 2 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de atividade edematogênica modulada pelo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Cortes histológicos da pata de camundongo swiss injetada com (A) PBS e EDTA (B) 10 mM, (C) 5.0 mM, (D) 2.5 mM e (E) 1.0 mM. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica sem alterações. 136

Figura 3 - Avaliação da atividade edematogênica modulada pela Heparina Sódica (Hemofol®). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. Ns $p>0,5$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o *software* GraphPad Prism versão 7.00. 137

Figura 4 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de atividade edematogênica modulada pela Heparina Sódica (Hemofol®). Cortes histológicos da pata de camundongos *swiss* injetada com (A) PBS e Heparina (B) 50 UI, (C) 25 UI e (D) 10 UI. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica sem alterações. 138

Figura 5 - Avaliação do potencial edematogênico modulado pelo veneno da serpente *Bothrops erythromelas* frente ao inibidor Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p<0.1$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ e **** $p<0.0001$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o *software* GraphPad Prism versão 7.00. 139

Figura 6 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de neutralização da atividade edematogênica modulada pelo veneno de *Bothrops erythromelas* utilizando o Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Cortes histológicos da pata de camundongos *swiss* injetada com (A) veneno de *B. erythromelas* diluído em PBS e veneno incubado com (B) 10 mM, (C) 5.0 mM, (D) 2.5 mM e (E) 1.0 mM de EDTA. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica..... 140

Figura 7 - Avaliação do potencial edematogênico modulado pelo veneno da serpente *Bothrops erythromelas* frente ao inibidor Heparina Sódica (Hemofol®). Os valores representam a média ± erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o software GraphPad Prism versão 7.00. 141

Figura 8 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de neutralização da atividade edematogênica modulada pelo veneno de *Bothrops erythromelas* utilizando a Heparina Sódica (Hemofol®). Cortes histológicos da pata de camundongos *swiss* injetada com (A) veneno de *Bothrops erythromelas* diluído em PBS e veneno incubado com Heparina (B) 50 UI, (C) 25 UI e (D) 10 UI. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica..... 142

LISTA GERAL DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácidos
Ach	Acetilcolina
ADAMs	Desintegrina Metaloproteases
Berytractivase	Do inglês <i>Bothrops erythromelas prothrombin activase</i>
BPP	Peptídeos Potencializadores da Bradicinina
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
D49	Asparato na posição 49 da cadeia
Da	Dálon
DMC	Dose Mínima Coagulante
DME	Dose Mínima Edematogênica
DMH	Dose Mínima Hemorrágica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
F II	Fator II da coagulação
F IX	Fator IX da coagulação
F VII	Fator VII da coagulação
F VIII	Fator VIII da coagulação
F X	Fator X da coagulação
F XII	Fator XII da coagulação
F XIII	Fator XIII da coagulação
g	Gramas
GPIb	Glicoproteína Ib
Hb	Hemoglobina
HUVECs	Do inglês <i>Human Umbilical Endothelial Cells</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IFN	Interféron N
IL-6	Interleucina 6
K49	Lisina na posição 49 da cadeia
kDa	Kilodálon
LAAOs	L-amino-oxidases
MDCK	Do inglês <i>Madin-Darby Canine Kidney</i>

Min	Minuto
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteases de Matriz
Mthb	Metahemoglobinemia
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de base
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PGI ₂	Prostaglandina I(2)
pI	Ponto Isoelétrico
PIB	Prouto Interno Bruto
PLA ₂	Do inglês <i>Phospholipase A₂</i>
Pmáx	Pico máximo
RBC	Do inglês <i>Red Blod Cells</i>
Rpm	Rotação por minuto
S49	Serina na posição 49 da cadeia
SVMP P-I	<i>Snake Venom Metaloproteases</i> de Classe I
SVMP P-II	<i>Snake Venom Metaloproteases</i> de Classe II
SVMP P-III	<i>Snake Venom Metaloproteases</i> de Classe III
SVMPs	Do inglês <i>Snake Venom Metalloproteases</i>
SVSPs	Do inglês <i>Snake Venom Serinoproteases</i>
SvVEGFs	Do inglês <i>Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor</i>
TL-SVSPs	<i>Snake Venom Serinoproteases de trombina</i>
Vwf	Fator de VonWillebrand
WBC	Do inglês <i>White Blod Cells</i>
Zn ²⁺	Íons zinco

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	24
Referências	28
CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
1.0 Venenos e serpentes: Um coquetel químico perfeito.....	32
1.1 Composição química do veneno de <i>Bothrops</i> (Viperidae)	33
1.1.1 Fosfolipases A ₂ (PLA ₂)	33
1.1.2 Metaloproteases (SVMPs)	35
1.1.3 Desintegrinas: Polipeptídeos Ricos em Cisteína	37
1.1.4 Serinoproteases (SVSPs)	38
1.1.5 L-aminoácido oxidases (LAAOs)	39
1.1.6 Lectinas.....	41
1.1.7 Fatores de Crescimento Endotéliais (VEGFs)	43
1.1.8 Peptídeos Potencializadores da Bradicinina (BPP)	43
2.0 Acidentes botrópicos: Aspectos epidemiológicos	44
3.0 Fisiopatologia do envenenamento botrópico.....	45
Referências	49
CAPÍTULO II: <i>Bothrops erythromelas</i> (Amaral, 1923) (Serpentes: Viperidae): Veneno e envenenamento.....	57
Resumo	59
1 Introdução	60
2.0 Veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>: Composição molecular e variação intraespecífica	61
2.1 Fosfolipase A ₂ ácida Asp49 (D49) do veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>	64
2.2 Berytractivase	64
2.3 <i>Snake Venom Vascular Endothelial Factor</i> (svVEGF) do veneno da serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	66
2.4 Outras toxinas e suas atividades biológicas.....	66
3.0 Atividades do veneno da serpente <i>Bothrops erythromelas</i> sobre diferentes modelos celulares e tecidos.....	67
4.0 Perfil farmacocinético do veneno da serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	69
5.0 Acidentes ofídicos por <i>Bothrops erythromelas</i>: Aspectos epidemiológicos e clínicos ..	70
6.0 Neutralização das atividades do veneno da serpente <i>Bothrops erythromelas</i>.....	72
6.1 Extratos vegetais com potencial neutralizante para o veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> ..	74
6.2 Fatores antibotrópicos encontrados em organismos animais.....	75

6.3 Nanopartículas de quitosana e veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>	75
7.0 Considerações finais	77
Referências	78
CAPÍTULO III: Efeitos locais e hematológicos induzidos pelo veneno da serpente <i>Bothrops erythromelas</i> (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae)	85
Resumo	87
1.0 Introdução	88
2.0 Material e métodos	90
2.1 Veneno	90
2.2 Plasma.....	90
2.3 Animais.....	90
2.4 Atividade coagulante	90
2.5 Determinação da Dose Mínima Hemorrágica	91
2.6 Perfil temporal da atividade hemorrágica.....	91
2.7 Atividade edematogênica: Perfil temporal da atividade e Dose Mínima Edematogênica..	91
2.8 Análise histopatológica.....	92
2.9 Análise hematológica.....	92
2.10 Análise estatística	93
3 Resultados	94
3.1 Atividade coagulante	94
3.2 Dose Mínima Hemorrágica	94
3.3 Alterações morfológicas induzidas pelo veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> na pele de camundongos.....	95
3.4 Atividade edematogênica.....	97
3.5 Análise histopatológica.....	99
3.6 Alterações hematológicas	102
4 Discussão	109
4.1 O veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> apresenta um alto potencial coagotóxico	109
4.2 Potencial hemorrágico do veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>	109
4.3 Efeito inflamatório local: O veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> induz edema, extravasamento de sangue e diapedese.....	113
4.4 Alterações hematológicos durante o desenvolvimento do edema	116
5 Considerações finais	120
Referências	122
CAPÍTULO IV: Perspectivas para o tratamento do dano tecidual modulado pelo veneno de <i>Bothrops erythromelas</i> (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae)	127

Resumo	129
1 Introdução	130
2 Material e métodos	132
2.1 Veneno	132
2.2 Animais	132
2.3 Investigação da atividade edematogênica modulada pelo EDTA e pela Heparina Sódica	132
2.4 Experimento de incubação: Veneno e EDTA ou Heparina Sódica	133
2.5 Biblioteca de tecidos e preparo para análise histopatológica	133
2.6 Análise histopatológica.....	134
3 Resultados.....	135
3.1 Atividade edematogênica modulada pelo EDTA e heparina sódica	135
3.2 Investigação da atividade inibidora do efeito edematogênica do veneno de <i>Bothrops erythomelas</i> pelo EDTA e Heparina Sódica	138
4 Discussão.....	143
5 Considerações finais	146
Referências	147
ANEXO: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA	149

1 APRESENTAÇÃO

Os venenos são substâncias complexas compostas por proteínas, peptídeos e aminoácidos (CALVETE et al., 2017). Em serpentes do gênero *Bothrops*, família Viperidae, apresentam majoritariamente em sua composição metaloproteases dependentes de zinco (SVMPs), fosfolipases A2 (PLA_{2s}) e serinoproteases (SVSPs) (DA COSTA GALIZIO et al., 2018), que em situações de envenenamento humano, deflagram um amplo espectro de manifestações fisiopatológicas (GUTIÉRREZ et al., 2017). Os efeitos podem ser locais, com danos teciduais (GUTIÉRREZ et al., 2018), até sistêmicos, como a desestabilização funcional do sistema de coagulação, por exemplo (SANCHEZ et al., 2017). Porém, em estudos recentes percebe-se que o foco das pesquisas recai nas patologias que conferem o dano tecidual local, tais como bolhas, comprometimento da junção derme-epiderme, degradação de componentes da matriz extracelular (GUTIÉRREZ et al., 2018), dano ao sistema de vasos que irrigam os tecidos locais e, por fim, degradação e necrose do tecido muscular (SEO et al., 2017; HERRERA et al., 2018).

O edema é um dos primeiros efeitos deflagrados pelo veneno e é característico do envenenamento botrópico (MAGALHÃES et al., 2017). Várias toxinas podem ser responsáveis pelo efeito edematogênico, dentre elas as PLA₂ Asp 49 ou Lys 49 e SVMPs, que induzem, ou não, manifestações hemorrágicas que atuam em sinergia (MORA-OBANO et al., 2014). Ao agirem de forma expedita no tecido conjuntivo e muscular, induzem a liberação de vários mediadores inflamatórios endógenos, que culmina no decréscimo da eficácia da terapia convencional - com antivenenos -, que preza pelo controle dessas reações inflamatórias (FÉLIX-SILVA et al., 2017; RUCAVADO et al., 2016).

A ação dos venenos botrópicos resulta em sequelas permanentes em decorrência do dano tecidual que apresenta uma patologia diversificada e complexa (VALLE et al., 2018). Em parte, essas manifestações são causadas por mediadores inflamatórios e padrões moleculares associados a dano (DAMPS) formados a partir da proteólise pela ação de SVMPs e ativação endógena de proteinases pela lise celular. Em consequência, há a liberação do conteúdo proteico citoplasmático modulada pela ação citotóxica de PLA_{2s} dos venenos (RUCAVADO et al., 2016).

A formação de bolhas e do dano epitelial são achados comuns nos pacientes acometidos (MAGALHÃES et al., 2017; VALLE et al., 2018). Esse efeito é resultante da

ação de SVMPs de classe P-I, desprovidas de efeito hemorrágico, mas que experimentalmente induzem a separação das camadas da pele (derme-epiderme) (GUTIÉRREZ et al., 2016).

Além de alterações entre as junções das camadas de tecidos que formam a pele, SVMPs e hialuronidases, presentes nos venenos, causam alterações difundidas pela matriz extracelular devido a ação catalítica direta sobre as proteínas estruturais (GUTIÉRREZ et al., 2016). Através da aplicação proteômica, investigações de tecidos lesionados e seus exsudatos têm evidenciado a presença de fragmentos de muitas das proteínas constituintes da matriz que atuam em inúmeras funções, tais como as proteínas que conferem a arquitetura do tecido e organização espacial de suas células (ESCALANTE et al., 2011; HERRERA et al., 2015). As inúmeras clivagens proteicas que ocorrem culminam na produção de moléculas bioativas envolvidas na angiogênese, fibrogênese e quimiotaxia (GUTIÉRREZ et al., 2018).

Artérias, veias e vasos do sistema linfático também são reportados como alvos de toxinas. Sofrem alterações as junções de células endoteliais e células musculares lisas de arteríolas e veias (HERRERA et al., 2016). As SVMPs comprometem a integridade da microvasculatura pela hidrólise de componentes da membrana basal do endotélio e de outros componentes da matriz extracelular, o que leva a um estado de fragilidade da estabilidade mecânica dos capilares (ESCALANTE et al., 2011).

Os procedimentos terapêuticos, em casos de envenenamento por serpentes, constituem na administração de antivenenos. Um antiveneno é um produto que apresenta em sua composição anticorpos, ou fragmentos desses, que atua sobre as toxinas ativas que estão em circulação no plasma da vítima (GUTIÉRREZ, 2019). É produzido a partir da imunização de modelos animais (equinos no Brasil) com *pools* de venenos de determinadas espécies. Para a sua validação, é submetido a uma bateria de ensaios pré-clínicos para a avaliação da dose efetiva que neutralize os mais diversos efeitos tóxicos induzidos pelos venenos, dentre eles, os danos locais, como a miotoxicidade, e o efeito edematogênico (GUTIÉRREZ et al., 2017).

Em oposição a sua eficácia em neutralizar os processos fisiopatológicos sistêmicos, os antivenenos apresentam baixa eficácia terapêutica nos danos tissulares no local da picada (FÉLIX-SILVA et al., 2017). Diante do contexto emergencial do desenvolvimento do dano tissular e do atraso da vítima até a chegada ao centro de saúde com soroterapia

disponível, a clínica do paciente fica comprometida, e sequelas temporárias e/ou permanentes se desenvolvem (CHIPPAUX, 2017).

Atualmente, diversos estudos investigam possíveis candidatos terapêuticos, com diversos princípios ativos, a fim de suprir a deficiência apresentada pelos soros. Entretanto, os trabalhos muitas vezes se resumem a dados morfométricos, e mais raramente, apresentam algum tipo de análise histológica (FÉLIX-SILVA et al., 2017; SACHETTO et al., 2018). Dessa forma, os mecanismos de atuação de novas drogas antivenômicas permanecem não elucidados, o que se deve a complexidade de estudos que revelem a composição de novos produtos naturais. Os trabalhos se desenvolvem de forma lenta e muitas vezes são invalidados por essas novas substâncias. Essas, ao mesmo tempo que exibem um potencial antiofídico relevante, apresentam, também, elevadas taxas de toxicidade e necessitam de inúmeros ensaios que levam tempo e demandam recursos econômicos.

A falta de investigações mais específicas se torna ainda mais contundente quando se avalia a ausência de informações disponíveis sobre a patogênese das alterações induzidas pelo veneno de serpentes na pele, em detrimento da sua relevância clínica. Outrossim, são indiscutíveis a magnitude de investigações da patogênese local e hematológica modulada por venenos e a urgência do desenvolvimento de tratamentos alternativos/complementares a antivenômica, que visem a prevenção e o tratamento desses danos.

Referências

CALVETE, J. J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 5, p. 611-634, 2017.

CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 38, 2017.

DA COSTA GALIZIO, N.; Serino-Silva, C., Stuginski D.R., Abreu, P.A.E., Sant'Anna, S.S., Grego, K.F.; Tashima, A.K.; Tanaka-Azevedo, A.M.; Morais-Zani, K. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. **Journal of proteomics**, v. 186, p. 56-70, 2018.

ESCALANTE, T.; ORTIZ, N.; RUCAVADO, A.; SANCHEZ, E. F.; RICHARDSON, M.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. **PLoS one**, v. 6, n. 12, p. e28017, 2011.

FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J.A.; XAVIER-SANTOS, J.B.; PASSOS, J.G.; SILVAJUNIOR, A.A.; TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v.125, p. 74-83, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. Global Availability of Antivenoms: The Relevance of Public Manufacturing Laboratories. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 5, 2019.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J.J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17063, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; HERRERA, C.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; FOX, J. W. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. **Toxicon**, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; VILALLTA, M.; SÁNCHEZ, A.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; CALVETE, J.J. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 163, 2017.

GUTIÉRREZ, J.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; HERRERA, C.; FOX, J. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 304, 2016.

HERRERA, C.; BOLTON, F.; ARIAS, A. S.; HARRISON, R. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Analgesic effect of morphine and tramadol in standard toxicity assays in mice injected with venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 154, p. 35-41, 2018.

HERRERA, C.; ESCALANTE, T.; VOISIN, M.B.; RUCAVADO, A.; MORAZÁN, D.; MACÊDO, J.K.; CALVETE, J.M.; SANZ, L.; NOURSHARGH, S.; GUTIÉRREZ, J.M. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003731, 2015.

HERRERA, C.; VOISIN, M. B.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; NOURSHARGH, S.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of PI and PIII Snake Venom Haemorrhagic Metalloproteinases on the Microvasculature: A Confocal Microscopy Study on the Mouse Cremaster Muscle. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168643, 2016.

MAGALHÃES, H. I.; DE ALMEIDA, A. L. M. C.; DA SILVA, G. R.; RABELO, J. I. D. L. B.; DA SILVA, P. M. G.; LACERDA, N. P. Relato de acidente botrópico que resultou em amputação. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017

MORA-OBANDO, D.; FERNANDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109846, 2014.

RUCAVADO, A.; NICOLAU, C.; ESCALANTE, T.; KIM, J.; HERRERA, C.; GUTIÉRREZ, J.; FOX, J. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 349, 2016.

SACHETTO, A. T. A.; ROSA, J. G.; SANTORO, M. L. Rutin (quercetin-3-rutinoside) modulates the hemostatic disturbances and redox imbalance induced by *Bothrops jararaca* snake venom in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006774, 2018.

SANCHEZ, E.; FLORES-ORTIZ, R.; ALVARENGA, V.; EBLE, J. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. **Toxins**, v. 9, n. 12, p. 392, 2017.

SEO, T.; SAKON, T.; NAKAZAWA, S.; NISHIOKA, A.; WATANABE, K.; MATSUMOTO, K.; AKASAKA, M.; SHIOI, N. SAWADA, H.; ARAKI, S. Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell-cell adhesions in vitro and induces haemorrhage *in vivo*. **The FEBS journal**, v. 284, n. 11, p. 1657-1671, 2017.

VALLE, L. A.; SILVA, D. D. F. R.; MAGALHÃES, P. H.; MATTOS, P. A.; LEAL, J. A. Amputação bilateral de extremidades inferiores após acidente botrópico grave: relato de um caso. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 81-84, 2018.

1.0 Venenos de serpentes: Um coquetel químico perfeito

Novas adaptações devem se originar e ser funcionais dentro de um genoma já estabelecido, permitindo, portanto, que percursos evolutivos anteriormente inacessíveis se tornam dependentes da história particular da população em que surgiram (MCGLOTHLIN et al., 2016). Acredita-se que o mecanismo primário para a evolução do veneno envolve a duplicação gênica que codificam proteínas com papéis endofisiológicos, seguido pelo recrutamento do gene duplicado para a glândula de veneno. Na glândula de veneno, o gene é seletivamente expresso e neofuncionalizado em direção à toxicidade por seleção natural para características tróficas adaptativas (CALVETE et al., 2017).

Os venenos de serpentes são um sistema complexo e multifuncional de proteínas exofisiológicas e peptídeos farmacologicamente ativos que evoluíram de proteínas com funções endofisiológicas (CASEWELL et al., 2013). Exibem efeitos potentes, letais e debilitantes, sendo considerado uma “arma devastadora” que auxilia na captura e morte de presas, sendo esta, a função primária dos venenos, enquanto simultaneamente é disparado o processo de digestão. Adicionalmente, os venenos apresentam uma função secundária, que consiste em ferramentas utilizadas como mecanismo de defesas contra seus predadores (JACKSON et al., 2016).

O veneno apresenta-se como reflexo de sua função. Sua relação entre ecologia alimentar e composição do veneno provavelmente é similarmente complexa, com muitos fatores que modificam a influência um do outro. Quando utilizadas para forrageamento apresentam um alto grau de variação, possibilitando as serpentes peçonhentas alta capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos (JACKSON et al., 2016).

Adicionalmente, a composição do veneno pode sofrer variações inter/intraespecíficas, em função da espécie envolvida (LOMONTE et al., 2016), idade (PLA et al., 2017), sazonalidade e dieta (JACKSON et al., 2016; SOUSA et al., 2018). As variabilidades podem ainda estar ligadas ao sexo (AMORIM et al., 2018), a distribuição geográfica (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016) e a mecanismos de seleção genética (CALVETE, 2017).

1.1 Composição química do veneno de *Bothrops* (Viperidae)

Está bem documentado que múltiplas toxinas em um único veneno podem interagir, facilitando ou potencializando o efeito de outro. Os complexos de toxinas em que várias dessas estão ligadas umas às outras, apresentam componentes que individualmente são tóxicos e às vezes completamente não-tóxicos (CALVETE, 2017).

O gênero *Bothrops*, altamente diversificado, corresponde a um grupo de serpentes de alta significância para saúde pública nas Américas por serem responsáveis pela maioria dos casos de acidentes ofídicos (SINAN, 2019). Os venenos dessas serpentes induzem uma série de manifestações locais e sistêmicas, tais como edema, mionecrose, distúrbios hemostáticos entre outras como resultado da ação de uma gama de toxinas (VALLE et al., 2018).

Ferramentas baseadas na descomplexação de venenos, através de abordagens proteômicas e transcriptômicas (AMAZONAS et al., 2018), tem sido cada vez mais revelado a composição desses venenos, bem como a abundância das famílias de proteínas que o compõem (CALVETE, 2017). Majoritariamente, os venenos botrópicos são compostos por fosfolipases A₂ (PLA₂), *snake venom metalloproteases* (SVMPs), *snake venom serinoproteases* (SVSPs), L-amino oxidases, lectinas do tipo C, peptídeos potencializadores da bradicinina, além de outras frações em menor abundância (TASOULIS; ISBISTER, 2017). Entretanto, os venenos apresentam variações em seu proteoma de forma multifatorial, o que os torna altamente complexos (CALVETE, 2017; SOUSA et al., 2018).

1.1.1 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As PLA₂ encontradas no veneno de serpentes são uma superfamília de enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação 2-acil éster de glicerofosfolipídios e lisofosfolipídios de membranas celulares, originando produtos metabólicos, como o ácido araquidônico (OJEDA et al., 2018). Os produtos secundários da hidrólise de fosfolipídios consistem em precursores de diversas moléculas que participam em diferentes vias de sinalização celular (JAMI et al., 2018). O ácido araquidônico, por exemplo, pode ser convertido em eicosanóides, incluindo prostaglandinas e leucotrienos, os quais atuam sobre respostas imunes, inflamação e dor (ZAMBELLI et al., 2017).

As PLA₂s são classificadas conforme estrutura apresentada pelo seu sítio ativo: em K49 (possuem uma lisina na posição 49 da cadeia), D49 (quando apresenta na posição 49 um aspartato) e S49 (serina na posição 49), sendo a S49 pouco frequente. Os isotipos K49 e S49 possuem uma cinética de hidrólise de fosfolipídios muito mais lenta que D49, mas apesar dessa diferença, os efeitos tóxicos também são pronunciados (DOLEY; ZHOU; KINI, 2016).

Dois subtipos de PLA₂s que apresentam potencial indutor de mionecrose, miototoxinas, Asp49 e Lys49, coexistem em venenos de serpentes viperídeas. A miotoxicidade desencadeada por essas toxinas consiste na atuação sinérgica entre as miotoxinas Asp49 e Lys49 (Figura 1) que aumentam o influxo de íons Ca²⁺ e, resultam consequentemente em morte celular (MORA-OBANDO et al., 2014).

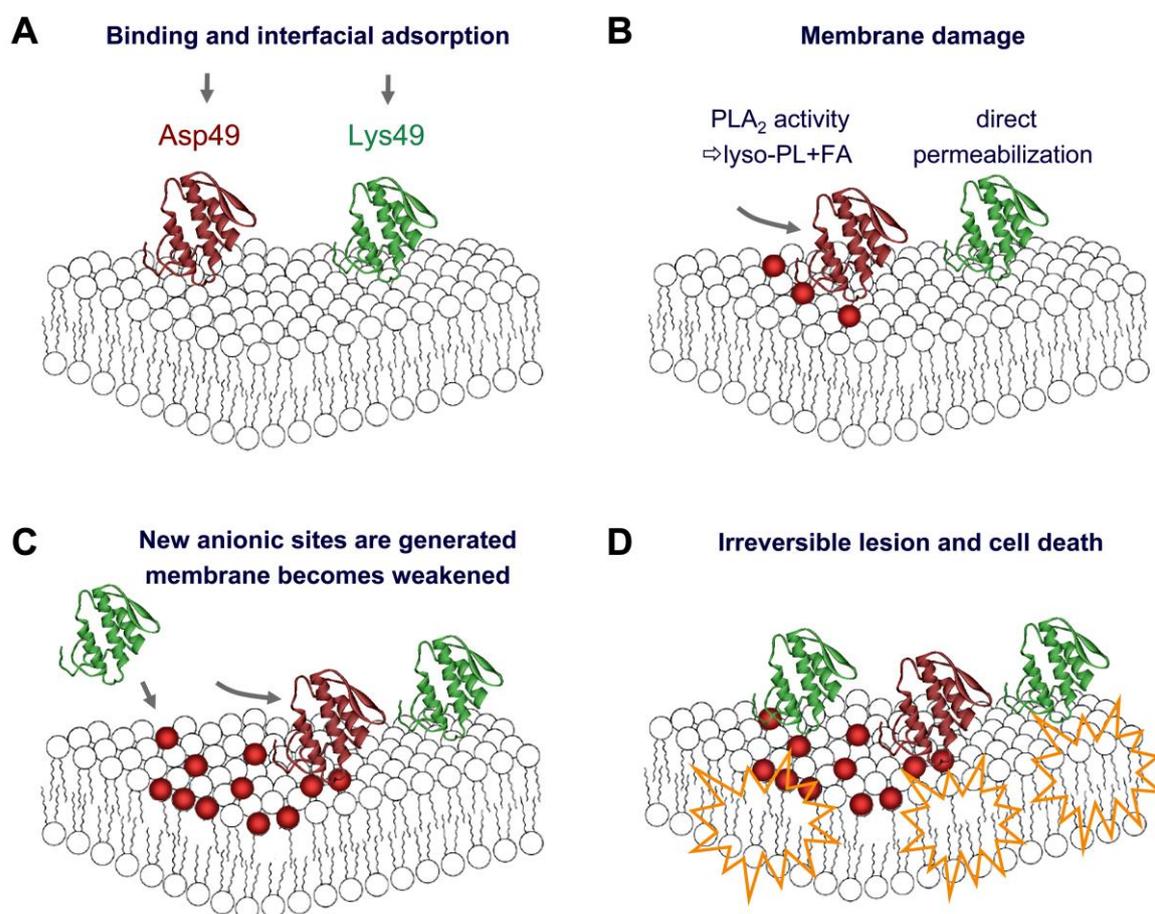


Figura 1 - Mecanismo de danos a membrana celular pela atividade sinérgica das miotoxinas Asp49 e Lys49. Em A, as toxinas ligam-se à membrana da célula muscular, por mecanismos que ainda são desconhecidos. Cada tipo de toxina por si só tem a capacidade de induzir citotoxicidade *in vitro* ou mionecrose *in vivo* através de danos na membrana. A ligação de miotoxinas Asp49 a membrana gera uma desestabilização na estrutura supramencionada através da hidrólise enzimática dos fosfolipídios (PL) e consequente produção de liso-PL e ácidos graxos (FA). Por outro lado, as miotoxinas Lys49 exercem um mecanismo de permeabilização direta via sua região C-terminal (B). Atuando em associação, os FA gerados pela ação da

miotoxina Asp49 geram novos sítios aniônicos (esferas vermelhas) facilitando a ligação da miotoxina Lys49 pelo intermédio de interações eletrostáticas (C). Devido à hidrólise da PL, a membrana torna-se mais instável. Ocorre ainda o acúmulo dos produtos da reação das miotoxinas (lysoPL e FA). Como resultado dessas ações combinadas das miotoxinas Asp49 e Lys49, os danos na membrana são aumentados e a célula torna-se irreversivelmente danificada (D).

A atividade anticoagulante de certas enzimas de PLA₂s é desencadeada a partir de sua interação com proteínas de coagulação sanguínea (KINI, 2006). Apresentando ainda atividade sobre uma variedade de células, especialmente eritrócitos (hemólise) e nas células do músculo esquelético (rabdomiólise), o que contribui largamente para o estresse oxidativo (BARONE; FREZZATTI; SILVEIRA, 2014). Tendo acesso ao sistema circulatório, as PLA₂s causam hemólise, visando a quebra dos lipídeos de membrana de eritrócitos e, conseqüentemente, liberação de hemoglobina (Hb). A Hb livre de células sofre oxidação espontânea, e também reage com o óxido nítrico (NO), um vasodilatador produzido por células de vasos endoteliais, para gerar metahemoglobina (MtHb). MtHb é altamente pró-oxidante na natureza que pode prontamente liberar heme férrico, que atravessa facilmente a membrana celular e aumentar a atividade oxidante de células próximas. Ao longo das linhas de Hb, a mioglobina sofre oxidação e liberta ferro, que pode catalisar a formação de radicais livres. Assim, a ação da PLA₂ promove um gatilho no cenário de estresse oxidativo sistêmico e inflamação (SUNITHA et al., 2015).

1.1.2 Metaloproteases (SVMPs)

As SVMPs compreendem uma subfamília de enzimas que depende de íons metálicos para exercerem suas funções. Compõem uma importante classe de toxinas que está presente no veneno das serpentes, com representação de aproximadamente 32% da composição da peçonha de Viperídeos (KINI; KOH, 2016). Apresentam massa molecular variável, de 20 a 100 kDa, são classificadas em três grupos (PI, PII e P-III) conforme sua organização de domínio (Figura 2) (TAKEDA, 2016).

A forma madura da classe PI é composta apenas do domínio da metaloprotease com o característico sítio de ligação ao zinco, o qual está presente em todas as classes de SVMPs, MMPs (Metaloproteases de Matriz) e alguns ADAMs (Desintegrina Metaloproteases). As SVMP P-II e P-III exibem domínios não catalíticos adicionais, tais como domínios desintegrinas, domínios ricos em desintegrina e domínios ricos em cisteína, semelhantes

aos encontrados em ADAMs, que estão relacionados às propriedades adesivas (SANCHEZ et al., 2017).

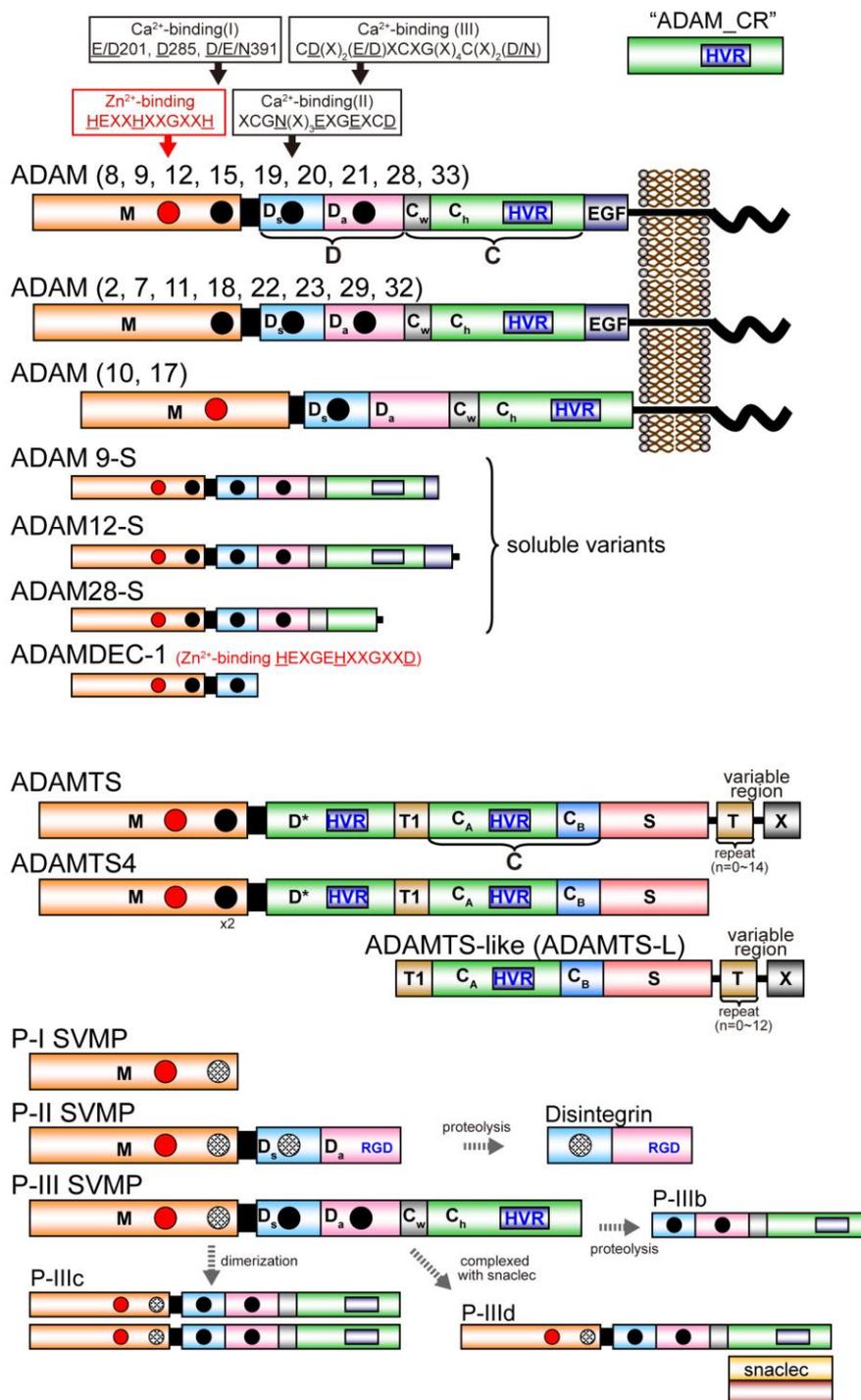


Figura 2 – Classificação das snake venom metalloproteases. SVMPs PI são as mais simples apresentando apenas um domínio de metaloprotease (M) na sua forma madura. SVMP P-II contém um domínio M seguido por um outro domínio desintegrina (D). Na maioria dos casos, estas sofrem uma proteólise produzindo desintegrinas não enzimáticas que possuem uma forte atividade inibidora da agregação plaquetária. Os SVMP P-III contém os domínios M, D e ricos em cisteína (C) de desintegrina (R). Os SVMP P-III são ainda

divididos em subclasses com base em suas distintas modificações pós-tradução. Fonte: Takeda, 2016.

As SVMPs da classe P-III de alto peso molecular são caracterizadas por maior atividade hemorrágica do que a classe PI de SVMPs, que possui apenas um domínio de metaloprotease catalítica. Os SVMPs P-III são capazes de induzir não apenas hemorragias locais, mas também sistêmicas, enquanto as SVMPs PI induzem, principalmente a hemorragia local (TAKEDA, 2016).

Essas toxinas desempenham um papel fundamental nos acidentes ofídicos, uma vez que desencadeiam uma série complexa de efeitos fisiopatológicos locais e sistêmicos. No local da inoculação do veneno, induzem edema, mionecrose, bolhas, dermonecrose, reação inflamatória proeminente e hemorragia, sendo essa última atividade a de maior interesse (GUTIÉRREZ; RUCAVADO; ESCALANTE, 2016; FOX; GUTIÉRREZ, 2017).

A patogênese da hemorragia induzida por veneno envolve dano direto de vasos sanguíneos pelas SVMPs dependentes de Zn^{2+} , que compartilham motivos estruturais e funcionais com outras metaloproteases, como MMPs e ADAMs (FLOREA; KELEMEN; MUNTEAN, 2016). Apesar da sólida evidência experimental que sustenta a hipótese de que a degradação da membrana basal é o passo chave na patogênese dos danos nos microvasos, uma visão alternativa emergiu recentemente. Ela se baseia na observação de que uma SVMP hemorrágica cliva os receptores relacionados à lipoproteína de baixa densidade 5 e 6 (LRP5 / 6) em células endoteliais e, causa uma realocação de VE-caderina e γ -catenina, com a consequente abertura das junções intercelulares e extravasamento (SEO et al., 2017).

SVMPs também interagem com proteínas contendo domínios vWF-A1, através do seu domínio rico em Cys. Isso sugere um mecanismo adicional pelo qual os SVMPs interferem na adesão plaquetária, com consequente manifestações hemorrágicas. As SVMPs P-II e P-III apresentam atividade inibitória da agregação plaquetária induzida por clivagem do colágeno. Em adição, essas interferem a ativação de plaquetas dependentes de vWF por ligação e/ou hidrólise dos receptores vWF e GPIb (SAJEVIC et al., 2011).

1.1.3 Desintegrinas: Polipeptídios Ricos em Cisteína

As desintegrinas correspondem a uma família de pequenos polipeptídeos ricos em cisteína (quarenta a cem aminoácidos), que apresentam um baixo peso molecular (5 a 9

kDa). Estruturalmente, as desintegrinas estão classificadas em cinco grupos diferentes, conforme o comprimento e o número de ligações dissulfeto dos polipeptídeos (CALVETE et al., 2005).

O primeiro grupo inclui desintegrinas curtas compostas de 41 a 51 resíduos e quatro ligações dissulfeto. O segundo grupo é formado por desintegrinas de tamanho médio, que contêm cerca de 70 aminoácidos e seis ligações de cisteína. O terceiro grupo inclui desintegrinas longas, com um polipeptídeo de aproximadamente 84 resíduos reticulados por sete pontes dissulfeto. O quarto grupo é composto por homo e heterodímeros. As desintegrinas diméricas contêm subunidades de cerca de 67 resíduos com dez cisteínas envolvidas na formação de quatro dissulfetos intra-cadeias e duas ligações de cisteína entre cadeias (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2016).

As desintegrinas são ricas em pontes dissulfeto, derivadas de venenos de serpentes que contêm uma sequência formada por arginina, glicina e ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), que caracteriza seu sítio ativo. Esse sítio interage com as integrinas na superfície da célula e, bloqueia a ligação de fibrinogênio e complexos do fator de VonWillebrand (FvW) (GPII/IIIa) que são mediadores da agregação plaquetária (MATSUI; HAMAKO; TITANI, 2010). As desintegrinas-like ou desintegrinas-símile constituem uma classe de toxinas de peptídeos de baixo peso molecular, encontradas no veneno de forma livre e associadas a metaloproteases, que compõem assim o domínio desintegrina (CALVETE, 2013).

1.1.4. Serinoproteases (SVSPs)

As SVSPs, com uma diversidade de funções biológicas, compreendem um grupo de enzimas que catalisa uma ampla gama de reações que envolvem a cascata de coagulação, os sistemas de kallikreína-kinina, fibrinolítico e complemento, células endoteliais e plaquetas sanguíneas. Apresentam um sítio catalítico comum composto pelos resíduos de aminoácido serina, histidina e ácido aspártico reativo (Figura 3 b) (PHILLIPS; SWENSON; MARKLAND, 2016).

Apesar de um alto grau de identidade de sequência mútua, a especificidade do substrato entre as SVSPs difere consideravelmente. Um subgrupo de SVSPs, SVSP de trombina (TL-SVSPs), contém proteinases funcionalmente relacionadas à trombina. Essas apresentam ação fibrinogenolítica sobre uma das cadeias do fibrinogênio, que resultam em uma forma frouxa (ou solúvel) de fibrina. Essas também enzimas induzem a formação

de coágulos instáveis, por não serem capazes de ativar o fator XIII da coagulação, responsável pelas ligações cruzadas entre os polímeros de fibrina (ULLAH et al., 2018).

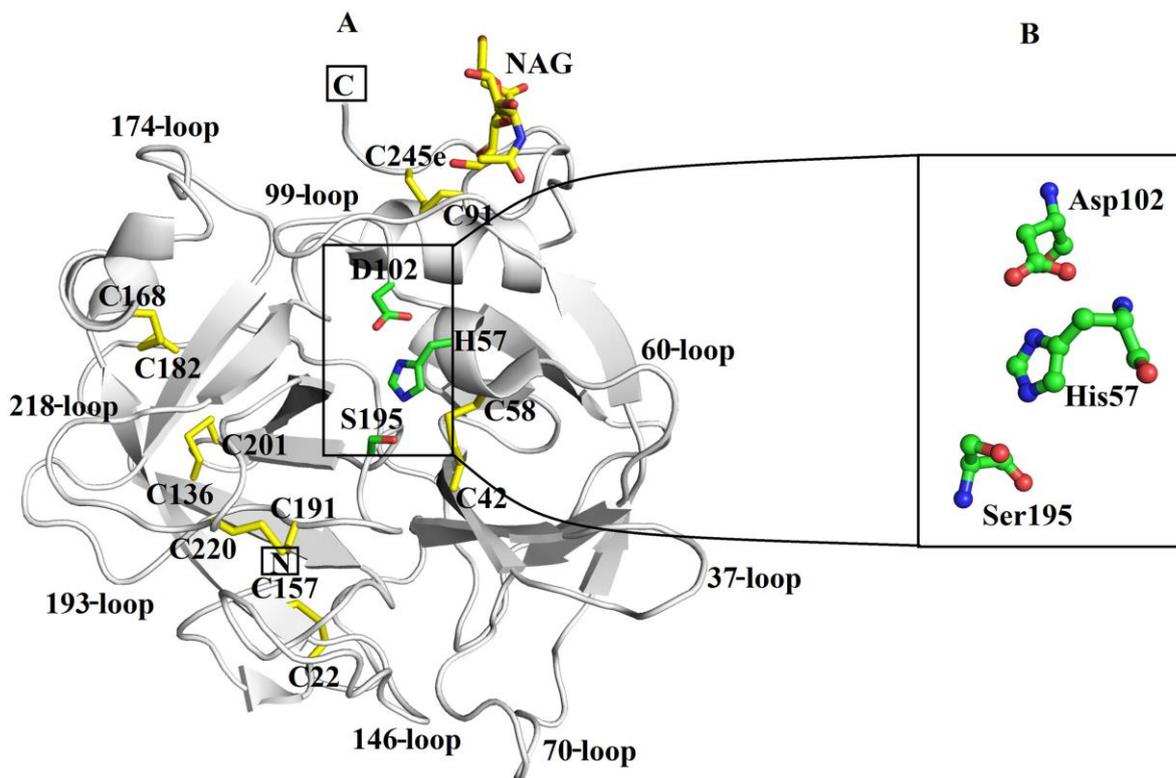


Figura 3 - Estrutura geral de um típico SVTLE (ID DO PDB: 4E7N). (A) Representação dos desenhos animados. Os resíduos do site ativo são representados como bastões verdes. A N-acetilglucose amina (NAG) e as pontes dissulfureto são representadas por bastões amarelos. As alças que circundam a cavidade do sítio ativo também são indicadas (B). Os resíduos envolvidos na catálise (tríade catalítica) são destacados.

1.1.5 L-aminoácido oxidases (LAAOs)

As LAAOs são flavoenzimas pertencentes à classe de oxidoreductases que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos (IZIDORO et al., 2014). Apresentam em sua composição três domínios: o primeiro domínio é de ligação ao FAD, o segundo de ligação ao substrato e o último, um domínio helicoidal (Figura 4). O domínio de ligação do FAD é responsável pela ligação das porções de adenina, ribose e pirofosfato do cofator de nucleotídeo (COSTA et al., 2014).

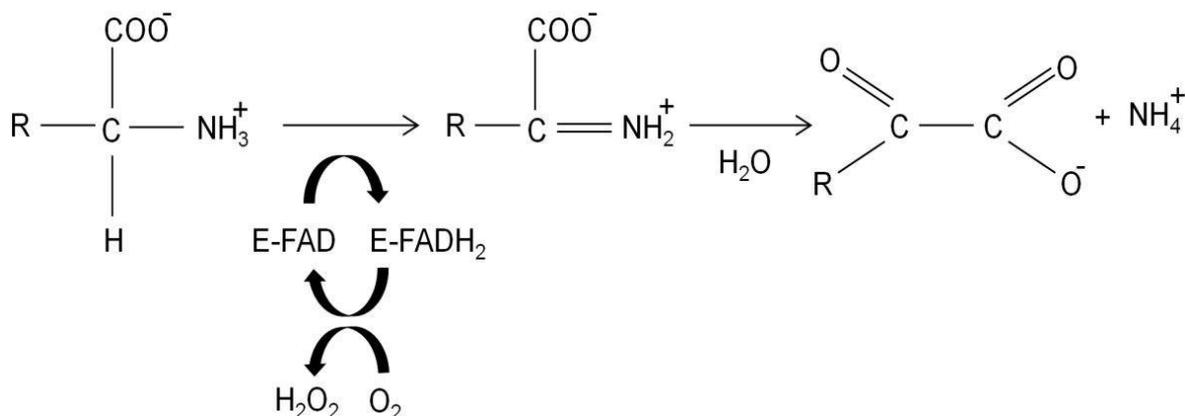


Figura 4 – Representação esquemática da reação catalisada por uma L-aminoácido oxidases. Durante a semi-reação de redução, o substrato de aminoácidos é oxidado a um aminoácido, com uma redução concomitante do cofator FAD. O iminoácido passa então por hidrólise não enzimática, produzindo α -cetoácido e amônia. Outra meia reação de oxidação completa o ciclo catalítico, reoxidando FADH₂ na presença de oxigênio molecular e, assim, gerando peróxido de hidrogênio. Fonte: Izidoro et al., 2014.

O mecanismo de ação da LAAO na toxicidade da peçonha ofídica ainda é desconhecido. Entretanto, especula-se que o peróxido de hidrogênio, resultante da sua reação oxidativa, esteja relacionado à essa toxicidade (FUNG; LEE, TAN, 2015). Estudos indicam que as LAAOs são enzimas multifuncionais que apresentam indução de edema, indução ou inibição plaquetária, indução de apoptose, bem como efeitos antibacterianos, anticoagulantes, anti-HIV e anti-tumorais (TAN; FUNG, 2016).

O domínio apresenta de ligação apresenta uma sequência de consenso de resíduos de glicina (G 40 XG 42 XXG 45), encontrado na curva entre a primeira cadeia β e a hélice α . O domínio de ligação do substrato é composto majoritariamente de uma folha de plissado β misturada de sete cadeias. O domínio helicoidal é constituído por resíduos de aminoácidos 130-230, que contribui para entrada com forma afunilada para o sítio ativo da enzima, localizado em um bolso profundamente enterrado no núcleo da proteína localizada próxima à fração isoaloxazina do cofator de flavina (Figura 5) (KANG et al., 2011).

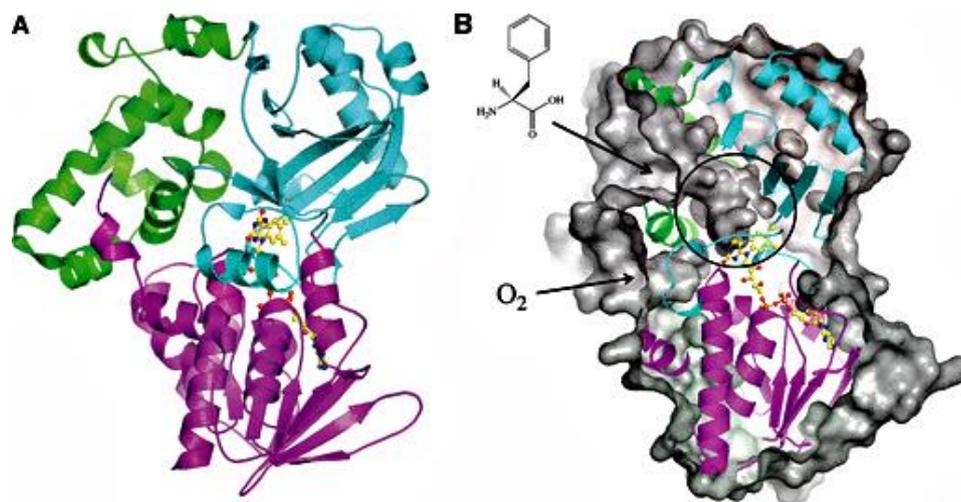


Figura 5 – Representação esquemática da estrutura de uma L-aminoácido oxidase. (A) Representação dos três domínios da estrutura: coloração magenta representa o domínio de ligação FAD, ciano representa o domínio de ligação do substrato e o verde representa o domínio helicoidal. (B) Representação superficial acessível da estrutura: a entrada de aminoácidos e os pontos de entrada de oxigênio são marcados com setas e o sítio ativo circundado. Fonte: Kang et al., 2011.

1.1.6 Lectinas

Os venenos de serpente apresentam em sua composição dois tipos de lectinas tipo C que são classificadas com base nas características estruturais e propriedades funcionais (SARTIM; SAMPAIO, 2015). Estão presentes na forma de homodímeros $\alpha\beta$ ligados por pontes dissulfeto com dois polímeros homólogos (Figura 5) e apresentam a capacidade de aglutinar eritrócitos e se ligar a carboidratos (ARLINGHAUS; EBLE, 2017). As lectinas do tipo C são distinguidas de outras lectinas animais por compartilharem conservado domínio de reconhecimento de carboidrato dependente de cálcio (CRD) de aproximadamente 120 aminoácidos (DU; CLEMETSON, 2016).

Entre as lectinas de venenos botrópicos, a B_{Jcu}L, isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* encontra-se amplamente caracterizada quanto às suas funções estruturais (Figura 6) e biológicas. Sua capacidade de reconhecer e ligar-se a glicoconjugados específicos contendo galactose permite que a B_{Jcu}L promova uma ampla variedade de atividades biológicas. Essa lectina apresenta capacidade de inibir a agregação plaquetária (CLEMETSON, 2010), atividade antitumoral (CALDERON et al., 2014; De CASTRO-DAMASIO et al., 2014) e antibacteriana frente a biofilmes (KLEIN et al., 2015).

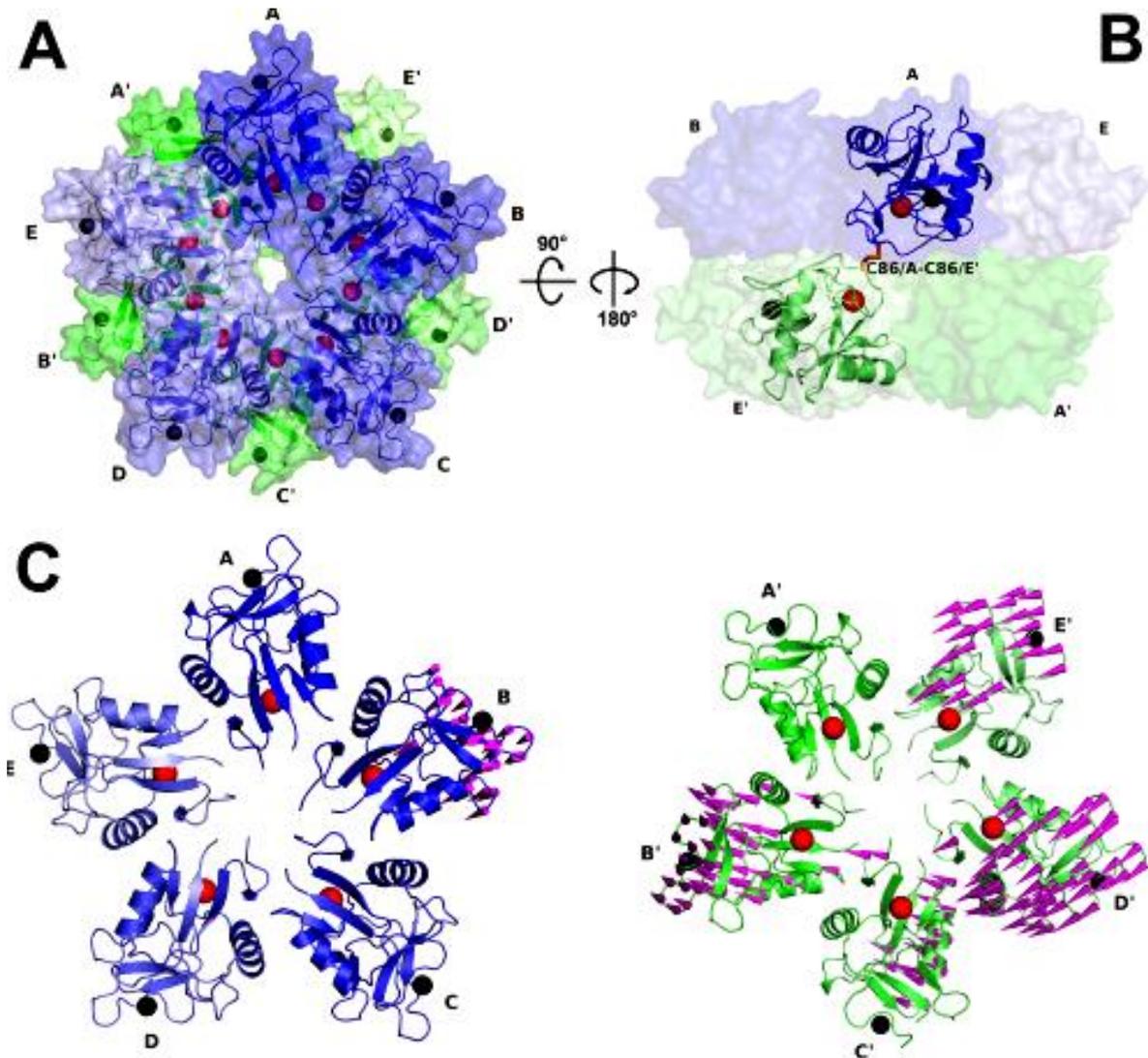


Figura 6 - Representação da estrutura cristal da BjuL e do local de ligação de carboidrato. A) A estrutura descamérica BjuL esquematizada a partir de sua visualização do eixo quíntuplo com cinco monômeros (A a E), no espectro azul e cinco monômeros no fundo (A' a E'), no espectro verde que estão representadas como fita mais 50% de superfície transparente. Os íons Ca^{2+} e Na^+ estão representados por esferas, respectivamente nas cores preta e vermelha. B) Estrutura decamerica da BjuL, interface interpentero representada como 80% superfície transparente. Lectinas apresentam um sítio de ligação de carboidratos, na estrutura apresentada da BjuL esse sítio está representado em azul claro e a estrutura de RSL em cinza claro. O laço dissulfeto entre os monômeros A e E '(Cys86-Cys86) estão esquematizados como um bastão na cor laranja. Os íons Ca^{2+} e Na^+ estão representados por esferas, respectivamente nas cores preta e vermelha. C) Pentâmeros individuais formados pelos monômeros A-E e A'-E' esquematizados como fita em azul e verde, respectivamente. Sítio de ligação ao Na^+ da estrutura BjuL está representado em azul claro e a estrutura RSL em cinza claro. Átomos de oxigênio e nitrogênio de ambas as estruturas estão representados nas cores vermelho e azul escuro, respectivamente. O íon Na^+ está representado como esfera vermelha. Vetores mostrando o sentido de rotação de monômeros BjuL quando comparados com a estrutura de RSL são representados como setas cor de rosa. Fonte: Sartim et al., 2017.

1.1.7 Fatores de Crescimento Endotelial (VEGFs)

Os VEGFs são proteínas diméricas ligantes a receptores do tipo tirosina-quinase, intimamente envolvidos em processos de neovascularização, como vasculogênese e angiogênese (MELINCOVICI et al., 2018). Tais processos regulam várias vias de sinalização e induzem a expressão de receptores nucleares da família NR4A e reguladores da sinalização de cálcio e da MAP cinase (TOIVANEN et al., 2017).

Quando isolado da serpente *B. insularis*, identificou-se uma forma ativa de svVEGF capaz de promover um aumento da permeabilidade vascular (DE AZEVEDO et al., 2001). Esses svVEGFs funcionam como dímeros, cada cadeia é composta por aproximadamente 110 a 122 resíduos de aa. O domínio de cisteína, a característica da família de proteínas VEGF, é completamente conservada em svVEGFs e a identidade da sequência com VEGF165 humano é próximo a 50%. Os svVEGFs contribuem para o aumento da toxicidade no envenenamento, e apresentam características biológicas individuais que proporcionam divergências na classificação da serpente hospedeira (GASMI et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2004; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005).

1.1.8 Peptídeos Potencializadores da Bradicinina

Os BPPs, encontrados em venenos de serpentes, são fontes biológicas ricas, porém ainda pouco explorados. Descobertos por Sérgio Ferreira – ao estudar o veneno da *B. jararaca* nos anos 60 – essas moléculas são responsáveis por potencializar a ação da bradicinina *in vivo*, através da inibição das enzimas conversoras de angiotensina, e assim, atua como substância vasodilatadora (NEIVA et al., 2012). Após a administração, o efeito fisiológico global é a diminuição da pressão arterial (SCIANI; PIMENTA, 2017).

Considerando a elevada especificidade pelo seu alvo, seu tamanho consideravelmente pequeno, sua estabilidade estrutural e a facilidade de síntese química, os peptídeos tornam-se alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos. Alguns componentes presentes no veneno podem ser usados diretamente ou como protótipos de drogas para o tratamento de doenças que não respondem a drogas disponíveis atualmente (GEORGIEVA; ARNI; BETZEL, 2008).

2.0 Acidentes ofídicos: Perfil epidemiológico e desafios

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), acidentes ofídicos são enquadrados na Categoria A das doenças tropicais negligenciadas devido às elevadas taxas de morbimortalidade (CHIPAUX, 2017a). Os envenenamentos por serpentes são, geralmente, registrados em áreas rurais e geograficamente de difícil acesso. O que, por sua vez, dificulta que a vítima receba os devidos cuidados, fato que influencia no curso clínico da enfermidade e na acessibilidade aos antivenenos (CHIPPAUX, 2017b).

É uma doença que afeta desproporcionalmente os segmentos socioeconômicos inferiores da sociedade. As populações de risco, geralmente, são compostas por pessoas com casas mal construídas e que vivem distantes do acesso à educação e a assistência a saúde (MAGALHÃES et al., 2018). Os países com maior número de acidentes são aqueles com baixo Produto Interno Bruto (PIB), baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) - estatística composta de expectativa de vida, educação e renda - e baixos gastos com saúde (LONGBOTTON et al., 2018). O que direciona os carentes cada vez mais para a pobreza em virtude dos altos custos de tratamento, empréstimos forçados e perda de renda, consequências resultantes do envenenamento (KASTURIRATNE et al., 2017).

Um agravante a situação de envenenamentos por serpentes, com impacto a nível mundial é a pouca atenção direcionada a doença pelos órgãos de financiamento, autoridades de saúde pública, responsáveis da indústria farmacêutica e grupos de defesa da saúde, resulta em uma maior inviabilidade e/ou dificuldade para o desenvolvimento de intervenções efetivas com vistas a redução no impacto social (GUTIÉRREZ et al., 2017)

As serpentes são animais ectotérmicos abundantes em climas mais quentes. Restringidos as regiões hiperendêmicas para acidentes, principalmente, em países tropicais, o que a caracteriza uma doença tropical do mundo em desenvolvimento (LONGBOTTON et al., 2018), especialmente alguns países africanos e asiáticos (WILLIAMS et al., 2011), latino-americanos (CHIPAUX, 2017a) e oceânicos (JOHNSTON et al., 2017).

A ocorrência do envenenamento está intimamente vinculada a dinâmica climática, bem como, ao aumento da atividade humana sobre o meio decorrente do clima, particularmente, na estação chuvosa, quando a atividade humana (agricultura) coincide com o período reprodutivo das serpentes (CHAVES et al., 2015). No Brasil, entre as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, observam-se maiores registros de acidentes no período de setembro a março. Na região Nordeste, os maiores registros são no período de

janeiro a maio, na região Norte, não se observa sazonalidade marcante, ocorrendo os acidentes de forma uniforme durante todo o ano (CHIPPAUX, 2015).

O envenenamento por serpentes é caracterizado por ser uma doença ocupacional e ambiental, que atinge, principalmente, jovens e trabalhadores agrícolas adultos. Entretanto, as populações mais susceptíveis variam de crianças - expostas a serpentes enquanto auxiliam nas atividades de cunho agrícola, quando andam descalças ou colocam as mãos em tocas de roedores - catadores, trabalhadores da cana-de-açúcar, pescadores que usam redes e linhas manuais em mares tropicais, além de grávidas, cujo o envenenamento por serpentes representa em alguns países uma importante causa de hemorragia anteparto, bem como a perda materna e fetal (GUTIÉRREZ et al., 2017).

Segundo dados epidemiológicos, aproximadamente 95% dos acidentes ofídicos têm como agentes causadores serpentes da família Viperidae (SINAN, 2019). Nos estudos de Moreira e Morato (2014), essa família representa 94,08% dos acidentes ofídicos, sendo que 81,70% tem como agentes causadores serpentes do gênero *Bothrops*, seguidos de 8,93% por *Crotalus* e 3,45% *Lachesis*.

3.0 Fisiopatologia do envenenamento botrópico

A fisiopatologia do envenenamento botrópico decorre das principais ações apresentadas pelo veneno: inflamatória, miotóxica, coagulante e hemorrágica. O acidente botrópico causa manifestações locais e sistêmicas que auxiliam na classificação do acidente (Tabela 1) (BRASIL, 2001; MAGALHÃES et al., 2017).

Tabela 1 - Classificação do acidente ofídico perante as manifestações locais e sistêmicas apresentadas pela vítima. Fonte: Brasil (2001).

Manifestações	Classificação do acidente		
	Leve	Moderado	Grave
Locais	Ausentes ou discretas	Evidentes	Intensas
Dor, edema e equimose			
Sistêmicos	Ausentes	Ausentes	Presentes
Hemorragia grave, choque e anúria			
Tempo de Coagulação	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado

Dentre as manifestações locais estão o surgimento de lesões hemorrágicas, a mionecrose e o edema intenso, o exsudato purulento e a dor forte no local da mordida, em casos mais graves, pode haver dano tecidual, o que pode resultar em perda funcional ou permanente do tecido ou do membro afetado (MAGALHÃES et al., 2017).

O processo de algesia, ocorrência relatada em acidentes envolvendo vítimas humanas, é uma consequência das alterações na transdução nos nociceptores modulada por uma série de mediadores inflamatórios, como histamina, 5-hidroxitriptamina, bradicinina e mediadores derivados de lipídios (prostaglandinas, leucotrienos e PAF), bem como a participação de células leucocitárias (HERRERA et al., 2018; ZAMBELLI et al., 20018). Essa “sopa inflamatória” desencadeia modificações no microambiente químico de fibras nervosas, com consequente sensibilização periférica. Os compostos sensibilizadores são moléculas sinalizadoras para receptores expressos nos neurônios nociceptivos, por exemplo, os receptores acoplados à proteína G (GPCR), receptores de tirosina quinase e receptores ionotrópicos. A ativação desses receptores eleva a sensibilidade da fibra nervosa, ou seja, hiperalgisia (JI; XU; GAO, 2014).

Adicionalmente, no local da picada ainda é característica a formação de edema e bolhas, devido a alterações em várias camadas da pele, normalmente, com a separação da junção derme-epiderme. As bolhas decorrem da influência do veneno sobre a matriz extracelular e componentes de adesão celular (GUTIÉRREZ et al., 2018). Incrementos na permeabilidade vascular, como consequência da ação de vários mediadores, contribuem para o edema característico desses envenenamentos. O efeito tem várias implicações fisiopatológicas, como a hipovolemia e o aumento da pressão intersticial dentro dos compartimentos musculares (GUTIÉRREZ et al., 2017).

A necrose do membro lesionado, pelas diversas ações do veneno botrópico, é a mais dramática das sequelas, sendo responsável por perdas definitivas de tecido e consequente perda de função e amputações. Pode ser causada pelo próprio veneno e/ou pela isquemia de vasos da região afetada (MAGALHÃES, 2017).

Com relação ao quadro sistêmico, as atividades coagulante, hemorrágica e proteolíticas apresentam-se bem estudadas. A atividade sobre a coagulação sanguínea é o resultado da ação de toxinas do veneno capazes de ativar fibrinogênio, protrombina e fatores de coagulação, ocasionando um consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, tendo efeito anticoagulante (SANCHEZ et al., 2017).

Apesar das propriedades tóxicas procoagulantes do veneno devido à fibrinogénólise, as toxinas desencadeiam um quadro de coagulopatias de consumo que tornam o sangue parcialmente ou totalmente incoagulável. Isso é justificado pelo fato de o homem não ser o principal alvo das serpentes (LOMONTE et al., 2014; SOUSA et al., 2018). Suas presas, são, principalmente, animais de pequeno porte em que, após a inoculação do veneno na corrente sanguínea do animal, ocorre uma coagulação sanguínea massiva em segundos, com consequente obstrução circulatória e morte rápida (JACKSON et al., 2016).

Em seres humanos, em função do maior volume sanguíneo, a quantidade de veneno inoculada em um acidente ofídico não é suficiente para desencadear os mesmos efeitos que são de esperar, por exemplo, num anfíbio, (SOUSA et al., 2018). Assim, o trombo formado é rapidamente dissolvido por plasmina. Essa formação repetida, e a subsequente dissolução de trombos tênues, produz uma coagulopatia de consumo, que leva à incapacidade de formar trombos estáveis. Isso contrasta com a trombina, que serve para formar trombos estáveis (KUMAR et al., 2014).

A atividade hemorrágica é o resultado do dano direto de vasos sanguíneos pelas SVMPs dependentes de Zn^{2+} , que lesionam o endotélio vascular ao degradar componentes da matriz extracelular, uma vez que atuam como desintegrinas. Essa manifestação é resultante de danos na parede dos vasos sanguíneos, que consiste na camada de células endoteliais e na matriz extracelular subjacente, que decorrem na hidrólise de proteínas da membrana basal (GUTIÉRREZ et al., 2016). A clivagem proteolítica de proteínas de matriz extracelular, de fatores de coagulação sanguínea e de receptores de adesão celular em plaquetas e células endoteliais por SVMPs são as principais razões para hemorragias durante o período de envenenamento (KINI, KOH, 2016).

A complicação presente em acidentes botrópicos, nos casos que levam ao óbito das vítimas no Brasil, é a insuficiência renal aguda. Tal processo ocorre devido a soroterapia tardia ou até mesmo após o tratamento soroterápico em razão da hemólise intravascular e deposição de fibrina nos capilares glomerulares (SENISE; YAMASHITA; SANTORO, 2015). Adicionalmente, as vítimas de acidentes dos casos mais graves desenvolvem morbidade crônica, incapacidade e sequelas psicológicas após envenenamento. Tais como amputações, transtorno de estresse pós-traumático, cegueira, perda materna e fetal, contraturas (isto é, encurtamento permanente de um músculo ou articulação que

frequentemente leva à deformidade ou rigidez), infecções crônicas e úlceras malignas (MAGALHÃES et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2018).

Referências

- AMAZONAS, D. R., PORTES-JUNIOR, J. A., NISHIYAMA-JR, M. Y., NICOLAU, C. A., CHALKIDIS, H. M., MOURÃO, R. H.; GRAZZIOTHIN, F. G.; ROKYTA, D. R.; LISLE-GIBBIS, H.; VALENTE, R. H.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L; MOURA-DA-SILVA, A. M. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. **Journal of proteomics**, v. 181, p. 60-72, 2018.
- AMORIM, F. G.; COSTA, T. R.; BAIWIR, D.; DE PAUW, E.; QUINTON, L.; SAMPAIO, S. V. Proteopeptidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of Bothrops moojeni Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 177, 2018.
- ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 512-519, 2017.
- BARONE, J. M.; FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P. F. Effects of N-acetyl-l-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. **Toxicon**, v. 79, p. 1-10, 2014.
- CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F. C.; ZULLIANI, J. P.; CARVALHO, B. M. A.; SILVA, S. L.; STABÉLI, R. G.; SOARES, A. M. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **BioMed Research International**, 2014.
- CALVETE, JUAN J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-1074, 2005.
- CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, v. 62, p. 40-49, 2013.
- CALVETE, J. J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 5, p. 611-634, 2017.
- CASEWELL, N. R. WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013.
- CHAVES, L. F.; CHUANG, T. W.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebites are associated with poverty, weather fluctuation, and El Niño. **Science advances**, v. 1, n. 8, p. e1500249, 2015.
- CHIPPAUX, J. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005662, 2017. a

- CHIPPAUX, J. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 38, 2017. b
- CHIPPAUX, J. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 13, 2015.
- CLEMETSON, K. J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**, v. 56, p. 1236-1246.
- COSTA, T. R.; BURIN, S. M.; MENALDO, D. L.; DE CASTRO, F. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 23, 2014.
- DE AZEVEDO, I. D. L. J.; FARSKY, S. H. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; HO, P. L. Molecular Cloning and Expression of a Functional Snake Venom Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* Pit Viper A NEW MEMBER OF THE VEGF FAMILY OF PROTEINS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39836-39842, 2001.
- DE CASTRO DAMASIO, D.; NOLTE, S.; POLAK, L. P.; BRANDT, A. P.; BONAN, N. B.; ZISCHLER, L.; STUELP-CAMPELO.P.M.; CADENA, S. M. S. C.; NORONHA, L.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; MORENO-AMARAL, A. N. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon**, v. 90, p. 299-307, 2014.
- DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, R. M. **Snake venom phospholipase A2 enzymes**. In: MACKESSY, S. P. Handbook of venoms and toxins of reptiles, v. 1, p. 173-205, 2016.
- DU, X.; CLEMETSON, K. J. **Reptile C-Type lectins**. In: MACKESSY, S. P. Handbook of venoms and toxins of reptiles, 2016. p. 359-378.
- FERNANDES, C. A.; PAZIN, W. M.; DREYER, T. R.; BICEV, R. N.; CAVALCANTE, W. L.; FORTES-DIAS, C. L.; ITO, A.S; FERNANDEZ, R. M.; FONTES, M. R. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. **Scientific Reports**, v. 7, p. 43885, 2017.
- FLOREA, Ș. A. G.; FLOREA, A. G.; KELEMEN, H.; MUNTEAN, D. L. Snake venom metalloproteinases. **Acta Medica Marisiensis**, v. 62, n. 1, p. 106-111, 2016.
- FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. **Understanding the Snake Venom Metalloproteinases: An Interview with Jay Fox and José María Gutiérrez**. 2017.
- FUNG, S. Y.; LEE, M. L.; TAN, N. H. Molecular mechanism of cell death induced by king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 96, p. 38-45, 2015.

GASMI A.; BOURCIER C.; ALOUI Z.; SRAIRI N.; MARCHETTI S.; GIMOND C.; WEDGE S. R.; HENNEQUIN L.; POUYSSEGUR J. Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29992-29998, 2002.

GEORGIEVA, D.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. **Expert review of proteomics**, v. 5, n. 6, p. 787-797, 2008.

GONÇALVES-MACHADO, L.; PLA, D.; SANZ, L.; JORGE, R. J. B.; LEITÃO-DE-ARAÚJO, M.; ALVES, M. L. M.; ALVARES, D. J.; MIRADA, J.; NOWATZKI, J.; MORAIS-ZANI, K.; FERNANDES, W.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; FERNÁNDEZ, J.; ZINGALI, R. B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORRÊA-NETO, C.; CALVETE, J. C. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of proteomics**, v. 135, p. 73-89, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; HERRERA, C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 93, 2016.

GUTIÉRREZ, J.; ESCALANTE, T.; HERNÁNDEZ, R.; GASTALDELLO, S.; SARAVIA-OTTEN, P.; RUCAVADO, A. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 182, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17063, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; HERRERA, C.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; FOX, J. W. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. **Toxicon**, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. Snake Venom Metalloproteinases. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**, p. 115, 2016.

HERRERA, C.; BOLTON, F.; ARIAS, A. S.; HARRISON, R. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Analgesic effect of morphine and tramadol in standard toxicity assays in mice injected with venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 154, p. 35-41, 2018.

IZIDORO, L. F. M.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; DA SILVA, S. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F. C.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

JACKSON, T. N.; KOLUDAROV, I.; ALI, S. A.; DOBSON, J.; ZDENEK, C. N.; DASHEVSKY, D.; OP DEN BROUW, B.; MASCI, P. P.; NOUWENS, A.; JOSH, P.; FRY, B. G. Rapid radiations and the race to redundancy: An investigation of the evolution of Australian elapid snake venoms. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 309, 2016.

JAMI, S.; ERICKSON, A.; BRIERLEY, S.; VETTER, I. Pain-causing venom peptides: insights into sensory neuron pharmacology. **Toxins**, v. 10, n. 1, p. 15, 2018.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 7, p. 533, 2014.

JOHNSTON, C. I.; RYAN, N. M.; PAGE, C. B.; BUCKLEY, N. A.; BROWN, S. G.; O'LEARY, M. A.; ISBISTER, G. K. The Australian Snakebite Project, 2005–2015 (ASP-20). **Medical journal of Australia**, v. 207, n. 3, p. 119-125, 2017.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; DEY, S.; SHARMA, S.; VIRELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS journal**, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, 2011.

KASTURIRATNE, Anuradhani et al. The socio-economic burden of snakebite in Sri Lanka. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005647, 2017.

PATHMESWARAN, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; JAYAMANNE, S. F.; DAWSON, A.; ISBISTER, G. K.; SILVA, H.J.; LALLOO, D. G. The socio-economic burden of snakebite in Sri Lanka. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005647, 2017.

KINI, R.; KOH, C. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 284, 2016.

KINI, R.; KOH, C. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 284, 2016.

KLEIN, R.C.; FABRES-KLEIN, M.H.; DE OLIVEIRA, L.L.; FEIO, R.N.; MALOUIN, F.; RIBON, A. C-Type Lectin from Bothrops jararacussu Venom Disrupts Staphylococcal Biofilms. **PlosOne**, v.10, n.3 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book**. elsevier health sciences, 2014.

LOMONTE, B.; FERNÁNDEZ, J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomics. **Journal of proteomics**, v. 105, p. 323-339, 2014.

LOMONTE, B.; REY-SUÁREZ, P.; FERNÁNDEZ, J.; SASA, M.; PLA, D.; VARGAS, N.; ALAPE-GIRÓN, A; BÉRNARD-VALE, M.; SANZ, L.; CORRÊA-NETO, C.; NÚÑEZ, V.; ANAPE-GIRÓN, A.; ALAGON, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVENTE, J.J. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. **Toxicon**, v. 122, p. 7-25, 2016.

LONGBOTTOM, J.; SHEARER, F. M.; DEVINE, M.; ALCOBA, G.; CHAPPUIS, F., WEISS, D. J.; WILLIAMS, D. J. Vulnerability to snakebite envenoming: A global mapping of hotspots. **The Lancet**, v. 392, n. 10148, p. 673-684, 2018.

MAGALHÃES, H. I.; DE ALMEIDA, A. L. M. C.; DA SILVA, G. R.; RABELO, J. I. D. L. B.; DA SILVA, P. M. G.; LACERDA, N. P. Relato de acidente botrópico que resultou em amputação. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017.

MAGALHÃES, S. F. V.; PEIXOTO, H. M.; MOURA, N.; MONTEIRO, W. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F. Snakebite envenomation in the Brazilian Amazon: a descriptive study. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2018.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; TITANI, K. Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. **Toxins**, v. 2, n. 1, p. 10-23, 2010.

MCGLOTHLIN, J. W.; KOBIELA, M. E.; FELDMAN, C. R.; CASTOE, T. A.; GEFFENEY, S. L.; HANIFIN, C. T.; PFRENDER, M. E. Historical contingency in a multigene family facilitates adaptive evolution of toxin resistance. **Current Biology**, v. 26, n. 12, p. 1616-1621, 2016.

MELINCOVICI, C. S.; BOŞCA, A. B.; ŞUŞMAN, S.; MĂRGINEAN, M.; MIHU, C.; ISTRATE, M; MIHU, C. M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)–key factor in normal and pathological angiogenesis. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v. 59, n. 2, p. 455-467, 2018.

MORA-OBANDO, D.; FERNANDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109846, 2014.

MOREIRA, J. P. L.; MORATO, R. G. Incidência e ocorrência de ataques ofídicos no Brasil em 2012. **Simpósio Mineiro de Geografia**, v. 1, 2014.

OJEDA, P.; RAMÍREZ, D.; ALZATE-MORALES, J.; CABALLERO, J.; KAAS, Q.; GONZÁLEZ, W. Computational Studies of Snake Venom Toxins. **Toxins**, v. 10, n. 1, p. 8, 2018.

PHILLIPS, D. J.; SWENSON, D.; MARKLAND, F. S. **Thrombin-Like Snake Venom Serine Proteinases**. In: MACKESSY, S.P. Handbook of venoms and toxins of reptiles. CRCpress, 2016.

PIMENTA, M. S. **Avaliação epidemiológica e clínico-laboratorial dos acidentes causados por serpentes da espécie *Bothrops erythromelas*, em uma região do Nordeste do Brasil.** 2017.

PLA, D.; SANZ, L.; SASA, M; ACEVEDO, M. E.; DWYER, Q.; DURBAN, J.; CALVETE, J. J. Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). **Journal of proteomics**, v. 152, p. 1-12, 2017.

RESENDE, Y. K. S. Aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos de pacientes vítimas de acidente crotálico: uma revisão. 2017.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.

SANCHEZ, E.; FLORES-ORTIZ, R.; ALVARENGA, V.; EBLE, J. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. **Toxins**, v. 9, n. 12, p. 392, 2017.

SARTIM, M. A.; PINHEIRO, M. P.; DE PÁDUA, R. A.; SAMPAIO, S. V.; NONATO, M. C. Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 126, p. 59-69, 2017.

SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 35, 2015.

SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C. The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 45, 2017.

SENISE, L. V.; YAMASHITA, K. M.; SANTORO, M. L. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 11, p. 1528-1536, 2015.

SEO, T.; SAKON, T.; NAKAZAWA, S.; NISHIOKA, A.; WATANABE, K.; MATSUMOTO, K.; AKASAKA, M.; SHIOI, N. SAWADA, H.; ARAKI, S. Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell-cell adhesions *in vitro* and induces haemorrhage *in vivo*. **The FEBS journal**, v. 284, n. 11, p. 1657-1671, 2017.

SINAN. Acidentes por animais peçonhentos - Notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2019.

SOUSA, L.; ZDENEK, C.; DOBSON, J.; COIMBRA, F.; GILLET, A.; DEL-REI, T.; CHALKIDIS, H. P.; SANT'ANNA, S.; TEIXEIRA-DA-ROCHA, M.M.; GREGO, K.; TRAVAGLIA CARDOSO, S.; FRY, B. G. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. **Toxins**, v. 10, n. 10, p. 411, 2018.

SUNITHA, K.; HEMSHEKHAR, M.; THUSHARA, R. M.; SANTHOSH, M. S.; SUNDARAM, M. S.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. **Toxicon**, v. 98, p. 89-97, 2015.

TAKAHASHI, H.; HATTORI, S.; IWAMATSU, A.; TAKIZAWA, H.; SHIBUYA, M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. **Journal of Biological Chemistry**, 2004.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical science**, v. 109, n. 3, p. 227-241, 2005.

TAKEDA, S. ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: a structural overview. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 155, 2016.

TAN, N.; FUNG, S. **Snake venom L-amino oxidases**. In: MACKESSY, S.P. Handbook of venoms and toxins of reptiles. CRCpress, 2016.

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

TOIVANEN, P. I.; NIEMINEN, T.; LAAKKONEN, J. P.; HEIKURA, T.; KAIKKONEN, M. U.; YLÄ-HERTTUALA, S. Snake venom VEGF Vammin induces a highly efficient angiogenic response in skeletal muscle via VEGFR-2/NRP specific signaling. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 5525, 2017.

ULLAH, A.; MASOOD, R.; ALI, I.; ULLAH, K.; ALI, H.; AKBAR, H.; BETZEL, C. Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. **International journal of biological macromolecules**, 2018.

VALLE, L. A.; SILVA, D. D. F. R.; MAGALHÃES, P. H.; MATTOS, P. A.; LEAL, J. A. Amputação bilateral de extremidades inferiores após acidente botrópico grave: relato de um caso. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 81-84, 2018.

WILLIAMS, D. J.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; WÜSTER, W.; RATANABANANGKON, K.; PAIVA, O.; SHEA, M. Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. **Journal of proteomics**, v. 74, p. 1735-1767, 2011.

YUSOF, Y.; TAN, D. T.; ARJOMANDI, O. K.; SCHENK, G.; MCGEARY, R. P. Captopril analogues as metallo- β -lactamase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 6, p. 1589-1593, 2016.

ZAMBELLI, V.; PICCOLO, G.; FERNANDES, C.; FONTES, M.; CURY, Y. Secreted phospholipases A2 from animal venoms in pain and analgesia. **Toxins**, v. 9, n. 12, p. 406, 2017.

✚ Capítulo II: *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923)
(Serpentes: Viperidae): Veneno e envenenamento

***Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Serpentes: Viperidae): Veneno e
envenenamento**

Joeliton dos Santos Cavalcante¹, Wesley Ruan Borges Guimarães da Silva¹, Cayo Antônio Soares de Almeida², Roberta Jeane Bezerra Jorge³, Carla de Lima Bicho¹

¹ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil.

² Centro de Matemática, Ciências da Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

Correspondência deve ser endereçada para:

Joeliton dos Santos Cavalcante

Endereço: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil

R. Baraúnas N° 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: joeliton.biologia@gmail.com

Fone: +55-83-99377 7819

Resumo:

Trabalhos já realizados com a serpente *Bothrops erythromelas* desde sua biologia até estudos experimentais utilizando seu veneno reforçam necessidades de investigar características do veneno proveniente dessa espécie. Estudos relacionados à composição e o perfil de N-glicanos deste veneno, bem como a complexa rede de variações sobre seu conteúdo proteico são apresentados nessa resivão. Além disso, aspectos dos mecanismos que orquestram a fisiopatologia durante o envenenamento por *B. erythromelas* e investigações quanto sua citotoxicidade. Considerando ainda que as toxinas isoladas são ferramentas relevantes para a compreensão do papel do veneno como um todo, a saber: *berythractivase snake venom metalloprotease* P-III, fosfolipase A2 ácida Asp49 (D49) e svVEGF do veneno também são descritas. Visando a importância da biodistribuição das toxinas no organismo durante o envenenamento, apresentamos ainda o perfil farmacocinético deste veneno, neutralização de atividades tóxicas, bem como novas fontes que, possivelmente, possam ser empregadas para fins terapêuticos.

Palavras-chave: Jararaca da seca, ofidismo, toxinologia, veneno de serpentes.

1 Introdução

A serpente *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Serpentes, Viperidae), popularmente conhecida como "jararaca-da-seca" ou "jararaca-malha-de-cascavel", é a principal responsável pelos envenenamentos por serpentes no Nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2010, SINAN, 2018). É um viperídeo de pequeno porte, a menor do gênero, que está inserido no grupo *neuwiedi*, juntamente a outras oito espécies (MACHADO et al., 2014). São vivíparas e apresentam um período de gestação de no mínimo 123 dias. A prole é constituída por aproximadamente 11 neonatos, cujo tamanho médio varia de 16,80 a 19,20 cm (LIRA-DA-SILVA et al., 1994).

A espécie é endêmica das regiões quentes e áridas do Nordeste brasileiro, com destaque para o domínio da Caatinga, bioma exclusivo do território brasileiro, apresentando distribuição geográfica nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (LIRA-DA-SILVA et al., 2009). A espécie foi considerada por muito tempo restrita à Caatinga. Entretanto, a sua distribuição é ampla, sobretudo, em ambientes áridos e semi-áridos que circundam florestas tropicais secas e decíduas, áreas rochosas, vegetações rasteiras de bromélias terrestres e margens de rios (CAMPBELL; LAMAR, 1989, 2004). Além disso, já foi registrada na Região Metropolitana do Salvador. A ampliação da distribuição dessa espécie não está restrita à Bahia, mas também à Paraíba, Alagoas e Rio Grande do Norte, ressaltando que, nesse último, a caatinga atinge o litoral (MISE et al., 2003).

A espécie está inserida no grupo *B. neuwiedi* que filogeneticamente, é um grupo monofilético. *B. erythromelas* é o grupo irmão do grupo *B. neuwiedi* remanescente. As populações de *B. erythromelas* encontradas ao longo das margens do rio São Francisco indicam que a estrutura interna do clado não corresponde à barreira geográfica formada pelas margens do rio (MACHADO et al., 2014), como observado para outros gêneros de herpetofauna como *Calyptommatus* e *Nothobachia* (SIEDSCHLAG et al., 2010) e *Eurolophosaurus* (PASSONI et al., 2008). Uma ruptura foi verificada na região do médio rio São Francisco entre a província fitogeográfica norte-nordeste do Cerrado e a Caatinga (RATTER et al., 1997), que corresponde aos subclados dentro de *B. erythromelas*.

A concordância temporal, mesmo com divergências quanto ao processo de diversificação da herpetofauna encontrada na Caatinga, indica que os mesmos eventos que orquestraram a distribuição das espécies durante o Pleistoceno (2,28-0,78 Ma) tenham sido

responsáveis pela diversificação das espécies (MACHADO et al., 2014). O haplótipo compartilhado entre as espécies *B. lutzi* e *B. erythromelas* é hipotetizado pela introgressão, e a presença de *B. lutzi* em certas áreas ou habitat isolados no sudeste do Brasil. Esse último evento poderia ser hipotetizado pela dinâmica ecológica que resultou na expansão e/ou retração da Caatinga e do Cerrado durante o Pleistoceno (TOBY PENNINGTON et al., 2000, PRADO; GIBBS, 1993, WERNECK, 2011, MACHADO et al., 2014).

Bothrops erythromelas foi a primeira divergência que ocorreu dentro do grupo *B. neuwiedi*. Essa divergência ocorreu na Caatinga e sequencialmente no Cerrado com *B. lutzi*. Sucessivamente, ocorreu a divergência dos demais clados no Cerrado, sofrendo pelo menos uma vez a diversificação nas florestas do Chaco, Pampas e Araucária. Um padrão que corrobora a afirmação de que o núcleo do Cerrado parece ser o estágio central da dinâmica de especiação com ecossistemas adjacentes (ALMEIDA et al., 2007, WERNECK et al., 2009, 2012).

Mesmo com as divergências ocorridas dentro do grupo *B. neuwiedi* e também em outros grupos de *Bothrops*, ocorreu conservação filogenética. Por exemplo, resíduos dentro do C-desintegrina-like de uma metaloprotease classe PIII (SVMPs P-III), e jararagina no veneno dessas serpentes até *B. erythromelas*, em que a berythracivase (SVMPs P-III) apresenta 59% de identidade preservada (TANJONI et al., 2003).

2.0 Veneno de *Bothrops erythromelas*: Composição molecular e variação intraespecífica

Os venenos de serpentes consistem em uma mistura complexa de componentes (proteínas, peptídeos e aminoácidos) que atuam de maneira isolada ou sinérgica e induzem uma série de alterações fisiopatológicas, que vão desde alterações locais até efeitos sistêmicos complexos (JACKSON et al., 2016).

Uma nova era na caracterização dos venenos de serpentes se iniciou a partir da introdução de métodos que utilizam ferramentas tecnológicas de proteômica e afins, o que propiciou a expansão rápida do conhecimento acerca da composição geral do veneno de serpentes. A partir das análises em proteômica, uma plataforma de dados sem precedentes está se formando com o objetivo de contribuir no entendimento desses coquites tóxicos fascinantes, mas perigosos (OJEDA et al., 2017).

Com a modificação de um método cromatográfico que visava preservar a atividade de proteases do veneno de *B. erythromelas*, 2mM de CaCl₂ foi adicionado ao tampão de filtração em gel. Essa pequena mudança na composição induziu diferenças significativas no perfil de eluição de veneno no Superdex 200, o que acarretou na redução da interação hidrofóbica de PLA₂. Outros constituintes do veneno, incluindo peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) e prováveis *snake venom metalloproteinases* (SVMPs) hemorrágicas, foram similarmente afetados. A fosfolipase A₂ PLA₂ do veneno interage de forma hidrofóbica com a resina matriz constituída de agarose e dextrana, retendo assim a proteína. Além disso, diferentes tampões com variações quanto aos pHs e solventes orgânicos, como acetonitrila (30%), podem ser usados para melhorar a resolução cromatográfica (AIRDS, 2004).

O veneno de *B. erythromelas* apresenta um proteoma altamente conservado quando se confronta a influência da distribuição geográfica sobre a composição do veneno. Ao comparar populações da região Nordeste, oriundas do Ceará, Pernambuco, Paraíba e Bahia verifica-se a existência de uma maior quantidade de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) no proteoma das espécies encontradas no estado da Paraíba, fosfolipase A₂ ácida (Asp49/D49), serinoproteases e metaloproteínase da classe III em amostras da Bahia e Lectina do Tipo- C no estado do Ceará (Tabela 1) (JORGE et al., 2015).

A impressão digital por espectrometria de massa tem sido usada para estudar as variações do veneno e para análises taxonômicas baseadas em componentes de veneno. A espectrometria de massa com ionização por nanoelectrospray por infusão direta (nano-ESI-MS), empregada no estudo dos perfis peptídicos de venenos de *Bothrops* com à análise de componentes principais, indica a presença de peptídeos comuns entre os venenos de *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus* e *B. moojeni*. Assim, foi constatado que o veneno de *B. erythromelas* é o mais próximo filogeneticamente do veneno de *B. alternatus*, porém mais distante do veneno de *B. leucurus* (SOUZA et al., 2008).

Tabela 1. Variação geográfica do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*. Fonte: Jorge et al., 2015.

Família de proteínas	CE	PE	BA	PB	BA
% do valor total de proteínas do veneno					
Metaloproteases da classe PI	7	7.2	9	14.4	2.7
Metaloproteases da classe PIII	36	38	29.8	35.4	45.5
Fosfolipase A2	13.8	13.5	10.5	10.1	10.5
Serinoprotease	4	6	9.7	5.8	9.7
Fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente	1.5	2.4	2.3	1.3	2.3
Desintegrina-like / cisteína-domínio rico	1.1	1.3	2.1	0.9	2.1
Desintegrina	3.6	3.4	5.3	8.9	5.3
Fosfolipase B	< 0.1	---	0.1	---	< 0.1
Fosfodiesterase	0.4	0.4	---	---	---
5'-nucleotidase	---	---	0.5	---	---
Peptídeo potencializador da bradicinina	11	9.3	11.4	14.5	12.2
Proteína de secretória rica em cisteína	---	0.4	---	---	---
Lectina do tipo C – símile	21.6	18	17.2	8.7	8.4

Quanto ao perfil de N-glicanos, o veneno de *B. erythromelas* apresenta 20 estruturas diferentes, das quais duas pertencem ao alto tipo manose e 18 ao tipo híbrido/complexo. No entanto, diferente dos N-glicanos dos venenos do Complexo Jararaca (*B. alcatraz*, *B. insularis* e *B. jararaca*), cujas estruturas são idênticas em todas as espécies e apenas 13 das 20 estruturas do veneno de *B. erythromelas* mostraram-se idênticas aos venenos das outras espécies do grupo (*B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*). Mesmo assim, as sete estruturas que não foram detectadas em todos os venenos podem estar presentes com suas porções de carboidratos, mas em menor abundância.

Diferente das estruturas identificadas nos venenos do Complexo Jararaca, antenas de venenos de *B. erythromelas*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* contendo a composição NeuAc-GalNAc-GlcNAc foram identificadas em 12 das 13 estruturas comuns de N-glicanos (ANDRADE-SILVA et al., 2018).

2.1 Fosfolipase A₂ ácida Asp49 (D49) do veneno de *B. erythromelas*

A fosfolipase A₂ (Asp49) presente no veneno, BE-I-PLA₂, apresenta um peso molecular estimado por espectrometria de massa que corresponde a 13 649,57 Da. O cDNA completo de BE-I-PLA₂, clonado através de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *B. erythromelas*, revelou que a sequência de cDNA possui 457 pb, que leva a codificação de uma fosfolipase A₂ que se apresenta similar a outras fosfolipases A₂ presentes nos venenos de outras espécies de serpentes. Sobre o plasma rico em plaquetas, BE-I-PLA₂ apresenta um alto potencial inibitório na agregação através do ácido araquidônico e colágeno, sem ação nos principais receptores plaquetários. A BE-I-PLA₂ não induz apoptose, nem proliferação em células endoteliais das veias do cordão umbilical humano. Porém causa liberação de prostaglandina I₂ nesse modelo celular, sugerindo um aumento de sua potencial atividade antiplaquetária *in vivo* (DE ALBUQUERQUE MODESTO et al., 2006).

2.2 Berythactivase

A berythactivase (*B. erythromelas* prothrombin **activase**) é uma metaloprotease que ativa protrombina de forma dose-dependente, sem dependência de fosfolipídeos e Ca²⁺. Sua atividade é rápida e completamente inibida por agentes quelantes de metal (oophenanthroline e EDTA). Entretanto, berythactivase apresenta atividade máxima sob pH 8.0 e 9.0, havendo discrepância de sua atividade sobre a protrombina sob pH abaixo de 6.0 e acima de 10. A ação da berythactivase é direcionada para a cadeia A α da molécula de fibrinogênio sem afetar as cadeias β ou γ (SILVA et al., 2003). A berythactivase possui atividades pró-inflamatórias induzindo a síntese de NO e PGI₂ que consistem nos principais inibidores da função plaquetária derivados de células endoteliais. Ainda, a berythactivase desencadeia a expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1 (SCHATTNER et al., 2005).

Análises da sequência do cDNA indicam que a berythactivase é um membro da família de proteínas metaloproteases P-III que apresenta seu multidomínio estrutural de acordo com modelo precursor de metaloproteínases de veneno de serpentes desintegradores (Silva et al., 2003; ITO et al., 2001). O alinhamento sequencial do subdomínio desintegrina e o modelo tridimensional da berythactivase (Figuras 1 e 2) foram desvendados em um estudo comparativo entre ela e a jararagina (MOURA-DASILVA et al., 2008).

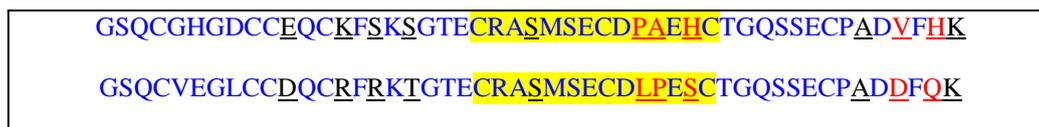


Figura 1 - Alinhamento sequencial do subdomínio desintegrina (Da) da berythactivase em comparação com a jararagina. Destacado em amarelo resíduos que correspondem a uma região homóloga ao loop RGD das desintegrinas clássicas. As alterações de resíduos que estão acessíveis para a ligação MAJar 3 estão sublinhadas. Reproduzido de Moura-da-Silva et al., (2008). Copyright, 2008, Elsevier.

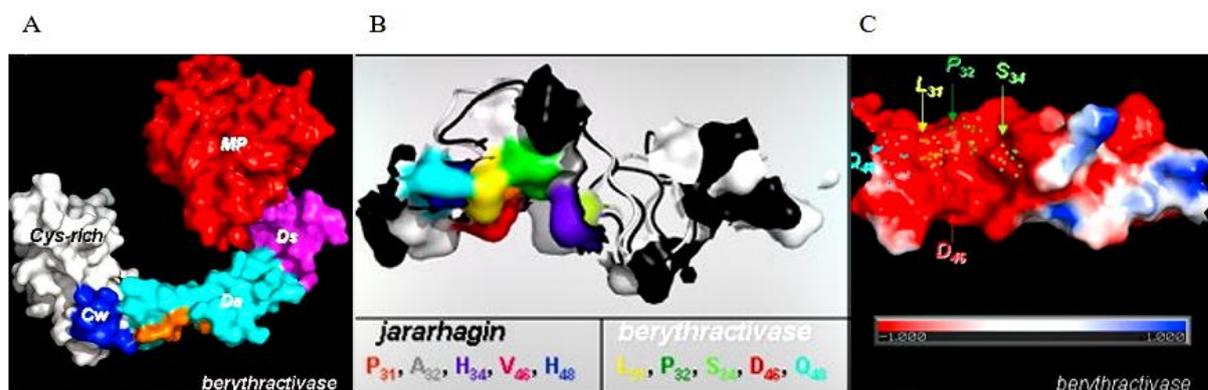


Figura 2 - Estruturas terciária da berythactivase. (A) Estrutura da berythactivase representada pela superfície acessível ao solvente. O anticorpo MAJar 3 não reconhece o subdomínio Da. Imagens em A: MP, domínio de metaloprotease (vermelho); Ds (roxo), Da (ciano) e Cw (azul escuro) são subdomínios correspondentes a Takeda et al., (2006); Domínio rico em cisteína rico em Cys (branco). (B) Superposição do subdomínio Da da berythactivase (branco). Visualização da superfície acessível do subdomínio Da (vista externa, domínio MP atrás). (C) Superposição do subdomínio Da jararagina (preto) e berythactivase (branco). Visualização da superfície acessível do subdomínio Da (vista lateral, domínio MP acima). Em (B) as superfícies correspondentes às mudanças de resíduos que são acessíveis para a ligação MAJar 3 (resíduos sublinhados em (A) são representadas. Um conjunto de alterações relevantes pôde ser encontrado, e os resíduos correspondentes foram coloridos conforme indicado nas legendas abaixo das imagens. (C): os potenciais eletrostáticos negativos são representados em potenciais eletrostáticos vermelho e positivo em azul. Reproduzido de Moura-da-Silva et al., (2008). Copyright, 2009, Elsevier.

2.3 Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor (svVEGF) do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*

Ao se utilizar um anti-soro produzido em camundongos que foram imunizados contra svVEGF de *B. insularis*, foi investigada a amplitude de distribuição dessa toxina entre venenos de serpentes brasileiras. O Western blot com esse anti-soro revelou a presença de uma faixa imunoreativa com massa molecular de aproximadamente 15 kDa no veneno da serpente *B. erythromelas*. Uma massa molecular já previsível para monômeros de svVEGF de *B. insularis* sob condições redutoras, sugerindo fortemente a presença de uma toxina relacionada também em *B. erythromelas* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2004).

A sequência nucleotídica do svVEGF de *B. erythromelas* possui 1213 pb e uma ORF de 146 aminoácidos. Apresenta um códon de iniciação ATG na posição 205 e códon de finalização TGA na posição 643, com alta similaridade a sequências de svSVEGF do veneno de *B. insularis* e *B. jararaca*. Porém, difere dessas em certos nucleotídeos na região codificante em algumas sequências de lacunas e inserções em 5' e 3' UTR. O cDNA possui um incomum sinal de poliadenilação dupla sobreposto (AATAAATAAAA) localizado 11 pb a montante da cauda poli A⁺, que está presente nos svVEGFs botrópicos. A proteína madura, na forma monomérica, tem uma massa molecular prevista de 13,8 kDa e um pI de 7,74, massa semelhante a observada em Western-blot (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2004).

2.4 Outras toxinas e suas atividades biológicas

Os venenos de algumas espécies de *Bothrops* produzem bloqueio neuromuscular devido a presença de neurotoxinas. Porém, ainda inexitem estudos que apresentem neurotoxinas isoladas e caracterizadas para o veneno de *B. erythromelas* (NERY et al., 2016). Entretanto, já é conhecido que, em preparações nervo-músculo de aves e mamíferos *in vitro*, o veneno de *B. erythromelas* induziu bloqueio na junção neuromuscular de forma dependente do tempo ($47,4 \pm 6,4$ min) e concentração (200 µg / ml). Em preparações do músculo biventer cervicis isolado estáveis na ausência de veneno com respostas musculares para ACh (60 e 120 µM) e KCl (13,4 mM) de $98 \pm 14\%$ e $91 \pm 3\%$ (KCl). O

veneno de *B. erythromelas* reduziu as contraturas musculares para ACh e KCl em $\geq 80\%$ nas concentrações $\geq 50 \mu\text{g} / \text{ml}$ (ZAUMUNÉR et al., 2004).

A análise comparativa da atividade coagulante de venenos de serpentes foi realizada em 26 espécies de *Bothrops* com a utilização de sistemas de coagulação específicos para as atividades do tipo trombina e do fator X-ativador. O veneno de *B. erythromelas* não apresentou atividade semelhante a trombina, sendo justificado pelo efeito fibrinogenolítico do veneno. Adicionalmente, o veneno de *B. erythromelas* não depende dos fatores de coagulação VII, VIII, IX, XII e XIII para sua atividade, já que sua ação coagulante é completa (NAHAS et al., 1979).

Um soro com anticorpos anti-miotoxinas, produzido experimentalmente em camundongos, foi testado contra a atividade miotóxica do veneno de *B. erythromelas* e de outras espécies do gênero *Bothrops*. Contudo não ocorreu reatividade do soro com o veneno da espécie supramencionada. A relação entre a presença de bandas de miotoxinas e a atividade miotóxica, induzida pelo veneno de *B. erythromelas*, foi confirmada por análise dos níveis de creatina kinase, indicando baixo potencial miotóxico (MOURA-DA-SILVA et al., 1990).

3.0 Atividades do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* sobre diferentes modelos celulares e tecidos

A ação fosfolipásica desse veneno induz a migração de neutrófilos para as cavidades peritoneais de modelos experimentais *in vivo*. Quando injetado na cavidade peritoneal de ratos e em bolsas de ar subcutâneas, o veneno induz a migração das células para o local da injeção. Entretanto, o veneno de *B. erythromelas* apresenta uma atividade de fosfolipase duas vezes menor do que a exibida pelo veneno de *B. alternatus* (FLORES et al., 1993).

Em estudo sobre a viabilidade celular de *Human Umbilical Endothelial Cells* (HUVECs), após a exposição ao veneno de *B. erythromelas* foi investigada através da disfunção mitocondrial, foi constatado que a berythractivase não alterou a morfologia celular de HUVECs e nem induziu apoptose (SCHATTNER et al., 2005). A berythractivase não induz a liberação do FvW, ou a nova síntese do FvW em células endoteliais HUVECs, devido a incapacidade que a SVMP tem de modular significativamente a síntese de mRNA do FvW. Entretanto, a berythractivase modifica a

atividade pró-coagulante do TF na superfície das HUVECs e a liberação de t-PA (PEREIRA et al., 2006).

Em esplenócitos murinos, o veneno de *B. erythromelas* induz a produção significativa de óxido nítrico (NO) e também apresenta alta taxa de indução da morte celular. O veneno induz uma resposta imunomoduladora através de citocinas (IFN- e IL-6) e produção de NO promovendo um perfil pró-inflamatório. E em comparação ao veneno de *Crotalus durissus cascavella* apresenta um efeito anti-inflamatório (LUNA et al., 2011).

O veneno é citotóxico para as células epiteliais renais Madin-Darby Canine Kidney (MDCK). Em análises realizadas por citometria de fluxo, foram encontradas populações de células apoptóticas precoces e de células apoptóticas tardias significativamente aumentadas após 24 horas, com uma pequena percentagem de células necróticas. Em conjunto, esses resultados mostram que a apoptose é predominante. O veneno estimula a expressão da caspase-3 que, uma vez ativada, cliva proteínas chave que processam a apoptose (DE SOUSA et al., 2016).

O potencial citotóxico apresentado por venenos, proteínas e peptídeos ativos isolados podem vir a ser protótipos para o desenvolvimento de novas drogas, inclusive antitumorais. A terapia para o tratamento do câncer é uma das principais áreas para o uso de proteínas e peptídeos ativos presentes em toxinas de animais, uma vez que algumas proteínas ou peptídeos, apresentam-se ligantes específicos a membranas de células cancerígenas, com comprometimento da sua migração e proliferação (JUSTO et al., 2011).

As linhagens tumorais de células de câncer cervical SHeLa e SiHa (I e II), após serem tratadas com o veneno de *B. erythromelas*, reduziram gradualmente em tamanho, ocorreu a condensação da cromatina e o aparecimento de corpos apoptóticos e vesículas nucleares. O veneno causa uma inibição na função mitocondrial, o que leva a redução do potencial de membrana mitocondrial das células SiHa através da despolarização. E induz, conseqüentemente, apoptose através da via mitocondrial (BERNARDES-OLIVEIRA et al., 2016).

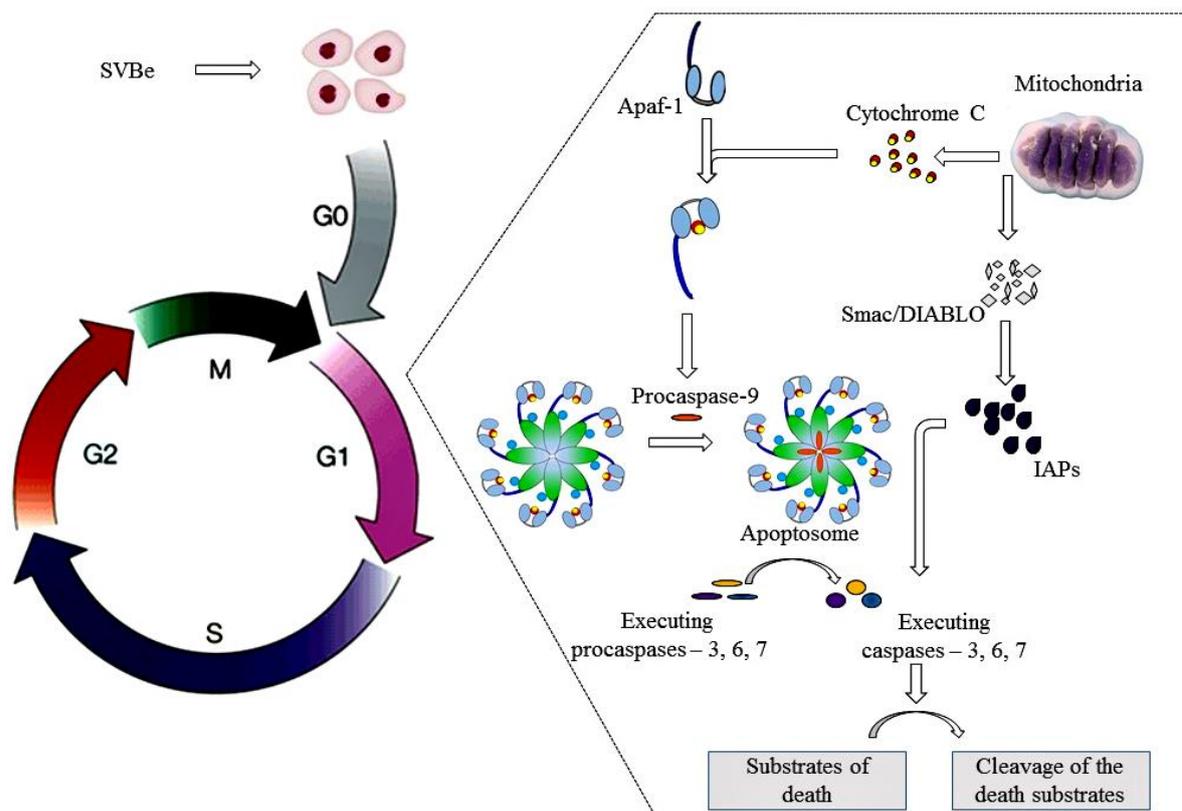


Figura 3 – Ação do veneno de *Bothrops erythromelas* na progressão do ciclo celular de células de câncer cervical da linhagem SiHa. As células na fase G1 durante a exposição ao veneno que entram no estágio subsequente são interrompidas e entram em apoptose, não havendo progressão de células nas fases G2 / M e S. O veneno causa inibição na função mitocondrial, levando a redução do potencial de membrana mitocondrial das células SiHa através da despolarização, induzindo consequentemente a morte celular por apoptose através da via mitocondrial. O processo inicia-se com alterações fisiológicas mitocondriais que leva à liberação do citocromo C para o espaço citosólico. Após liberado no citosol, as moléculas do citocromo C associam-se com proteínas citoplasmáticas, às Apaf-1, formando uma estrutura conhecida por apoptossomo. O apoptossomo, conhecido também como a roda da morte, procede então para realizar a conversão de uma enzima inativa para sua forma ativa, a procaspase 9. Quando convertida de procaspase 9 para caspase 9 pelo apoptossomo, a caspase 9 cliva a procaspase 3 iniciando uma cascata de conversão de procaspases para caspases. Uma vez ativa, as caspases atuam sobre os substratos de morte levando a formação de corpos apoptóticos. Além da liberação do citocromo C, a mitocôndria libera ainda um grupo de proteínas, às Smac/DIABLO que inativam um segundo grupo de proteínas que atuam inibindo a atividade das caspases, às proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). Fonte: Bernardes-Oliveira et al., 2016. Weinberg, 2013. Ilustração: Joeliton Cavalcante, 2019.

4.0 Perfil farmacocinético do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*

Compreender a farmacocinética do veneno de serpentes, sobretudo de espécies endêmicas que muitas vezes são exclusas do pool utilizado para a fabricação de antivenenos é essencial para o desenvolvimento de estratégias de avaliação de risco, além de determinar a dose ideal e o tempo de ação do antiveneno necessário para neutralizar essas substâncias em pacientes vítimas de ofidismo (SANHAJARIYA et al., 2018).

A inoculação do veneno de *B. erythromelas*, por via subcutânea em camundongos, resulta em uma maior quantidade de veneno nos tecidos subcutâneos do que no coração, na bexiga, no cérebro ou diafragma. Isso indica que o veneno de *B. erythromelas* não se distribui na maioria dos órgãos internos, assim, os processos fisiopatológicos que ocorrem no envenenamento de *B. erythromelas*, possivelmente, estão relacionados à ação indireta do veneno (VASCONCELOS et al., 1998). Detalhadamente, o estudo de Vasconcelos e colaboradores (1998) constatou que, após 30 min da inoculação do veneno, a pele continha mais de 50% do veneno. Até a terceira hora após a injeção, o veneno se concentrou no estômago, intestino delgado e, em 6 horas, se concentra no intestino grosso. Adicionalmente, ocorreu baixa ligação do veneno no fígado, na tireoide e nos pulmões, além destes, nenhuma concentração de veneno foi detectada no cérebro, coração, diafragma, baço ou bexiga.

Na presença de um antiveneno, o perfil farmacocinético do veneno de *B. erythromelas* apresenta-se modificado, sua atividade no plasma é maior e sua meia-vida de eliminação menor que na ausência do soro. Isso indica que ocorre uma redistribuição do veneno dos tecidos para o compartimento vascular, associado com o tratamento de envenenados com antiveneno após 15 minutos (ROCHA et al., 2008).

Dessa forma, os efeitos fisiopatológicos decorrentes no envenenamento por *B. erythromelas* são consequências de mecanismos de ação indireta deste veneno, uma vez que não tem como alvo órgãos internos. Entretanto, a redistribuição apresentada pelo veneno de regiões centrais para regiões periféricas, associada à infusão do tratamento soroterápico em 15 minutos após a inoculação do veneno, é de difícil compreensão. É grande a relevância de uma exploração adicional entre parâmetros e covariáveis para examinar os fatores que podem influenciar nos perfis farmacocinéticos do veneno e construir um modelo substancial a partir de dados em uma série maior de casos de envenenamento por serpentes.

5.0 Acidentes ofídicos por *Bothrops erythromelas*: Aspectos epidemiológicos e clínicos

No Nordeste brasileiro, *B. erythromelas* é a principal responsável por casos de envenenamento em humanos, sendo indicada pela população como a serpente peçonhenta potencialmente letal ao homem. Geralmente, suas vítimas são trabalhadores rurais que, durante suas atividades se deparam com essa espécie, o que resulta em casos de

envenenamento (FERNANDES-FERREIRA et al., 2011, SINAN, 2018). Os perfis clínicos e epidemiológicos de envenenamentos humanos com *B. erythromelas* são escassos. No entanto, o Centro de Assistência e Informação Toxicológica da Paraíba, identificou que *B. erythromelas* foi responsável pela maioria dos casos de ofidismo notificados (OLIVEIRA et al., 2010). Ainda, os casos de ofidismo apresentam uma incidência anual de 5.5 casos por cada 100.000 habitantes, com uma alta proporção de picadas por *B. erythromelas* nos membros inferiores, que se relaciona com o tamanho da espécie, a qual em sua idade adulta, atinge, aproximadamente 54 centímetros (OLIVEIRA et al., 2010, JORGE et al., 2015).

A fisiopatologia do envenenamento botrópico decorre das principais ações apresentadas pelo veneno: inflamatória, miotóxica, coagulante e hemorrágica (VALLE et al., 2018). Dentre as manifestações locais estão: surgimento de lesões hemorrágicas, mionecrose e edema intenso, exsudato purulento e dor forte no local da mordida, em casos mais graves, pode haver dano tecidual, e resultar em perda funcional do tecido ou do membro afetado (MAGALHÃES et al., 2017). O veneno dessa serpente exibe um perfil hemorrágico bastante considerável. Nos casos de ofidismo humano, são reconhecidas manifestações hemorrágicas sistêmicas nos pacientes mesmo após a soroterapia. Geralmente, os pacientes apresentam lesões hemorrágicas (equimose, patéquias hemorrágicas cutâneas) e gengivorragia, sem sinal adicional de sintomas de transtornos hemorrágicos (CAVALCANTE et al., 2017 a).

A nível sistêmico, as toxinas do veneno de *B. erythromelas* deflagram uma coagulopatia de consumo e a redução progressiva da contagem de plaquetas circulantes, quando se considera o parâmetro tempo pós-envenenamento até o atendimento hospitalar. A causa primária para a ocorrência de plaquetopenia consiste na formação de trombina pelos componentes do veneno com ação pró-coagulantes, que proporciona a ativação das plaquetas e, conseqüentemente, elevação do seu consumo (CAVALCANTE et al., 2017 b).

A capacidade que o veneno de *B. erythromelas* apresenta para ativar protrombina foi constatada inicialmente em 1992. O veneno apresenta propriedades com atividades enzimáticas sob Fator II (FII) e Fator X (FX) de coagulação. Acreditava-se que as toxinas responsáveis pela ativação de Fator II (Protrombina) e FX seriam metaloproteases com pesos moleculares de 90 kDa e 70-90 kDa, respectivamente. O veneno também apresentava dois fatores hemorrágicos (58 e 105 kDa) e duas enzimas fibrinolíticas (18 e 58 kDa) (MURUYAMA et al., 1992).

6.0 Neutralização das atividades do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*

Os antivenenos injetados via intravenosa (imunoglobulina IgG) ou os fragmentos de anticorpos [F (ab')₂ ou Fab], se ligam e neutralizam o veneno livre no plasma do paciente, que tem como objetivo reverter ou evitar mais efeitos tóxicos, salvando milhares de vidas todos os anos (SEGURA et al., 2010). Para que ocorra a validação da efetividade do produto, esse é submetido à ensaios que avaliem seu potencial neutralizante contra o efeito letal de venenos. Atualmente, mesmo com um grande universo heterogêneo de indústrias produtoras de antivenenos, as limitações na disponibilidade, na acessibilidade do antiveneno e na eficácia da neutralização de atividades tóxicas em várias partes do mundo representam um problema de grande relevância de saúde pública (GUTIÉRREZ et al., 2017).

A dose e o tempo de administração do antiveneno ainda são, em grande parte, empíricos e muitas vezes baseados em estudos de neutralização em animais, nos quais os efeitos tóxicos diferem em relação aos humanos. Na prática, a dose administrada é determinada pelos médicos que tratam com base em sintomas subjetivos ou resultados clínicos e laboratoriais (SANHAJARIYA et al., 2018). A composição proteômica do veneno de serpentes sofrem grandes variações conforme os níveis taxonômicos, sejam eles a nível de gênero, espécie e até mesmo entre populações e indivíduos da mesma espécie, fato que ocorre em função da idade, dieta, sexo, distribuição geográfica e por mecanismos de seleção genética (JACKSON et al., 2016). Dessa forma, as imunoglobulinas empregadas na terapêutica de envenenamento de serpentes diferem de sua especificidade segundo as características individuais dos venenos selecionados no processo de produção de anticorpos (GUTIÉRREZ et al., 2017).

A quantidade de ampolas preconizada pelo Ministério da Saúde para o tratamento de casos leves (n = 3 ampolas), moderados (n = 6 ampolas), e graves (n = 12 ampolas) não apresentam o efeito desejado quando aplicada no tratamento da incoagulabilidade sanguínea em vítimas de ofidismo por *B. erythromelas* (CAVALCANTE et al., 2017). Adicionalmente, uma proteína de 38KDa é observada antes e 24h após a terapia de envenenamento por essa espécie, ou seja, a proteína não é reconhecida pelos antivenenos botrópicos brasileiros, mesmo após 24 horas após a introdução soroterápica (LUNA et al., 2010).

O antiveneno botrópico do Instituto Vital Brazil aboliu a contração muscular de longa duração, induzida pelo veneno de *B. erythromelas*, prevenindo apenas parcialmente o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno. Outrossim, o antiveneno botrópico não preveniu significativamente a redução nas respostas contráteis ao KCl ou a ACh (ZAUMUNÉR et al., 2004). Antivenenos brasileiro do Instituto Vital Brazil, Brasil e costarriquenho não apresentaram imunorreatividade contra os BPPs encontrados no veneno de *B. erythromelas*. Esses antivenenos mostram reconhecimento parcial da PLA₂, com exceção para o veneno das populações distribuídas na Paraíba. Além disso, a imunorreatividade não é eficiente para desintegrina (JORGE et al., 2015). O potencial neutralizante do antiveneno botrópico, produzido pelo Instituto Butantan, Brasil, foi investigado frente as atividades enzimáticas (fosfolipásica, hialuronidásica e proteolítica) do veneno de *B. erythromelas*. Assim, o antiveneno em dose fixa equivalente a 2 μ L apresentou uma taxa de neutralização da atividade de PLA₂ abaixo de 10%, não ocorrendo a neutralização da atividade proeolítica. Por outro lado, a atividade de hialuronidases foi neutralizada acima de 60% (QUEIROZ et al., 2008).

Adicionalmente, o potencial de neutralização do antiveneno botrópico poliespecífico, produzido na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Brasil foi avaliado frente a atividade letal do veneno de *B. erythromelas*. O antiveneno mostrou-se eficaz neutralizando a letalidade apresentada pelo veneno. E indicou alta reatividade cruzada devido às altas quantidades de anticorpos, reagindo de forma cruzada com os componentes presentes no veneno de *B. erythromelas* (CAMEY et al., 2002).

A dificuldade encontrada na neutralização do veneno de *B. erythromelas* pode ser justificado pela ausência da peçonha dessa serpente no pool de venenos usado no Brasil para fabricação do soro antibotrópico, que é constituído a partir do veneno da *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (Segura et al., 2010). A mistura de venenos para a imunização empregada na produção de antivenenos tem sido amplamente baseado em critérios empíricos e não em uma avaliação rigorosa das melhores combinações de veneno (LOMONETE; CALVETE, 2017).

A heparina, tem sido empregada como complemento nos procedimentos terapêuticos de acidentes botrópicos. Destarte, a heparina nas doses 3 e 6 UI, não apresenta eficácia para neutralização das atividades hemorrágica e coagulante do veneno. Entretanto, a heparina na dose de 6 UI é capaz de neutralizar a indução de edema pelo veneno de *B. erythromelas* e aumentar a eficácia do antiveneno. A heparina também neutraliza a

atividade fosfolipásica A₂. Outrossim, o tratamento associado, heparina e antiveneno, é mais efetivo na neutralização de sua atividade letal (BOECHAT et al., 2001).

6.1 Extratos vegetais com potencial neutralizante para o veneno de *Bothrops erythromelas*

A dificuldade em neutralizar os efeitos do veneno de *B. erythromelas* com antivenenos tem levado cientistas a buscarem novas fontes terapêuticas em extratos vegetais. O uso de fontes vegetais, como alvo de investigação no caminho por novas fórmulas antiofídicas, dá-se pela importância da biodiversidade para a saúde humana, que é constantemente destacada, sendo facilmente constatada quando mais de 50 % do arsenal terapêutico disponível comercialmente derivam-se de bioativos extraídos de fontes vegetais ou outras substâncias de origem não humana.

O extrato aquoso de *Jatropha mollissima* (Pohl) Euphorbiace apresenta um potencial redutor sobre a atividade hemorrágica causada pelo veneno de *B. erythromelas*. Além do potencial redutor de hemorragia, o extrato aquoso de *J. mollissima* apresenta atividade antiedematogênica é capaz de causar uma redução do influxo leucocitário. E em adição, reduz os níveis de creatina kinase, o que indica propriedades inibitórias da atividade miotóxica causada pelo veneno (GOMES et al., 2016).

Outro extrato aquoso com propriedades terapêuticas para atividades tóxicas do veneno de *B. erythromelas*, é obtido a partir da espécie vegetal *J. gossypifolia* L. O extrato dessa planta inibiu quase que completamente o efeito edematogênico do veneno quando administrado antes da inoculação do veneno. Porém, não produziu um efeito inibitório quando o extrato foi administrado após o veneno. Parcialmente, o extrato inibiu a hemorragia causada por esse veneno. Foi observado o mesmo efeito no potencial edematogênico, em que houve uma inibição estatisticamente significativa quando feita a utilização do extrato antes da inoculação do veneno. Outro potencial inibitório importante foi encontrado sobre as atividades enzimáticas (fosfolipásica, hialuronidásica e proteolítica) (FÉLIX-SILVA et al., 2017).

Adicionalmente, os extratos aquosos de folhas de *J. gossypifolia* (AEJg) e *J. mollissima* (AEJm), quando administrados por via oral, inibem significativamente a atividade edematogênica do veneno de *B. erythromelas*, em cerca de 50%, com intensidade semelhante à dexametasona. Em contraste, quando administrados por via intraperitoneal o AEJg apresenta efeito antiedematogênico (76,4% de inibição) significativamente maior do

que o AEJm (31,9% de inibição). Curiosamente, quando administrados por via intraperitoneal, o AEJg apresenta maior eficácia na redução do edema induzido pelo veneno do que a dexametasona e o AEJm, que passou a inibir a atividade edematogênica do após 60 min, enquanto o AEJg e a dexametasona, pela mesma via, estavam ativos em até 15 min após a injeção do veneno (FÉLIX-SILVA et al., 2018).

6.2 Fatores antibotrópicos encontrados em organismos animais

A partir do isolamento de moléculas que conferem resistências a presas de serpentes, podem-se adquirir fortes modelos para estudos neutralizantes de toxinas que podem acarretar no desenvolvimento de novos fármacos. A fim de permanecer como uma “arma” de grande eficácia, o veneno deve ser capaz de "ficar à frente" da capacidade da presa/ameaça de evoluir e adquirir resistência. Mesmo assim, alguns animais conseguem desenvolver estratégias para sua própria imunização contra determinados tipos de venenos (ROCHA et al., 2000; TRENTO et al., 2001).

Assim, um fator antibotrópico isolado do soro de *Didelphis marsupialis* quando submetido ao processo de incubação com o veneno de *B. erythromelas*, bloqueia os efeitos do veneno sobre pressão de perfusão, resistência vascular renal, transporte de K^+ e Na^+ . Outrossim, esse fator antibotrópico não reverte os efeitos do veneno sobre o fluxo urinário e as taxas de filtração glomerular (MARTINS et al., 2005).

Um número crescente de notificações de inibidores endógenos da PLA_2 (PLIs) no soro de serpentes vem sendo relatadas. Esses inibidores tem a função de proteger fisiologicamente a serpente contra um vazamento acidental do conteúdo de glândulas de veneno. A presença de cDNAs codificando para γ PLIs foi investigada no tecido hepático de *B. erythromelas*. Foi confirmada a presença de transcritos para γ PLI Homólogos (CNF) de *Crotalus durissus terrificus*, o que, futuramente, pode vir a ser um modelo forte para o desenvolvimento de novos fármacos (ESTEVÃO-COSTA et al., 2009).

6.3 Nanopartículas de quitosana e veneno de *Bothrops erythromelas*

Embora a administração de antivenenos em acidentados tenha sido eficiente, estudos devem ser realizados para identificar um adjuvante menos tóxico que seja capaz de induzir títulos de anticorpos maiores que aqueles produzidos pela abordagem já

estabelecida (MOHAMED et al., 2016; GUPTA et al., 2017). Proteínas do veneno de *B. erythromelas*, carregadas de nanopartículas de quitosana foram analisadas eletroforéticamente e o destaque das bandas entre 55,5 e 42,7 kDa, bem como as de 14,3 e 6,5 kDa, foi evidente. Em comparação com o perfil eletroforético das nanopartículas isentas de proteína, as nanopartículas carregadas de proteína do veneno demonstraram a capacidade das nanopartículas de quitosana de serem um nanocarreador para as proteínas carregadas negativamente examinadas (SOARES et al., 2018).

Em adição, as bandas de proteínas do veneno não foram detectadas nas amostras de nanopartículas, o que confirma a formação de complexos de nanopartículas de proteína de veneno. Considerando os níveis de anticorpos produzidos com nanopartículas de quitosana, verifica-se um desempenho equivalente ou melhor que o hidróxido de alumínio como imunoadjuvante. É válido ressaltar que a quitosana é um biopolímero menos inflamatório que requer uma dose menor de antígeno, provavelmente, devido à sua liberação modificada. Trata-se de uma nova abordagem adjuvante de imunização para o veneno de serpentes, sobretudo, para o veneno de *B. erythromelas*, que poderia ser aplicada para obter soro policlonal (SOARES et al., 2018).

7.0 Considerações finais

Muitas contribuições têm permitido uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais ocorrem os processos fisiopatológicos decorrentes da ação das toxinas animais, como impedi-los e tratá-los. No entanto, o número de publicações disponíveis não é suficiente para elucidar os mecanismos de ação do veneno da *B. erythromelas*, e o reconhecimento deste por soros antiofídicos. Salienta-se que tais investigações são de grande relevância, uma vez que esta espécie é a causa da maioria dos acidentes ofídicos no Nordeste do Brasil. Verifica-se então a presença de três grandes desafios:

O primeiro desafio consiste na obtenção de um quadro de referência abrangente para efeitos do veneno no organismo, que poderá ser utilizado para o delineamento de intervenções clínicas mais adequadas em casos de envenenamento nas regiões em que ocorrem os acidentes por essa espécie. Para isso, são necessários estudos que investiguem os mecanismos pelos quais o veneno induz hemorragia, juntamente com outros processos que resultam em distúrbios da hemostasia, ainda não esclarecidos para o envenenamento em questão.

O segundo desafio consiste em explorar a eficácia dos antivenenos brasileiro no reconhecimento imunológico de componentes do veneno da referida espécie. Bem como, na investigação da eficácia da neutralização dos soros sobre a toxicidade coagulopática desencadeada por veneno de populações de diferentes regiões geográficas, sexo e idade. Com isso, poderão ser delineados melhores protocolos para a terapêutica e evolução dos quadros clínicos de pacientes.

O terceiro desafio consiste no melhoramento e/ou desenvolvimento de um produto mais eficaz, bem como sua validação por um estudo clínico em seres humanos antes de poder ser comercializado. Isto permitirá a obtenção de um antiveneno eficiente para o tratamento eficaz e seguro para pacientes acometidos pela *B. erythromelas*.

Referências

- AIRD, S.D. Chromatographic behavior of *Bothrops erythromelas* phospholipase and other venom constituents on Superdex 75. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.34, n. 4, p. 345-364, 2004.
- ALMEIDA, F.C.; BONVICINO, C.R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 449-466, 2007.
- Amaral, A., 1923. New genera and species of snakes. **Proceedings of the New England Zoölogical Club**, Club 8, 85105.
- ANDRADE-SILVA, D.; ASHLIN, D.; TRAN, T.; LOPES, A. S.; CARDOSO, S. R. T.; REIS, M. S.; ZELANIS, A.; SERRANO, S.M.T.; REINHOLD, V. N. Structures of N-Glycans of *Bothrops* venoms revealed as molecular signatures that contribute to venom phenotype in viperid snakes. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp. RA118. 000748, 2018.
- BERNARDES-OLIVEIRA, E.; GOMES, D. L.; MARTELLI PALOMINO, G.; JUVENAL SILVA FARIAS, K.; DA SILVA, W. D.; ROCHA, H. A. O.; GONÇALVEZ, A.K.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; CRISPIM, J. C. D. O. *Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* Snake Venoms Promote Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis via the Mitochondrial Depolarization of Cervical Cancer Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.
- BOECHAT, A. L. R.; PAIVA, C. S.; FRANÇA, F. O.; DOS-SANTOS, M. C. L. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, n. 1, p. 07-14, 2001.
- CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 501-509, 2002.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. 1989.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. 2004.
- CAVALCANTE, J.S.; COUTINHO, M.S.; SILVA, R.C.E., RODRIGUES, E.C.A.M.S., ASSIS, L.R., VASCONCELOS, M.E.D., FOOK, S.M.L., LIMA, V.M.G.D.M. Avaliação terapêutica da incoagulabilidade sanguínea em pacientes envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca). **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**. Amsterdã: ELSEVIER EDITORS LTDA, v. 39. p. 1-542, 2017 C

CAVALCANTE, J.S., SILVA, R.C.E., ASSIS, L.R., VASCONCELOS, M.E.D., COUTINHO, M.S.; FOOK, S.M. L., RODRIGUES, E.C.A.M.S., LIMA, V.M.G.D.M. Avaliação plaquetária em pacientes vítimas de acidente ofídico por *Bothrops erythromelas*. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**. Amsterdã: ELSEVIER EDITORS LTDA, v. 39. p. 1- 542, 2017.b

CAVALCANTE, J.S., SILVA, R.C.E., COUTINHO, M.S., ASSIS, L.R., VASCONCELOS, M.E.D., RODRIGUES, E.C.A.M.S., FOOK, S.M.L., LIMA, V.M.G.D.M. Disfunções hemostáticas em vítimas de ofidismo por *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca). **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**. Amsterdã: ELSEVIER EDITORS LTDA, v. 39. p. 1-542, 2017.a

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.V.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.C. BE-I-PLA2, a nove acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 377-384, 2006.

DE SOUSA, F.C.M.; JORGE, A.R.C.; TORRES, A.F.C.; MELLO, C.P.; LIMA, D.B.; NOJOSA, D.M.B.; HAVT, A.; ALVES, R.S.; MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, H.S.A. *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) venom induces apoptosis on renal tubular epithelial cells. **Toxicon**, v. 118, p. 82-85, 2016

ESTEVIÃO-COSTA, M.I.; ROCHA, B.C.; DE ALVARENGA MUDADO, M.; REDONDO, R.; FRANCO, G. R.; FORTES-DIAS, C.L. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous γ -phospholipase A2 inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 122-129, 2008.

FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J.A.; XAVIER-SANTOS, J.B.; PASSOS, J.G.; SILVA-JUNIOR, A.A.; TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v.125, p. 74-83, 2017.

FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J. A.; FERNANDES, J.M.; MOURA, A.K.; MENEZES, Y.A.; SANTOS, E.C.; TAMBOURGI, D.V.; SILVA-JUNIOR, A.A.; ZUCOLOTTI, S.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Comparison of two *Jatropha* species (Euphorbiaceae) used popularly to treat snakebite in Northeastern Brazil: Chemical profile, inhibitory activity against *Bothrops erythromelas* venom and antibacterial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 213,p. 12-20, 2018.

FERNANDES-FERREIRA, H.; CRUZ, R.L.; BORGES-NOJOSA, D.M.; ALVES, R.R.N. Crenças associadas a serpentes no estado do Ceará, Nordeste do Brasil. **Sitientibus**, v. 11, n. 2, p. 153-163, 2012.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxigenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, n. 12, p. 1551-1559, 1993.

FURTADO, M.F.; 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, n. 2, p. 219-226, 1991.

GOMES, J.A.D.S.; FÉLIX-SILVA, J.; MORAIS FERNANDES, J.; GERALDO AMARAL, J.; LOPES, N.P.; TABOSA DO EGITO, E.S.; SILVA-JUNIOR, A.A.; ZUCOLOTTI, S.M.; FERNANDES-PEDROSA, M. D. F. Aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail decreases local effects induced by bothropic venom. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

GUPTA, R.; MOHANTY, S. Nanoparticle formulation having ability to control the release of protein for drug delivery application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 327-333, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; VILALLTA, M.; SÁNCHEZ, A.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; CALVETE, J.J. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 163, 2017.

JACKSON, T.N.; KOLUDAROV, I.; ALI, S.A.; DOBSON, J.; ZDENEK, C.N.; DASHEVSKY, D.; BROWN, B.; MASCI, P.P.; NOWENS, A.; JOSH, P.; GOLDENBERG, J.; CIPRIANI, V.; HAY, C.; HENDRIKX, I.; DUNSTAN, N.; ALLEN, L.; FRY, B.G. Rapid radiations and the race to redundancy: An investigation of the evolution of Australian elapid snake venoms. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 309, 2016.

JORGE, R.J.B.; MONTEIRO, H.S.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M.C.; XIMENES, R.M.; BORGES-NOJOSA, D.M.; LUNA, K.P.O.; ZINGALI, R.B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 93-114, 2015.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; HO, P.L. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. **Toxicon**, v. 44, n.5, p. 571-575, 2004.

JUSTO, G. Z.; SOUZA, A. C.; DE FÁTIMA, Â.; PEDROSA, M. F.; FERREIRA, C. V.; ROCHA, H. A. **The Medicinal Value of Biodiversity: New Hits to Fight Cancer, Biological Diversity and Sustainable Resources Use, PhD**. Oscar Grillo (Ed.), ISBN: 978-953-307-706-2, 2011.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; CASAS-E-SILVA, L.L.; DE QUEIROZ, I.B.; NUNES, T. B. Contribuição à biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I. vivíparas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 11, n. 2, p. 187-193, 1994.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; CASAS-E-SILVA, L.L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T.K. Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LOMONTE, B.; CALVETE, J.J. Strategies in 'snake venomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 26, 2017.

LUNA, K.P.D.O.; MELO, C.M.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS FILHO, O.A.; PEREIRA, V.R.A. *Bothrops erythromelas* snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. **International Journal of Interferon, cytokine and mediator research**, v. 3 p. 9-18, 2011.

LUNA, K.P.O.; XAVIER, E.M.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, V.R.A. Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 731-732, 2010.

MACHADO, T., SILVA, V.X., SILVA, M.J.D.J. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 71, p. 1-14, 2014.

MAGALHÃES, H.I.; DE ALMEIDA, A.L.M.C.; DA SILVA, G.R.; RABELO, J.I.D.L.B.; DA SILVA, P. M.G.; LACERDA, N.P. Relato de acidente botrópico que resultou em amputação. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017.

MARTINS, A.M.; SOUSA, F.C.; BARBOSA, P.S.; TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; APRÍGIO, C.C.; QUEIROZ, M.G.R.; GUARNIERI, M.C.; HAVT, A.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.S. Action of anti-bothropic factor isolated from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. **Toxicon**, v.46, n.6, p.595-599, 2005.

MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; TOMY, S.C.; ANTONIO, L.C.; SUGIKI, M.; MIHARA, H. Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 86, n. 5, p. 549-556, 1992.

Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN**. Ministério da Saúde do Brasil. Brasília: 2010. Acesso: 03/08/2018. Disponível em: Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> .

Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN**. Ministério da Saúde do Brasil. Brasília: 2010. Acesso: 09/02/2019. Disponível em: Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> .

MISE, Y.F.; SANTOS S.S.; GONTIJO, M.A.F.; LIRA-DA-SILVA, R.M. Ocorrência da Serpente *Bothrops erythromelas* no Recôncavo Baiano, Brasil. In: **Resumos do VI Congresso Latinoamericano de Herpetologia, Lima (Peru)**, p. 1-76, 2003.

MOHAMED, F.A.N.; LARABA-DJEBARI, F. Development and characterization of a new carrier for vaccine delivery based on calcium-alginate nanoparticles: Safe immunoprotective approach against scorpion envenoming. **Vaccine**, v. 34, n. 24, p. 2692-2699, 2016.

MOURA-DA-SILVA, A. M., RAMOS, O. H. P., BALDO, C., NILAND, S., HANSEN, U., VENTURA, J. S., BUTERA, J.S., FURLAN, S., BUTERA, D., DELLA-CASA, M.S., TANJONI, I., CLISSA, P. B., FERNANDES, I. CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., EBLE, J.A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 484-492, 2008.

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

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thrombosis and haemostasis**, v. 41, n. 01, p. 314-328, 1979.

NERY, N.M.; LUNA, K.P.; FERNANDES, C.F.C.; ZULIANI, J.P. An overview of *Bothrops erythromelas* venom. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, n.6, p.680-686, 2016.

OJEDA, P.G.; RAMÍREZ, D.; ALZATE-MORALES, J.; CABALLERO, J.; KAAS, Q.; GONZÁLEZ, W. Computational Studies of Snake Venom Toxins. **Toxins**, v. 10, n. 1, p. 8.

OLIVEIRA, F.N.; BRITO, M.T., MORAIS, I.C.O.D., FOOK, S.M.L., ALBUQUERQUE, H.N.D. Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 662-667, 2010.

PASSONI, J.C., BENOZZATI, M.L., RODRIGUES, M.T. Phylogeny, species limits, and biogeography of the Brazilian lizards of the genus *Eurolophosaurus* (Squamata: Tropicuridae) as inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, n. 2, p. 403-414, 2008.

PEREIRA, A.L.M.; FRITZEN, M.; FARIA, F.; DA MOTTA, G.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Releasing or expression modulating mediator involved in hemostasis by Berythraactivase and Jararhagin (SVMPs). **Toxicon**, v. 47, n. 7, p. 788-796, 2006.

PRADO, D.E.; GIBBS, P. E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 902-927, 1993.

QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.; MARIA DE FÁTIMA, D. F.; TAMBOURGI, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, 2008.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of botany**, v. 80, n. 3, p. 223-230, 1997.

ROCHA, M.L.; VALENÇA, R.C.; MAIA, M.B.; GUARNIERI, M.C.; ARAUJO, I.C.; ARAUJO, D.A. Pharmacokinetics of the venom of *Bothrops erythromelas* labeled with ¹³¹I in mice. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 526-529.

ROCHA, S.L.; FRUTUOSO, V.S.; DOMONT, G.B.; MARTINS, M.A.; MOUSSATCHÉ, H.; PERALES, J. Inhibition of the hyperalgesic activity of *Bothrops jararaca* venom by an antithrotopropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 875-880, 2000.

SANHAJARIYA, S.; DUFFULL, S.B.; ISBISTER, G.K. Pharmacokinetics of snake venom. **Toxins**, v. 10, n. 2, p. 73, 2018

SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; DE SOUZA VENTURA, J.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; POZNER, R.G.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. The snake venom metalloproteases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. **Biological chemistry**, v. 386, n. 4, p. 369-374, 2005.

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L. R. D. C.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGA, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, M. Y.; ARAÚJO, H.P.; BOLLER, M.A.A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANO-MARTINS, I.S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G.P.; GUTIÉRREZ, J.M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980-989, 2010.

Siedchlag, A.C.; Benozzati, M.L.; Passoni, J.C.; Rodrigues, M.T. Genetic structure, phylogeny, and biogeography of Brazilian eyelid-less lizards of genera *Calyptommatus* and *Nothobachia* (Squamata, Gymnophthalmidae) as inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 622-630, 2010.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C.A.M.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v. 369, n. 1, p. 129-139, 2003.

SOARES, K.S.R.; GLÁUCIA-SILVA, F.; DANIELE-SILVA, A.; TORRES-RÊGO, M.; ARAÚJO, N.K.D.; MENEZES, Y. A. S. D.; DAMASCENO, I.Z.; TAMBOURGUI, D.V.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; FERNANDES-PEDROSA, M.D.F. Antivenom Production against *Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* Snake Venoms Using Cross-Linked Chitosan Nanoparticles as an Immunoadjuvant. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 158, 2018.

SOUZA, G.H.; CATHARINO, R.R.; IFA, D.R.; EBERLIN, M.N.; HYSLOP, S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. **Journal of mass spectrometry**, v. 43, n. 5, p. 594-599, 2008.

- TANJONI, I.; BUTERA, D.; SPENCER, P. J.; TAKEHARA, H. A.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 809-816, 2003.
- TOBY PENNINGTON, R.; PRADO, D.E.; PENDRY, C.A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, n. 2, p. 261-273, 2000.
- TRENTO, E. P.; GARCIA, O.S.; RUCAVADO, A.; FRANÇA, S.C.; BATALINI, C.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A. M. Inhibitory properties of the anti-bothropic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. **Biochemical pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1521-1529, 2001.
- VALLE, L. A.; SILVA, D. D. F. R.; MAGALHÃES, P. H.; MATTOS, P. A.; LEAL, J. A. Amputação bilateral de extremidades inferiores após acidente botrópico grave: relato de um caso. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 81-84, 2018.
- VASCONCELOS, C.M.L.; VALENÇA, R.C.; ARAÚJO, E.A.; MODESTO, J.C.A.; PONTES, M.M.; BRAZIL, T. K.; GUARNIERI, M.C. Distribution of ¹³¹I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, n. 3, p. 439-443, 1998.
- WERNECK, F.D.P.; GIUGLIANO, L.G.; COLLEVATTI, R.G.; COLLI, G.R. Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). **Molecular Ecology**, v. 18, n. 2, p. 262-278, 2009.
- WERNECK, F.P. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews**, v. 30, n. 13-14, p. 1630-1648, 2011.
- WERNECK, F.P.; GAMBLE, T.; COLLI, G.R.; RODRIGUES, M.T.; SITES JR, J.W. Deep diversification and long-term persistence in the South American 'dry diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 66, n. 10, p. 3014-3034, 2012,
- ZAMUNÉR, S.R., DA CRUZ-HÖFLING, M.A., CORRADO, A.P., HYSLOP, S., RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 259-271, 2004.

✚ Capítulo III: Efeitos locais e hematológicos induzidos pelo
veneno da serpente *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923)
(Squamata, Viperidae)

Efeitos locais e hematológicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae)

Joeliton dos Santos Cavalcante¹, Wesley Ruan Borges Guimarães da Silva¹, Cayo Antônio Soares de Almeida³, Roberta Jeane Bezerra Jorge⁴, Carla de Lima Bicho¹

¹ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil.

² Centro de Matemática, Ciências da Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

Correspondência deve ser endereçada para:

Joeliton dos Santos Cavalcante

Endereço: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil

R. Baraúnas N° 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: joeliton.biologia@gmail.com

Fone: +55-83-99377 7819

Resumo:

O envenenamento da serpente sul-americana *Bothrops erythromelas* causa dor local, edema, eritema e equimoses. Induz, ainda, um quadro de alterações sistêmicas que resulta em uma coagulopatia de consumo, o que torna o sangue da vítima incoagulável. O objetivo do trabalho foi investigar a interface das alterações locais e hematológicas, com a simulação experimental de um cenário inicial e o estabelecimento das manifestações patológicas coagulotóxica, hemorrágica e inflamatória. Para o estudo do efeito coagulante, foi utilizado um pool de plasma humano, o qual foram acrescidas diferentes doses de veneno de *B. erythromelas*. O tempo de coagulação foi cronometrado. Para investigar o perfil hemorrágico e inflamatório induzido pelo veneno foram utilizados camundongos *swiss* (n=6 para cada tratamento). O modelo inflamatório foi embasado no teste do edema de pata. Para investigar a atividade hemorrágica, os camundongos receberam o veneno de *B. erythromelas* via intradérmica. Posteriormente, o halo hemorrágico formado foi mensurado com paquímetro digital. Amostras da lesão hemorrágica foram dissecadas e submetidas a análise histopatológica. O veneno de *B. erythromelas* foi injetado via intraplantar e o edema mensurado com um paquímetro digital. Amostras da pata seguiram para a análise histopatológica. Por fim, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e submetidas a análise hematológica. Como resultado do seu alto potencial coagulante, não foi possível determinar a dose mínima coagulante. Por outro lado, foi estabelecida em 3,5 µg de veneno a dose mínima hemorrágica. Macroscopicamente, nas condições testadas, a lesão hemorrágica começou a se manifestar 15 minutos após o envenenamento intradérmico e se estabeleceu aos 60 minutos, sendo que nos 120 minutos subsequentes sua área foi ampliada. Na análise histopatológica, 30 minutos após o envenenamento, foi constatada hiperqueratose e irregularidade epidérmica. Um quadro hemorrágico intenso situado, principalmente, na hipoderme, foi verificado 60 minutos após o envenenamento experimental. Adicionalmente, se observou um processo de saponificação. Findado os 120 minutos, foi constatado um intenso quadro de hemorragia e saponificação. A injeção intraplantar do veneno, em todas as concentrações adotadas, deflagrou efeito edematogênico, cuja resolução foi imperceptível em até 12 horas. Foi identificado que o mecanismo do edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas* se deu pela separação dermo-epidérmica crescente de forma dose-resposta. A dose mínima edematogênica para o veneno foi estimada em 1,75 µg. Essa dose não afetou os parâmetros hematológicos: contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito e nem induziu trombocitopenia. Por outro lado, verificou-se um quadro de neutrofilia, monocitopenia e linfopenia. O presente estudo revela que o veneno de *B. erythromelas* apresenta um alto potencial coagulante. O veneno causou alterações na pele de camundongos durante o estabelecimento da lesão hemorrágica, que foi percebida na hipoderme. Seu efeito edematogênico comprometeu a junção dermo-epidérmica.

Palavras-chave: Edema, inflamação, hemorragia, jararaca-da-seca.

1 Introdução

O envenenamento por serpentes é uma doença que atinge países tropicais e subtropicais (CHIPPAUX, 2017; JOHNSTON et al., 2017; WILLIAMS et al., 2011) e afeta os segmentos socioeconômicos mais baixos da sociedade (KASTURIRATNE et al., 2017; LONGBOTTOM et al., 2018). Constitue um problema negligenciado de saúde pública que tem recebido pouca atenção dos órgãos de fomento, autoridades em saúde pública, indústria farmacêutica e grupos de defesa da saúde, o que prejudica o desenvolvimento de intervenções efetivas para reduzir sua magnitude social (GUTIÉRREZ et al., 2017).

As populações de risco, geralmente, são compostas por pessoas com casas mal construídas e que vivem distantes do acesso à educação e assistência à saúde. Isso direciona os carentes cada vez mais para a pobreza em virtude dos altos custos dos tratamentos, empréstimos forçados e perda de renda e outras consequências resultantes do envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 2017; KASTURIRATNE et al., 2017).

No Brasil, as espécies de serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos casos de envenenamento humano (MOREIRA; MORATO, 2014). A fisiopatologia induzida pelo veneno por essas espécies abrange várias manifestações complexas a nível local e sistêmica, entre elas, edema, dor, hemorragia, necrose e distúrbios hemostáticos (MAGALHÃES et al., 2017; VALLE et al., 2018). A serpente *Bothrops erythromelas*, comumente chamada “jararaca da seca”, tem sido apontada como o principal agente causador de acidentes ofídicos no Nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2010). Com ocorrência no bioma Caatinga, a espécie tem registros nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (LIRA-DA-SILVA et al., 2009). Nesses locais é elencada como uma das espécies mais perigosas (FERNANDES-FERREIRA et al., 2012).

A *B. erythromelas* foi considerada por muito tempo restrita à Caatinga. Entretanto, a sua distribuição é ampla, sobretudo, em ambientes áridos e semi-áridos que circundam florestas tropicais secas e decíduas, áreas rochosas, vegetações rasteiras de bromélias terrestres e margens de rios (CAMPBELL, 2004). Além disso, já foi registrada a sua ocorrência na Região Metropolitana de Salvador. A ampliação da sua distribuição não está restrita à Bahia, mas também à Paraíba, Alagoas e Rio Grande do Norte (LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

Bothrops erythromelas apresenta em seu veneno cinco principais famílias de toxinas: *snake venom metalloproteases* (SVMPs), fosfolipases A2 (PLA2), *snake venom serinoproteases* (SVSPs), lectinas do tipo C (CTL), peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) e desintegrina (JORGE et al., 2015). Nesse coquetel químico, as SVMPs se destacam pela abundância, assim como relatado para outras espécies de *Bothrops* (GAY et al., 2016; GONÇALVES-MACHADO et al., 2016; TASOULIS; ISBISTER, 2017), responsáveis pela hemorragia no envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 2016).

Embora já seja conhecido o proteoma do veneno de *B. erythromelas*, a caracterização biológica desse veneno foi pouco explorada. O veneno não apresenta atividade trombina-símile devido o seu potencial fibrinogenolítico, mas apresenta toxinas com alto potencial de ativação do fator Stuart-Prower e Protrombina (NERY et al., 2016). A toxina responsável por este último efeito, a berytractivase, já foi isolada e caracterizada (SILVA et al., 2003).

A dificuldade de se identificar precocemente e, apenas pelos sinais clínicos, se o acidente foi provocado por uma serpente da espécie *B. erythromelas* ou por uma outra espécie, agrava ainda mais o cenário. A escassez de trabalhos que relatem as alterações locais e hematológicas que esse veneno venha a deflagrar, dificulta ainda mais o real diagnóstico quanto ao quadro clínico do paciente. Nos acidentes ofídicos, de forma geral, mas principalmente no acidente causado por *B. erythromelas*, quanto mais rápido o diagnóstico preciso for feito e o antiveneno for administrado, menores as chances de o quadro clínico se agravar.

De acordo com o exposto, é possível perceber que os problemas existentes, estão relacionados com a carência de informações básicas sobre os potenciais efeitos locais e hematológicos deflagrados pelo veneno de *B. erythromelas*. Outrossim, é necessário entender melhor os principais mecanismos de toxicidade dos venenos clinicamente relevantes, em condições experimentais, bem como quantificar sua intensidade. Isso norteia os futuros ensaios de avaliação pré-clínica de antivenenos e/ou substâncias antiofídicas e fornecerá um quadro mais abrangente a profissionais da saúde sobre a patologia causada pelo veneno dessa espécie.

O presente estudo visa conhecer a interface das alterações locais e hematológicas, com a simulação experimental de um cenário inicial e o estabelecimento da patologia.

2 Mterial e métodos

2.1 Veneno

Para a obtenção das amostras de veneno de *B. erythromelas*, os espécimes foram anestesiados com o auxílio de CO₂. Após a extração, o veneno foi liofilizado e armazenado a -20°C até o momento da utilização. As amostras foram obtidas através da colaboração com a Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

2.2 Plasma

O plasma humano de voluntários adultos e sadios foi adquirido da DiaMed. Para realização dos bioensaios de coagulação, o volume total do frasco liofilizado foi reconstituído com exatamente 1,0 mL de água bidestilada por 2 horas a 25° C. Tal procedimento foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

2.3 Animais

Os estudos utilizando como modelo experimental camundongos *swiss*, os quais foram fornecidos pelo Núcleo de Mutagênese Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba. Camundongos machos e fêmeas, com peso entre 20 – 25g foram mantidos em temperatura ambiente em estante ventilada, com fotofase de 12 horas e oferta de água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (protocolo 2018.01-04).

2.4 Atividade coagulante

A atividade coagulante do veneno de *B. erythromelas* foi avaliada utilizando plasma humano. Foram mantidas alíquotas de 200 µL de solução de plasma humano citratado a 37°C durante 2 minutos. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas (100 µL) de amostras de veneno diluídas em *phosphate buffered saline* (PBS) e o tempo de coagulação

registrado. Os tempos de coagulação foram mensurados em triplicata a 37°C com o auxílio do Coagulômetro Monocanal Semi-Automático - Max Coag® (Código: 10591).

2.5 Determinação da Dose Mínima Hemorrágica

Após tricotomia do dorso, grupos de camundongos *swiss* fêmeas (n=5) pesando 20 - 25 g, receberam uma injeção contendo 1,5; 2,5 e 3,5 µg de veneno diluída em 100µL de PBS via intradérmica. Após 2 horas, os animais foram submetidos à eutanásia e, em seguida, uma amostra de pele foi removida (cerca de 5 centímetros de diâmetro a partir do ponto de administração). Sequencialmente, o halo hemorrágico, formado na face interna da pele, foi mensurado em milímetros. No grupo controle foi administrado 100 µL de PBS.

2.6 Perfil temporal da atividade hemorrágica

Grupos contendo camundongos *swiss* fêmeas (n=5) foram injetados intradermicamente com o veneno de *B. erythromelas* (3,5 µg) dissolvido em 50 µL de PBS. O grupo controle recebeu apenas 50 µL de PBS. Após 15, 30, 60 e 120 minutos, os animais foram sacrificados e a pele dorsal, circunvizinha ao local da injeção, foi cuidadosamente dissecada. Após fotodocumentação das amostras, essas foram fixadas em solução de metacarnose (60% de metanol, 30% de clorofórmio, 10% de ácido acético glacial) por 3 horas a 4°C e depois desidratadas em etanol. Cortes de 5 µm foram aderidas a lâminas de vidro e secas a temperatura ambiente. As seções foram desparafinadas em xileno e hidratadas em água destilada, e coradas com hematoxilina e eosina para análise histopatológica.

2.7 Atividade edematogênica: Perfil temporal da atividade e Dose Mínima Edematogênica

Para a determinação da Dose Mínima Edematogênica (DME), buscou-se inicialmente conhecer o perfil temporal dessa atividade. Para isso, três doses de veneno (1,25; 2,5 e 5,0 µg) foram injetadas, via intraplantar, na pata direita de camundongos *swiss* (n=5). O edema foi mensurado por meio de um paquímetro digital em diferentes períodos de tempo (0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11 e 12 horas) a fim de definir o pico de atividade edematogênica do veneno.

Após conhecer o tempo para o veneno atingir atividade edematogênica máxima, os camundongos (n=5) foram injetados, via intraplantar, na pata direita com diferentes doses (1,75 e 2,0 µg) do veneno de *B. erythromelas*. O edema foi mensurado com a utilização de um paquímetro digital. Os resultados foram expressos como a porcentagem de aumento em relação ao tamanho inicial. A DME consiste na quantidade de veneno que induz um incremento de 30% no volume da pata ou na espessura após a sua injeção.

2.8 Análise histopatológica

Amostras contendo a almofada da pata dos camundongos utilizados no ensaio edematogênico, fixadas em formalina tamponada a 10%, foram submetidas a uma bateria de desidratação em soluções crescentes de álcool etílico e, por fim, diafanizadas em xilol. As amostras desidratadas foram emblocadas em parafina e submetidas a microtomia. Os cortes de 5 µm gerados foram aderidos a lâminas de vidro e secos a temperatura ambiente. Após, foram desparafinados em xileno e hidratados em água destilada. Para análise histopatológica, cortes foram corados com hematoxila e eosina.

2.9 Análise hematológica

A análise de parâmetros hematológicos foi realizada utilizando como modelo de envenenamento a indução do edema de pata. Para isso, camundongos *swiss* foram injetados com PBS (controle) (n=5) e 1,75 µg de veneno de *B. erythromelas* (n=5), via intraplantar, na pata direita. As análises foram realizadas em dois tempos, 30 e 60 minutos após o envenenamento. Utilizou-se grupos experimentais independentes. Ao atingirem o tempo de envenenamento adotado, os camundongos foram anestesiados e a coleta de sangue foi realizada via punção cardíaca. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos de coleta a vácuo com EDTA (Labor import®). A contagem diferencial das populações celulares foi realizada com um equipamento ABX Pentra XL 80 (Horiba Medical®).

Os parâmetros hematológicos foram:

- Série vermelha: Número de células vermelhas (RBC), hemoglobina (HGB) e hematócrito (HCM).

- Série branca: Número de células brancas (WBC), contagem diferencial (absoluta e relativa) de neutrófilos, linfócitos (totais, atípicos e típicos), monócitos, eosinófilos e basófilos.

- Número total de plaquetas.

2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism versão 7.00 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) San Diego, sendo consideradas estatisticamente significativas as diferenças com o $p < 0,05$. Os resultados obtidos na atividade edematogênica (perfil edematogênico) foram comparados utilizando o teste ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. O recurso gráfico foi gerado a partir do *software* supramencionado.

3 Resultados

3.1 Atividade coagulante

Uma variação significativa foi evidente na toxicidade pró-coagulante nas concentrações de veneno adotadas para a investigação. No presente estudo não foi executável a determinação da dose mínima coagulante (DMC), devido o alto potencial coagulotóxico do veneno de *B. erythromelas*. O total de veneno que apresentou tempo de coagulação mais aproximado a DMC foi 0,12 μg , sendo essa dose responsável pela coagulação do plasma em 28,91 segundos (Figura 1).

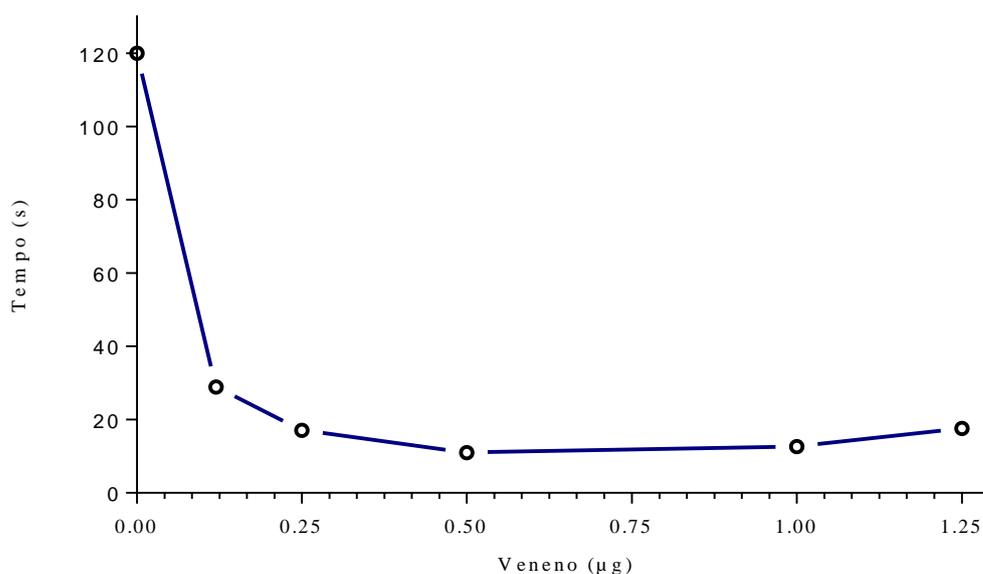


Figura 1 - Avaliação da atividade coagulante do veneno de *Bothrops erythromelas* em função da dose/tempo-resposta.

3.2 Dose Mínima Hemorrágica

Nas condições do ensaio, o veneno teve uma atividade hemorrágica mínima (DMH) estimada em aproximadamente 3,5 μg , ou seja, a dose que causou como resposta uma área hemorrágica com 10 mm de diâmetro.

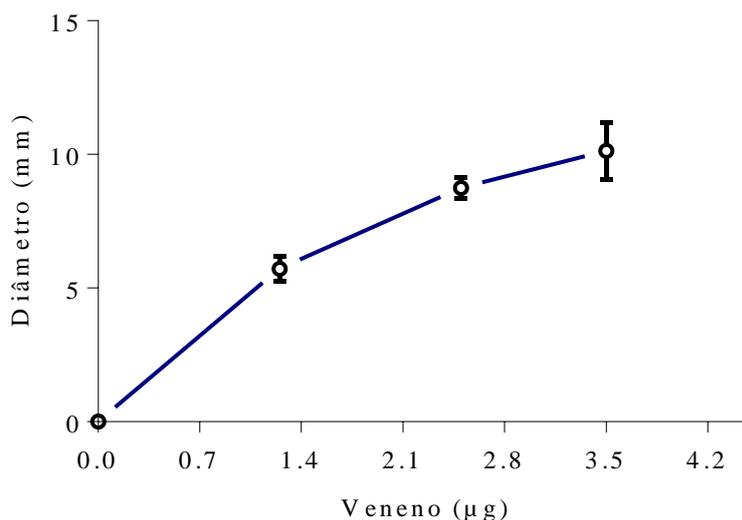


Figura 2 - Avaliação da dose-resposta para atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops erythromelas*: Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH).

3.3 Alterações morfológicas induzidas pelo veneno de *B. erythromelas* na pele de camundongos

No início do período analisado (15 minutos), o estudo se concentrou na ação direta das toxinas do veneno na gênese hemorrágica, evitando interferência de efeitos secundários de componentes endógenos liberado pela reação local até o estabelecimento da lesão hemorrágica.

Validou-se, inicialmente, a alteração deflagrada pelo PBS, que apresentou apenas um pequeno ponto hemorrágico no local da injeção. Essa alteração observada na amostra durante todos os intervalos a qual foi realizado a análise (Figura 3 A).

Após verificar que o PBS, solução utilizada para a dissolução do veneno, não induziu hemorragia, procedeu-se a investigação das amostras com injeção do veneno. O grupo amostrado injetado com veneno apresentou suas primeiras manifestações hemorrágicas macroscópicas 15 minutos após o envenenamento com a formação de áreas hemorrágicas de coloração suave (Figura 3 B). Entretanto, após 30 minutos, a análise macroscópica da pele injetada, revelou que o veneno induziu alterações no sistema hemostático, sendo perceptível através da aparição de vasos com fluxo sanguíneo intenso (Figura 3 C). Finalmente, a lesão hemorrágica evoluiu entre 60 e 120 minutos, e nesse

último tempo, pode-se observar uma lesão hemorrágica intensa e concentrada (Figura 3 D) que evoluiu, amplificando sua área (Figura 3 E).

A análise morfológica sob microscopia de luz mostrou que o PBS não induziu alterações no tecido, que teve suas características histológicas preservadas. A epiderme estava com a camada basal organizada, a derme possuía constituição normal, assim como a hipoderme que também não apresentou modificações (Figura 3 F). Decorrendo 15 minutos após a injeção do veneno, pode-se verificar alterações quanto ao formato das células (Figura 3 G).

Após 30 minutos da injeção, o tecido apresentou-se livre de manifestações hemorrágicas, embora pudesse ser observada, microscopicamente, alterações no tecido. Foi possível visualizar a epiderme mais espessa do que o controle, caracterizando um cenário de hiperqueratose. Adicionalmente, pode-se observar que a epiderme se tornou bastante irregular, bem como a morfologia dos folículos pilosos (Figura 3 H).

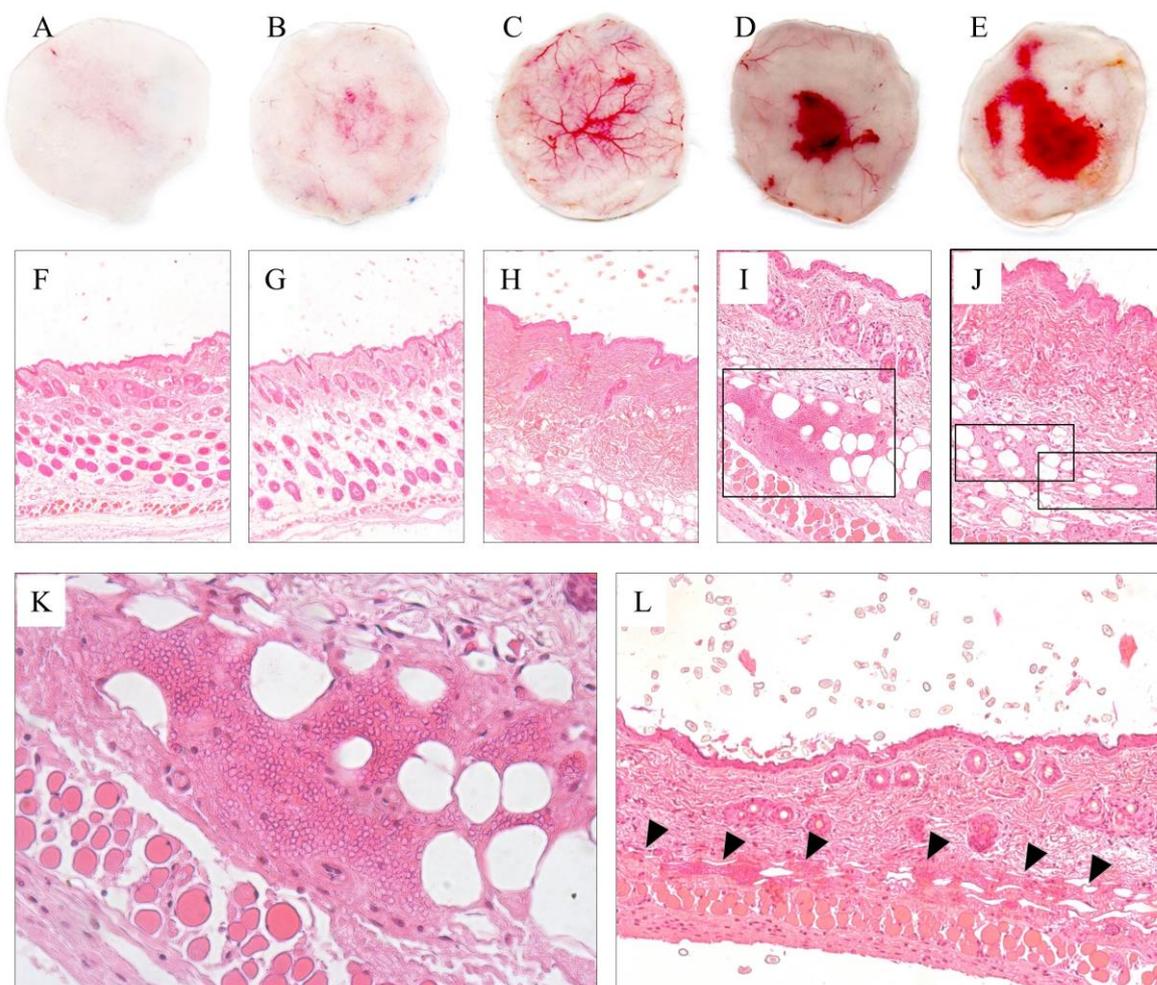


Figura 3 - Análise macroscópica e microscópica da lesão hemorrágica induzida pelo veneno da de *Bothrops erythromelas*. O veneno de *B. erythromelas* foi injetado via intradérmica no dorso em camundongos *swiss* após a região ser tricomizada. O desenvolvimento da lesão hemorrágica da face interna foi acompanhado por

15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção (Figuras B, C, D e E, respectivamente). Fotografias realizadas sob objetivas de 20x.

Finalmente, 60 minutos após envenenamento, foi indentificada uma hemorragia drástica na hipoderme de camundongos injetados com o veneno (Figura I), situada, principalmente, acima da camada hipodérmica com trechos de congestão vascular. A nível hipodérmico foi identificada sobreposição de células adipócitas e irregularidade morfológica dessas células, o que caracteriza o processo de saponificação (Figura 3 K).

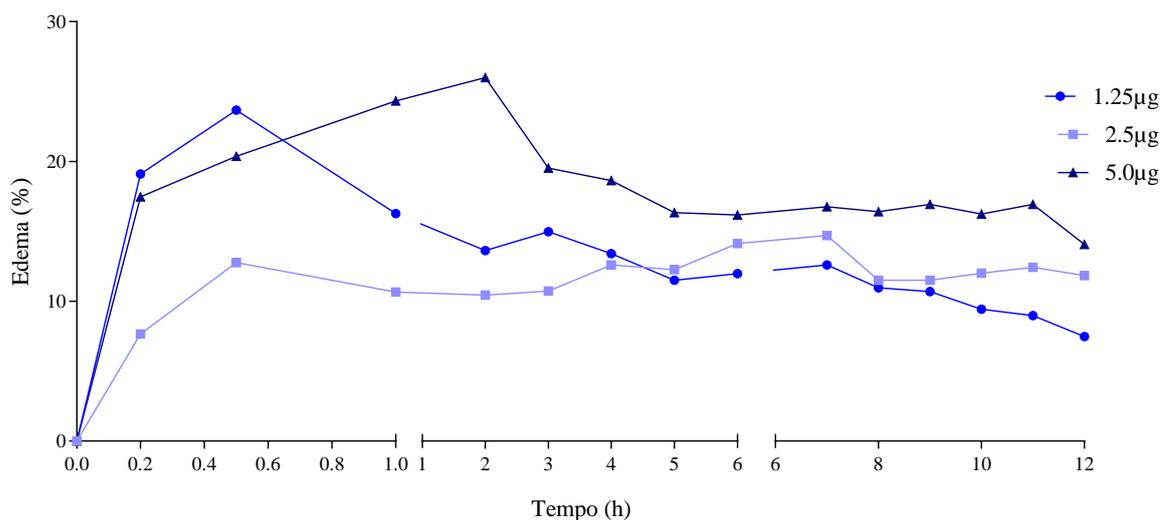
As amostras de pele, 120 minutos após a injeção do veneno, apresentaram vários focos hemorrágicos distribuídos na região epidérmica sobreposta a hipoderme. Não fora encontrado trechos de congestão vascular e a visualização dos vasos sanguíneos foi comprometida devido a intensa hemorragia (Figuras 3 J e L). Ainda, pode-se observar uma hipoderme totalmente desconfigurada, preenchida por células sanguíneas e intensa alteração morfológica dos adipócitos devido a intensa saponização (Figura 3 L).

3.4 Atividade edematogênica

O veneno de *B. erythromelas* (diluído em 50 µL de salina; 6 animais por grupo) foi injetado pela via subcutânea na pata direita dos camundongos *Swiss*, para a determinação da atividade edematogênica. O tamanho do edema foi acompanhado até 12 horas após a inoculação. A amplitude do pico do edema foi proporcional à dose de veneno (Figura 10 A), bem como a evolução do perfil edematogênico. O edema induzido pelo veneno de *B. erythromelas* apresentou um P_{máx} em 0,5 horas (30 minutos), apresentando regressão do edema nos momentos subsequentes. Foi possível observar a não resolução do edema induzido pelo veneno em até 12 horas após a inoculação (Figura 4 A).

Doses superiores ou igual 2,0 µg de veneno causaram a formação de lesões hemorrágicas. A formação das manifestações hemorrágicas desencadearam a formação de platôs durante o mapeamento da atividade edematogênica, resultando assim, numa alternância entre o aumento e a regressão da porcentagem de edema de pata.

A



B



Figura 4 - Avaliação da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops erythromelas*: (A) Perfil temporal da resposta edematogênica induzida por diferentes doses do veneno de *Bothrops erythromelas*. (B) Manifestações hemorrágicas modulada pelo veneno de *Bothrops erythromelas* durante o ensaio da atividade edematogênica. Fotos: Originais de Joeliton Cavalcante, 2018.

Após a elucidação do perfil da atividade edematogênica, ou seja, que o veneno leva 0,5 hora para apresentar atividade edematogênica máxima, utilizou-se então o tempo supramencionado (pico de edema) para se determinar a DME do veneno de *B. erythromelas*. Dessa forma, o presente ensaio permitiu o *insight* de que, 1,25µg de veneno

é responsável por induzir 23,6% de edema, auxiliando na projeção das doses utilizadas na próxima etapa.

Posterior a constatação da atividade edematogênica desencadeada tempo-resposta, pode ser observado uma relação de dose-resposta na atividade induzida pelas diferentes quantidades de veneno de *B. erythromelas* (1,25; 1,75; 2,0; 2,5 e 5,0 μg) testadas. A dose correspondente a indução de 30% do aumento do volume da pata (edema) foi de $\pm 1,75\mu\text{g}$ (Figura 5). Assim como nos ensaios do mapeamento do perfil edematogênico, foi constatado que doses superiores a $\pm 1,75\mu\text{g}$ causam lesões hemorrágicas. Isso compromete a biodistribuição do veneno, interferindo conseqüentemente, na evolução da bioatividade como evidenciado pela redução do potencial edematogênico. Em contraste, doses inferiores a 1,75 μg induziram aumento inferior a 30%. Entretanto, todas as doses induziram edema estatisticamente significativo quando comparados ao controle (Figura 5).

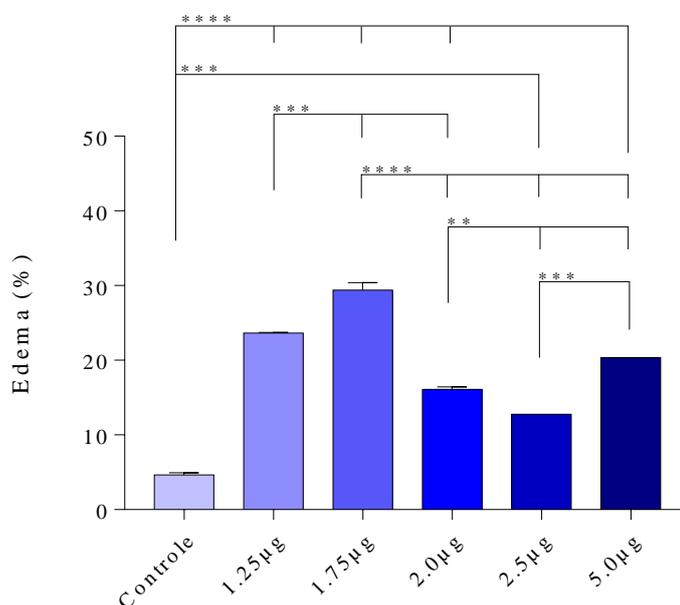


Figura 5 - Avaliação da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops erythromelas*: Determinação da dose mínima edematogênica. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

3.5 Análise histopatológica

A análise histopatológica das seções da almofada da pata desses camundongos expostos ao veneno mostrou separação dermo-epidérmica em todas as concentrações de veneno adotadas para o estudo. Adicionalmente, o veneno de *B. erythromelas* induziu

infiltração de células inflamatórias e eritrócitos extravasados, o que caracteriza um cenário hemorrágico intenso.

As imagens histopatológicas apresentam hemorragia tissular progressiva. A injeção com PBS adotada como controle no experimento não apresentou capacidade de indução hemorrágica (Figura 6 A). Quando administrado uma dose correspondente a 1,25 μg de veneno de *B. erythromelas*, pode-se verificar extravasamento sanguíneo da hipoderme até, de forma parcial, a epiderme. Nessa concentração pode-se observar o comprometimento da junção dermo-epidérmica (Figura 6 B). Dobrando a dose para 2,5 μg (Figura 6 C), ocorreu o aumento da distância entre a derme-epiderme e em paralelo, a intensificação hemorrágica, apresentando-se mais intensa e atingindo toda a epiderme. As doses de veneno correspondentes a 1,25 e 2,5 μg de veneno de *B. erythromelas* foram responsáveis por causar um cenário característico de inflamação serosa, marcada pelo derramamento de fluído, que pode ser derivado do plasma que se acumula nas bolhas formadas devido a separação dermo-epidérmica. Por outro lado, a dose de veneno correspondente a 5,0 μg (Figura 6 D), acarretou um cenário característico da formação de bolhas com conteúdo sanguinolento. O presente cenário foi constatado pela presença marcante de eritrócitos dentro da bolha.

Sequencialmente, procedeu-se a análise morfométrica da distância dermo-epidérmica induzida pelo veneno de *B. erythromelas*. Comparadas ao controle, que se utilizou o PBS, os microambientes lesionados com o veneno apresentaram dissimilaridade, sendo constatada uma distância entre a derme e epiderme de forma progressiva (Figura 7).

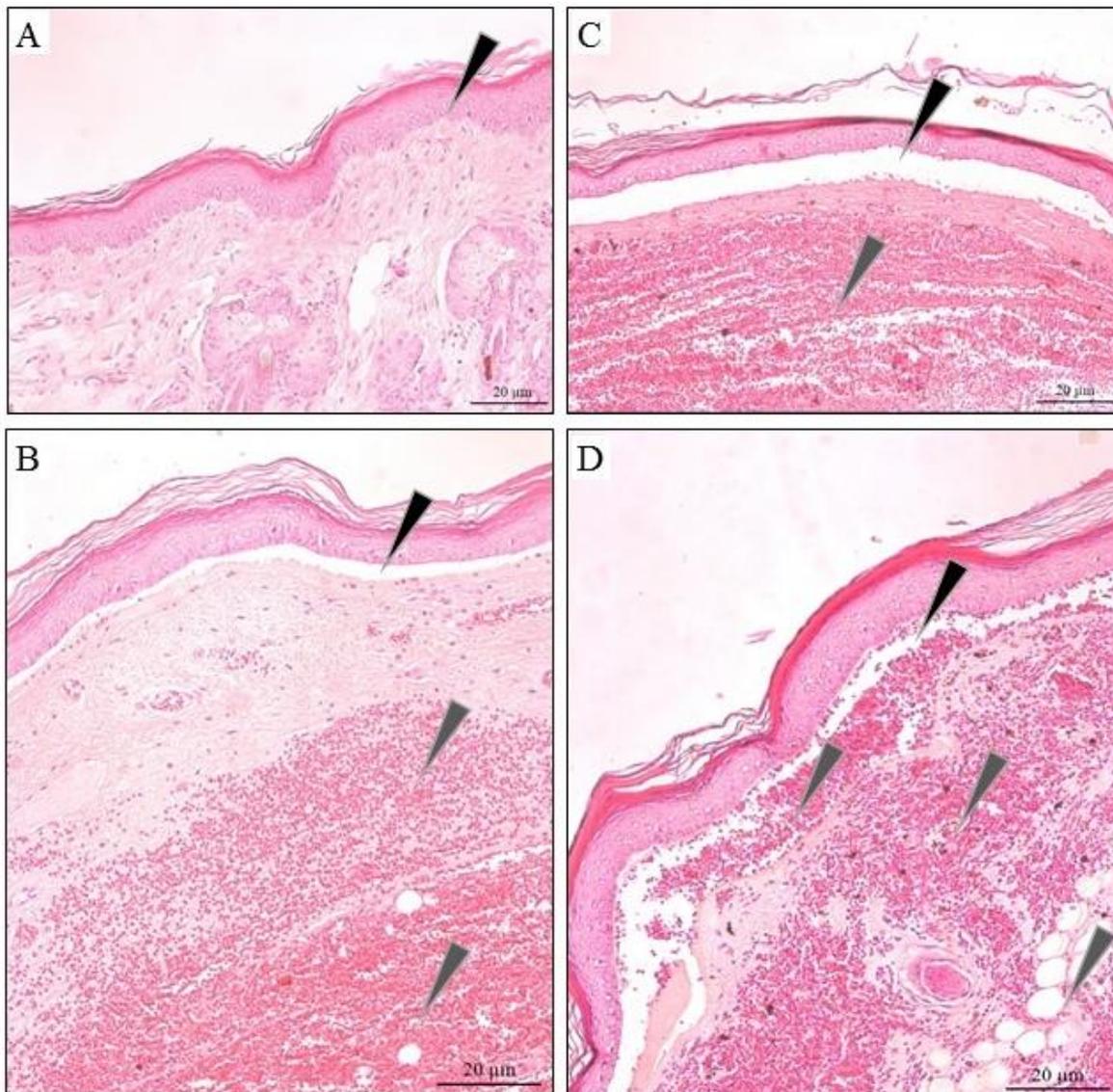


Figura 6 – Análise histopatológica dos microambientes tissulares da pata de camundongos *swiss* afetados com a injeção do controle (A) e 1,25; (B) 2,5; (C) e 5,0 µg (D) de veneno de *B. erythomelas*. Setas pretas indicam a separação dérmico-epidérmica, exceto no controle, no qual a seta indica a junção supramencionada sem alterações. Setas cinzas indicam a presença de hemorragia (células inflamatórias e eritrócitos extravasados) na derme e hipoderme.

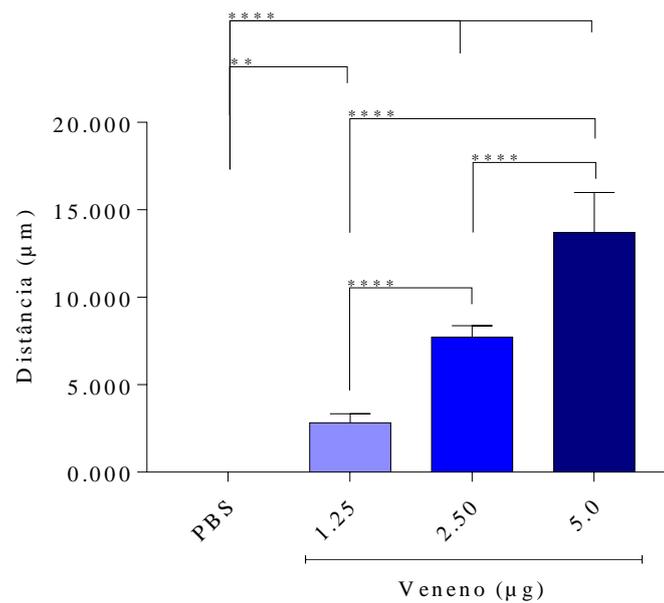


Figura 7 - Avaliação da atividade edematogênica do veneno de *Bothrops erythromelas*: Análise microscópica quantitativa da separação dermo-epidérmica induzida nas patas de camundongos *swiss*. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 pontos distintos da separação dermo-epidérmica. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

3.6 Alterações hematológicas

No presente estudo, a administração de 1,75 μg do veneno de *B. erythromelas* via intraplantar não induziu alterações significativas nos valores hematológicos atribuídos a série vermelha (Figura 8). Os valores de eritrócitos totais (RBC), hemoglobina (HGB) e o hematócrito (HCT), permaneceram constantes quando comparado ao grupo controle, injetado com PBS, dentro dos períodos analisados.

Semelhantemente, os camundongos envenenados não apresentaram níveis plaquetométricos dissimilares (Figura 9) quando comparados ao grupo controle. Aos 30 minutos após envenenamento, os valores de plaquetas entre o grupo controle e envenenamento apresentaram valores proporcionais. Decorrendo 60 minutos após o envenenamento, os valores não apresentaram redução, não diferindo do grupo controle injetado com PBS.

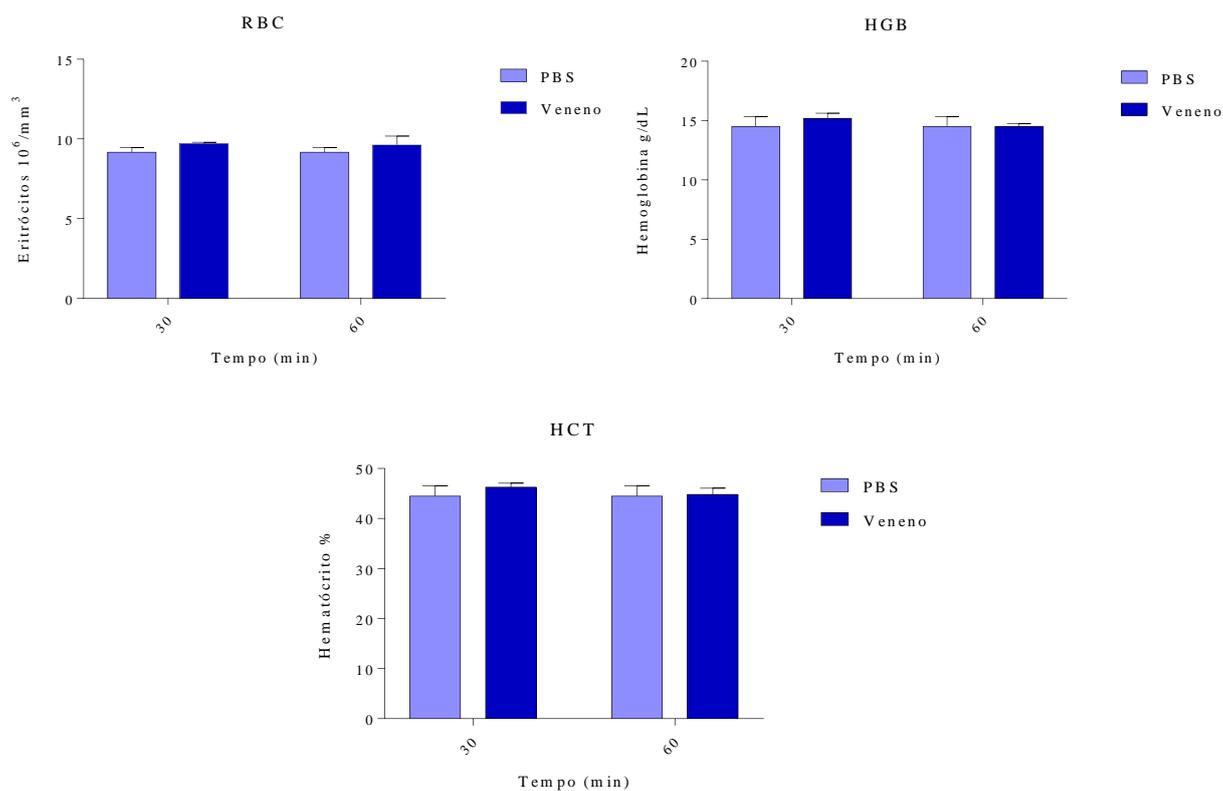


Figura 8 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos dos eritrócitos totais (RBC) circulantes, níveis de hemoglobina (HGB) e hematócrito (HCT). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p<0.1$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ e **** $p<0.0001$.

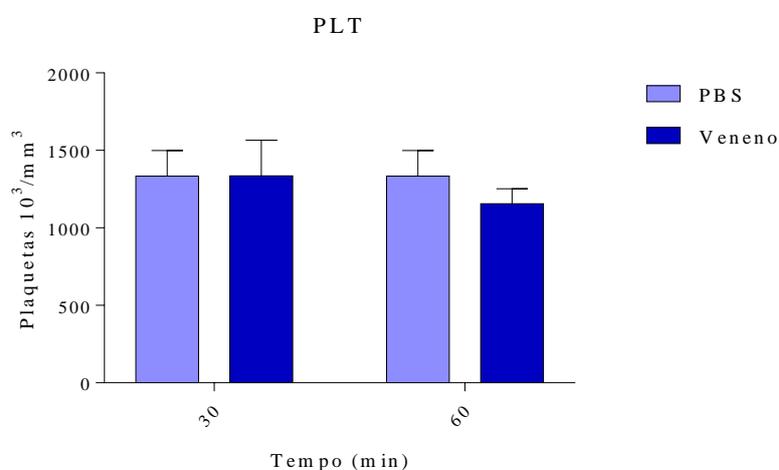


Figura 9 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos de plaquetas totais circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p<0.1$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ e **** $p<0.0001$.

Por outro lado, os valores referentes ao leucograma dos camundongos envenenados apresentaram dissimilaridade estatisticamente significativa quando comparados aos valores do grupo controle. É possível verificar que o veneno de *B. erythromelas* induziu um quadro de leucopenia constante quando considerado o parâmetro tempo pós-envenenamento (Figura 10).

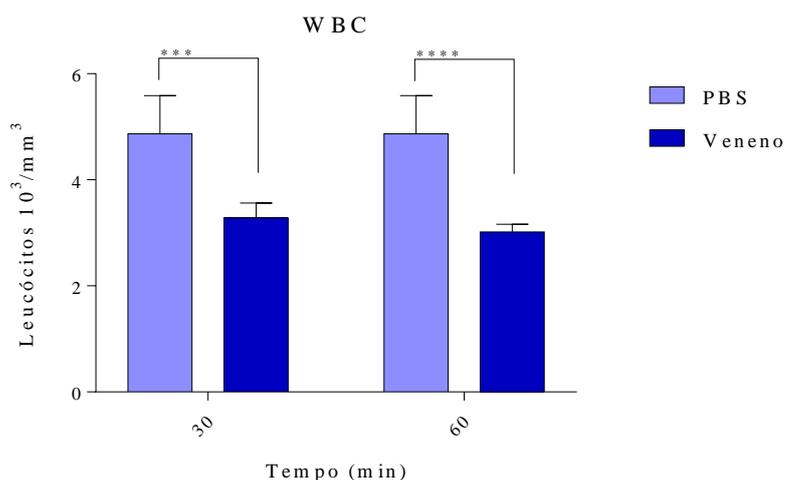


Figura 10 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos de leucócitos totais circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

Após certificar-se que o veneno de *B. erythromelas* induziu um quadro de leucopenia, procedeu-se a contagem diferencial de leucócitos, visando elucidar quais as células brancas que decresceram quantitativamente. A contagem absoluta de neutrófilos apresentou redução significativa (Figura 11 A) 30 minutos, após a injeção do veneno. Por outro lado, quando avaliada a contagem relativa, essa apresentou um aumento expressivo 60 minutos após a injeção do veneno, o que caracteriza um quadro de neutrofilia em comparação com ao controle (Figura 11 B).

Na contagem dos monócitos observou-se um quadro de monocitopenia absoluta (Figura 12 A). Os valores dos monócitos circulantes apresentaram-se constantes 30 minutos após o envenenamento experimental quando comparados ao controle. Em 60 minutos, constatou-se o decréscimo dos valores numéricos absolutos de monócitos. Por

outro lado, os valores relativos de monócitos (Figura 12 B) não apresentaram diferença significativa.

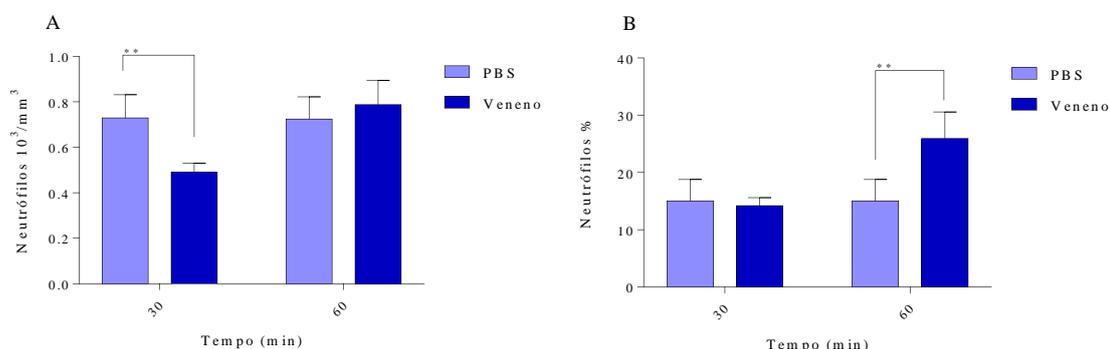


Figura 11 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de neutrófilos circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

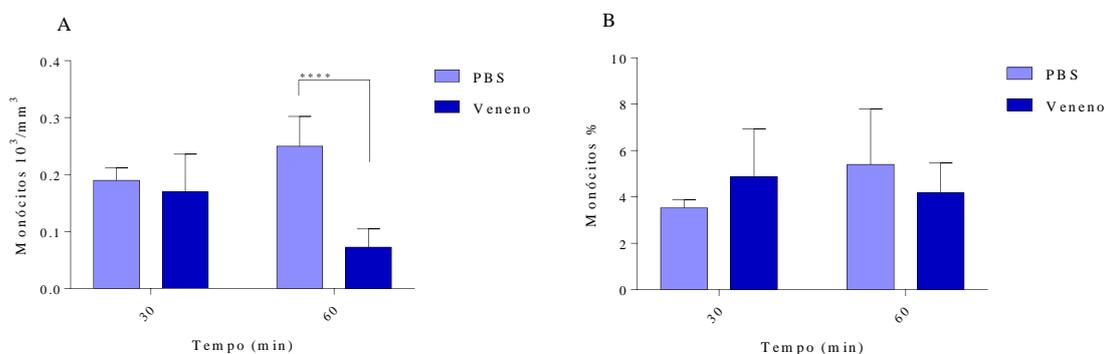


Figura 12 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de monócitos circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

Em relação a contagem dos linfócitos, houve um quadro de linfopenia significativa em relação ao grupo controle. Após 30 minutos, observou-se os valores mais significativos em relação ao controle, e 60 minutos após a administração do PBS e do veneno, em ambos os casos, os valores absolutos de linfócitos decaíram (Figura 13 A). Os valores relativos apresentaram constante, sem ser constatada qualquer alteração significativa (Figura 13 B).

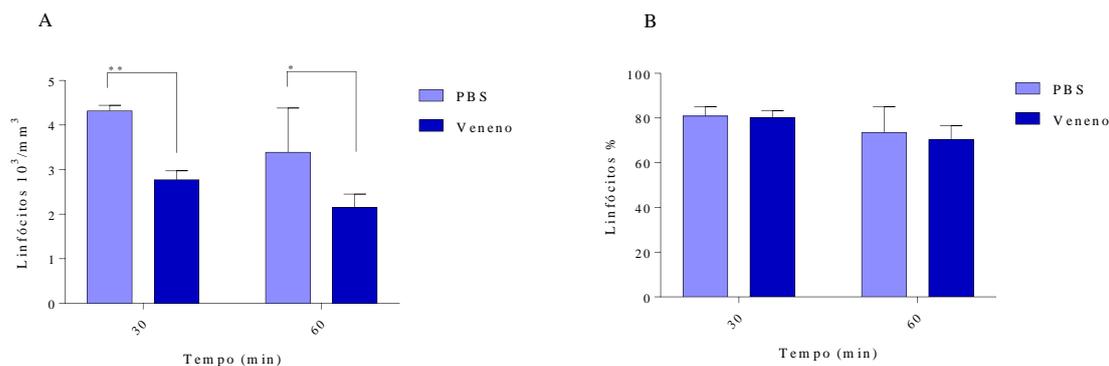


Figura 13 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos totais circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

A contagem de linfócitos diferencial em típicos e atípicos também apresentou dissimilaridade significativa. Os valores de linfócitos típicos absoluto não apresentou dissimilaridade (Figura 14 A). No que se refere aos dados relativos, estes apresentaram cenário semelhante, em ambos os períodos da análise, 30 e 60 minutos caracterizados pelo constante número de células nos grupos tratados com o veneno (Figura 14 B). Os valores absolutos de linfócitos atípicos (Figura 14 C) revelaram um quadro de linfopenia. Por outro lado, os valores relativos demonstraram constantes aos 30 minutos, sem ser constatada diferença significativa (Figura 14 D).

No que diz respeito às contagens dos eosinófilos, constatou-se que tanto os parâmetros absolutos (Figura 15 A) quanto os relativos (Figura 15 B) não apresentaram dissimilaridade significativa entre controle e envenenados.

Tendo em consideração os valores quantitativos absolutos (Figura 16 A) e relativo (Figura 16 B) de basófilos, percebe-se similaridade entre os grupos tratados com o PBS e com o veneno de *B. erythromelas*. Na contagem absoluta, aos 30 minutos, verifica-se uma quantidade significativa de basófilos entre os grupos, com a subsequente queda desses aos 60 minutos. Não foi constatado basofilia relativa no grupo envenenado quando em contraste com o grupo tratado com o PBS.

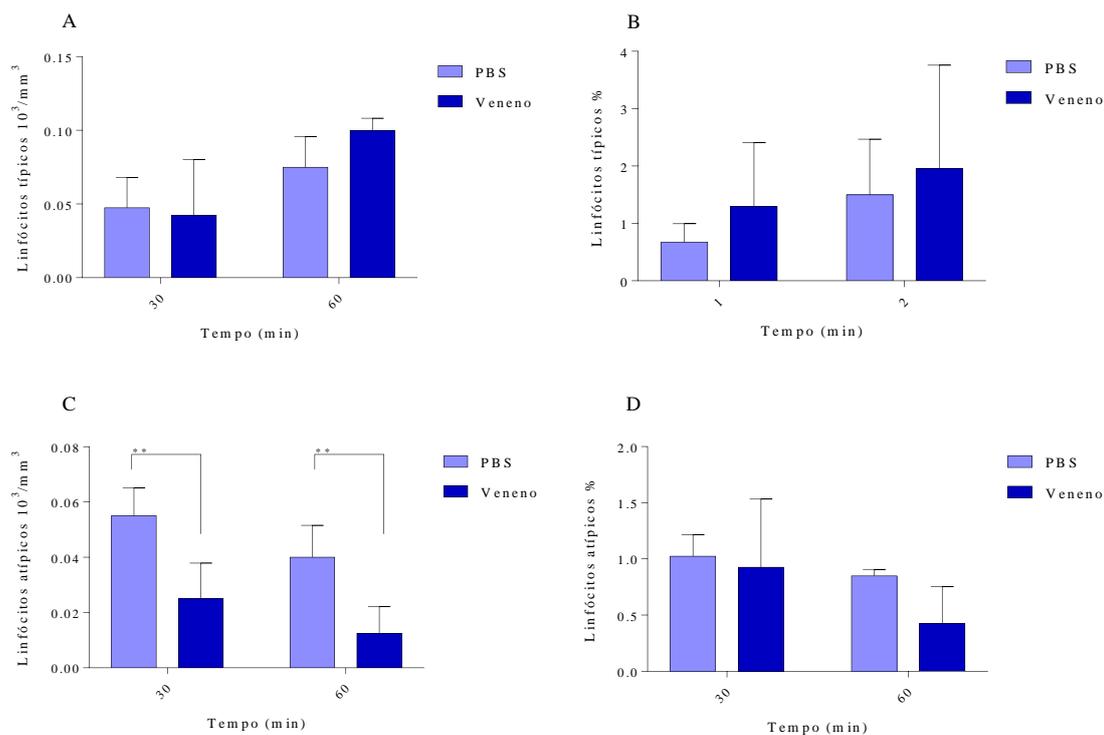


Figura 14 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos e relativos de linfócitos típicos (A e B) e atípicos (C e D) circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

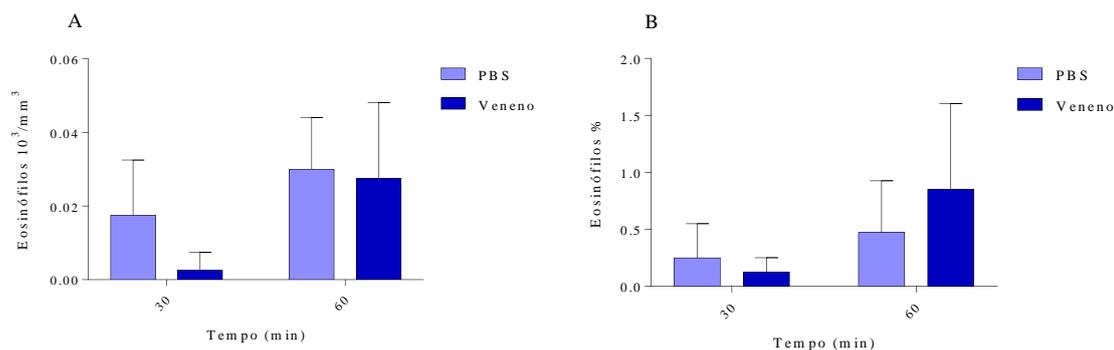


Figura 15 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de eosinófilos circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

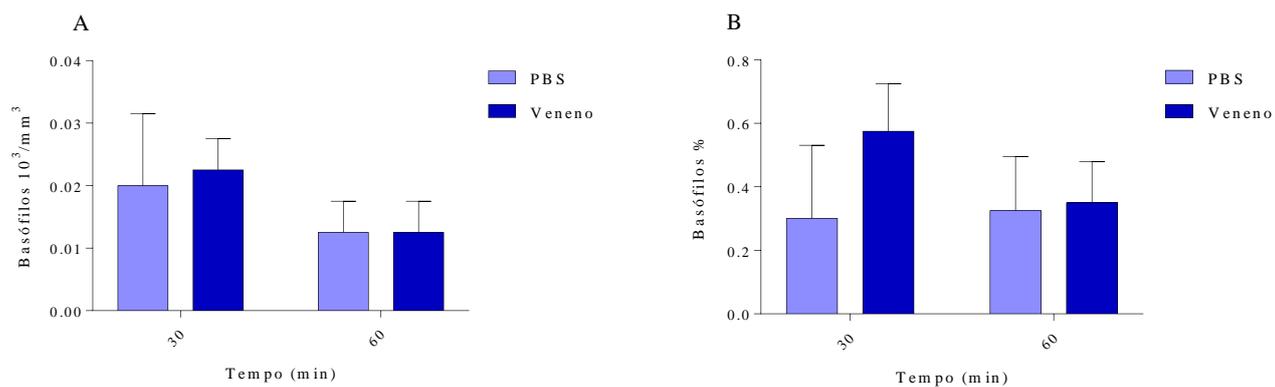


Figura 16 - Análise comparativa de parâmetros hematológicos após envenenamento experimental de camundongos *swiss* por *Bothrops erythromelas*: Valores absolutos (A) e relativos (B) de basófilos circulantes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

4 Discussão

4.1 O veneno de *Bothrops erythromelas* apresenta um alto potencial coagulotóxico

Os dados obtidos através da investigação coagulotóxica do veneno de *B. erythromelas* sugerem que o veneno apresenta alto potencial pró-coagulante. Ao utilizar valores de venenos variantes entre 0,12 a 1,25 µg de veneno, nenhuma das doses caracterizou-se como a dose mínima coagulante para este veneno. A dose mínima coagulante refere-se ao resultado expresso como a mínima quantidade de veneno/proteína que induza a formação da rede de fibrina em 60 segundos (GUTIÉRREZ et al., 2017). Neste estudo foi verificada que a menor quantidade de veneno utilizada, 0,12 µg, induziu o processo de coagulação com a obtenção de coágulos de fibrina sólidos e estáveis após 28.91 segundos.

Outros estudos indicam que o veneno de *B. erythromelas* fêmea de origem baiana apresenta um potencial coagulante idiossincraticamente menor (DMC > 200 µg / mL) (SANTORO et al., 2015) que o documentado no presente estudo. Por outro lado, um *pool* de veneno de outros indivíduos da espécie em questão, procedente do Instituto Butantan, apresenta uma DMC estimada em 5,5 µg / mL (FURTADO et al., 1991). Nessa pesquisa, o *pool* de veneno extraído de dois indivíduos machos adultos, procedentes de Icapuí, estado do Ceará e Upanema, estado do Rio Grande do Norte. Consequentemente, a luz dessa discussão sugere uma possível variação sexual na atividade coagulante do veneno de *B. erythromelas*, ainda não investigada.

Uma das toxinas responsáveis pelo alto efeito sobre a coagulação que o veneno de *B. erythromelas* desencadeia é a berytractivase. Berytractivase é um ativador de protrombina que compreende aproximadamente 5% do veneno bruto. Apresenta uma alta similaridade estrutural com outras metaloproteinases. Entretanto, essa toxina possui atividades funcionais distintas, caracterizada também por não ser indutora de manifestações hemorrágicas (SILVA et al., 2003).

4.2 Potencial hemorrágico do veneno de *Bothrops erythromelas*

A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) é um “padrão ouro” para a avaliação pré-clínica de novos soros e/ou substâncias, de origem natural e/ou sintética, com potenciais

para a terapêutica da síndrome hemorrágica durante um envenenamento ofídico (GUTIÉRREZ et al., 2017). Segura et al. (2010) ao analisarem o potencial neutralizante de antivenenos produzidos na América Latina identificaram a DMH de *Bothrops asper* em 1,5 µg (Costa Rica), *B. atrox* em 1,4 µg (Peru), *B. atrox* 1,4 µg (Colombia), *B. jararaca* em 0,26 µg (Brasil) e *B. neuwiedi* em 7,0 µg (Bolívia). Evidenciou-se, neste estudo, que a DMH do veneno da *B. erythromelas* é 3,5 µg, diferindo-se das DMHs apresentadas pelas espécies supracitadas.

Um outro estudo conduzido com o veneno de *B. erythromelas*, por Jorge et al. (2015), estimou a DMH do veneno de *B. erythromelas* em 5,0 µg. A contraposição dos dados obtidos refletem a variação intraespecífica do veneno dessa espécie, que mesmo apresentando um proteoma conservado, apresenta variações quanto ao teor de proteínas de determinadas classes de toxinas que compõe o veneno da espécie em questão (JORGE et al., 2015).

O conhecimento sobre a capacidade de venenos botrópicos induzirem hemorragia local já provém de estudos e relatos em outrora. Os primeiros registros são dados por Lacerda, em 1984, trabalhando no Brasil, descreveu essa manifestação em animais envenenados. Em seu relato sobre os efeitos patológicos encontrados, tem-se *ipsis litteris* que:

"Le tissu cellulaire sous-cutané, est tout infiltré et présente de place en place des taches noirâtres, des points violacés et épars, des nuances livides diffuses et de nombreuses extravasations sanguines... Le tissu cellulaire, qui couvre les muscles, est également infiltré, il offre un aspect gélatineux et est plus ou moins imbibé du sang noir, en partie coagulé"

"O tecido celular subcutâneo, é todo infiltrado e apresenta de um lugar para outro, manchas pretas, manchas arroxeadas e dispersas, nuances difusas e vivas e muitos extravasamentos sanguíneos ... O tecido celular, que trabalha os músculos, também é infiltrado, tem uma aparência gelatinosa e é mais ou menos encharcado de sangue negro, parcialmente coagulado"

Outros esforços dos cientistas direcionados a o processo hemorrágico dos venenos de serpentes viperídeas se estenderam ao longo da primeira metade do século XX. Tais investigações foram propulsoras para o entendimento do mecanismo da atividade

supramencionada, descrevendo observações macroscópicas em tecidos afetados e introduzindo a análise histológica de lesões hemorrágicas em órgãos.

Outrossim, pesquisadores demonstraram a ação dos venenos de viperídeos no sistema de coagulação e nas plaquetas, e especularam sobre a interface desses efeitos na patogênese hemorrágica. Por conseguinte, a atividade hemorrágica dos venenos de serpentes foi um tópico de interesse para os primeiros toxicologistas clínicos e experimentais devido à relevância da investigação de tais manifestações na fisiopatologia geral do envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 2017).

Evidenciada a capacidade de indução da hemorragia nos experimentos de edema de pata e nos estudos de DMH, adicionou-se então ao *scopo* da pesquisa, o estudo das alterações iniciais na pele de camundongos a nível histológico, antes do estabelecimento da lesão hemorrágica. A análise histológica referente as lesões hemorrágicas indicam que o veneno induz hemorragia hipodérmica. Uma das prováveis explicações pelo qual essa manifestação ocorre, é devido a ação do veneno/toxinas sobre os componentes da matriz extracelular. De fato, verificou-se que no decorrer do estabelecimento da hemorragia, as fibras colágenas e a epiderme como um todo, demonstraram afrouxamento, causando alterações morfológicas das estruturas presentes no tecido.

A deflagração da hemorragia na hipoderme e o afrouxamento do tecido decorrente da ação do veneno nas fibras colágenas, já foram investigados anteriormente. Baldo et al. (2010) constataram que a jararagina, SVMPs de classe III, induz um quadro hemorrágico na hipoderme de camundongos. E que a toxina causa afrouxamento dos feixes colágenos. Assim, os efeitos histopatológicos encontrados, provavelmente, resultam da ação da jararagina sobre os componentes da matriz extracelular e, em maior predominância, sobre o colágeno.

Foram identificados, ainda, focos de congestão vascular 30 minutos após a injeção do veneno, comprovando assim, o seu efeito coagulotóxico, através da conversão de proenzimas da cascata de coagulação em fatores ativos. É comprovado que o veneno botrópico, ao ter acesso a circulação sanguínea, induz um quadro de coagulação disseminada. Esse fenômeno culmina no consumo dos fatores de coagulação – que são ativados e formam microtombos – causando a desfibrinogenação sanguínea e, conseqüentemente, tornando o sangue incoagulável.

Pode-se inferir que, o mecanismo hemorrágico do veneno de *B. erythromelas* é a combinação de efeitos sobre a parede capilar. Em adição, a hidrólise de componentes da matriz extracelular, o que causa o enfraquecimento mecânico dos vasos.

Questões referentes aos mecanismos do efeito hemorrágico do veneno de *B. erythromelas* permanecerão obscuras até a apresentação destes *insights*. O isolamento e a caracterização de toxinas hemorrágicas para esse veneno ainda são desconhecidos. Segundo investigações, SVMPs da classe P-III, são as principais toxinas envolvidas na gênese hemorrágica (FOX; GUTIÉRREZ, 2018; GUTIÉRREZ et al., 2016). Porém, a SVMP da classe P-III, Berytractivase, apresenta-se destituída de tal atividade sendo um potente ativador de protrombina (SILVA et al., 2003). Assim, a atividade hemorrágica de tal veneno, num primeiro momento, não estaria relacionada a atividade dessa SVMP da classe P-III. Há evidências crescentes de que a composição do veneno é expressivamente afetada por mecanismos pós-genômicos. Em venenos que atuam sobre o sistema hemostático, as principais famílias de toxinas que apresentam maior variabilidade - lectinas do tipo C, serina proteinases e SVMPs - são codificadas por múltiplas cópias gênicas que sofrem seleção e diversificação adicionais em níveis pós-transcricional e pós-traducional (MOURA-DA-SILVA et al., 2016).

Em virtude disso, são fornecidas com a presente investigação, as primeiras peças de um “quebra-cabeças” maior. Porém, existe a necessidade de mais estudos de cunho molecular e histoquímico que completem, apoiem ou refutem as conjecturas aqui apresentadas.

4.3 Efeito inflamatório local: O veneno de *Bothrops erythromelas* induz edema, extravasamento de sangue e diapedese

A ação dos venenos de serpentes viperídeas estabelece o cenário para uma resposta inflamatória complexa que envolve a síntese e liberação de uma multiplicidade de mediadores, bem como a ativação do sistema complemento, células imunes residentes e a infiltração de leucócitos e macrófagos como consequência da ação de substâncias quimiotáticas liberadas no tecido lesado (DELAFONTAINE, 2017, 2018, TEIXEIRA; MOREIRA; GUTIÉRREZ, 2018). Incrementos na permeabilidade vascular, como consequência da ação de vários mediadores, contribuem para o edema característico desses envenenamentos, efeito que tem várias implicações fisiopatológicas, como hipovolemia e aumento da pressão intersticial dentro dos compartimentos musculares (GUTIÉRREZ et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2018).

Inicialmente, foi elucidada a proporcionalidade entre doses crescentes do veneno, com a intensidade e duração do edema por monitoramento de até 12 horas. Nas doses maiores, o edema foi acompanhado de hemorragia local visualizada macroscopicamente. Esse ensaio inicial permitiu o reconhecimento de uma dose edematogênica máxima eficaz que estivesse isenta de fenômenos hemorrágicos macroscópicos. É importante destacar que, em termos de perfil, a curva temporal do edema induzido pelo veneno bruto do veneno de *B. erythromelas*, revela um período de instalação relativamente curto, seguido de um efeito máximo 30 minutos após a sua aplicação intraplantar, não persistindo em níveis elevados e não retornando aos níveis controles em até 12 horas.

O veneno de *B. erythromelas*, ainda pouco explorado, foi capaz de induzir edema de forma dose/tempo-resposta. Como evidenciado no mapeamento da atividade edematogênica, o veneno apresenta um pico de atividade máximo (P_{máx}) aos 30 minutos pós injeção. P_{máx} análogo ao encontrado no presente estudo foi relatado por Felix-Silva et al. (2017), que em busca da elucidação do potencial antiofídico do extrato aquoso de *Jatropha gossypifolia* encontraram também uma P_{máx} edematogênico de 30 minutos. Os autores não relatam a DME para o veneno de *B. erythromelas*.

Outro veneno que apresenta P_{máx} edematogênico semelhante é o de *B. lanceolatus* (Fer-de-Lance). Experimentalmente - partindo da utilização do mesmo protocolo empregado no presente estudo - Delafontaine (2016) testou diferentes doses (0,5; 1,0 e 2,0

μg) do veneno de *B. lanceolatus*, e constatou que, independente da dose aplicada, a formação do edema apresentava um $P_{\text{máx}}$ inalterado, constante em 30 minutos.

Oliveira (2014) constatou a não dissimilaridade estatística significativa na porcentagem do edema induzida pelo veneno de *B. atrox* entre 1 e 6 horas. Seus dados sugerem que o veneno apresenta um platô de atividade (entre 1 e 6 horas) diferente do perfil edematogênico de *B. erythromelas*, que após atingir o $P_{\text{máx}}$ em 30 minutos, nos momentos subsequentes inicia-se o processo de redução edematogênica.

O veneno de *B. insularis* (0,01-2,5 μg) induziu edema na pata e, em doses elevadas ($> / = 0,5 \mu\text{g}$) foi acompanhado por hemorragia. O $P_{\text{máx}}$ de resposta edematogênica ocorreu 3 horas após a injeção do veneno em todas as doses e diminuiu gradualmente (BARBOSA et al., 2003). Em comparação com o veneno de *B. erythromelas*, verifica-se diferença tanto pelo $P_{\text{máx}}$, quanto pela dose que induziu hemorragia na pata.

Quando analisado outros venenos botróticos em relação a DME pode-se perceber que o veneno de *B. erythromelas* é razoavelmente edematogênico, sendo necessário uma dose de 1,75 μg para se obter uma resposta equivalente a formação de edema (30%). Oliveira (2014) constatou que a DME para o veneno de *B. atrox* foi de 0,175 μg . Assim, o veneno de *B. erythromelas* apresenta-se menos edematogênico, uma vez que precisa de doses superiores para deflagrar a mesma resposta obtida pelo veneno de *B. atrox* em pequenas doses.

O possível papel dos processos inflamatórios na patogênese do dano tecidual local em envenenamentos tem sido explorado apenas de forma limitada. As respostas inflamatórias normais preparam o cenário para processos reparativos e regenerativos no tecido danificado, mas também podem contribuir para alterações patológicas quando não adequadamente reguladas. Entretanto, o possível papel dos processos inflamatórios na patogênese do dano tecidual local em envenenamentos tem sido explorado apenas de forma limitada (TEIXEIRA; MOREIRA; GUTIÉRREZ, 2018).

O edema é consequência da atuação sinérgica de toxinas que atuam de forma direta sobre os vasos sanguíneos com outras que liberam autacóides, tais como prostaglandinas, histamina e bradicinina. Enzimas como fosfolipase A2, presente na maioria dos venenos, e outras proteases, podem estar envolvidas na formação do edema, por ação direta sobre células endoteliais ou por ativar a cascata do complemento (GUTIÉRREZ et al., 2018).

Outro possível mecanismo é à ação dos venenos nos vasos linfáticos. Esse efeito pode afetar pelo menos dois aspectos do processo de envenenamento. Primeiro, o veneno

pode reduzir a capacidade dos vasos linfáticos de remover o excesso de líquido acumulado no líquido intersticial como consequência do edema. Também pode ter um efeito sobre o sistema nervoso central e na absorção de componentes do veneno, uma vez que os vasos linfáticos desempenham um papel fundamental na toxicocinética do veneno.

Além do edema, a injeção do veneno de *B. erythromelas* em concentrações a partir de 2,0 µg, foi acompanhada por manifestações hemorrágicas, que puderam ser perceptíveis macroscopicamente. Essas foram desencadeadas pelas altas concentrações de toxinas hemorrágicas e procoagulantes. Quando inoculadas no organismo, as toxinas hemorrágicas e coagulantes resultaram no extravasamento sanguíneo, e, conseqüentemente, na formação de coágulos localizados ao redor do local do envenenamento. Tal fato pode ter comprometido o tempo de liberação sistêmica de importantes toxinas peptídicas, o que pode ser percebido pela flutuação no efeito edematogênico.

A formação de lesões hemorrágicas com o conseqüente coágulo formado no local da picada, pode ter um efeito semelhante, o que resulta neste caso em um envenenamento que não consegue subjugar o item de presa pretendido. Se esse for o caso, é um exemplo de sinergia negativa, em que as toxinas não funcionam juntas, mas atuam umas contra as outras. A interferência da toxina pró-coagulante na liberação sistêmica de toxinas pode assim constituir uma forte pressão de seleção negativa que resulta na exclusão da primeira do veneno apesar da diminuição da redundância funcional que isso acarreta (JACKSON et al., 2016).

Na análise histológica de microambientes tissulares afetados constatou-se que o veneno de *B. erythromelas* afeta a junção dermo-epidérmica, o que resulta na formação de uma bolha, que aumenta conforme a administração de doses progressivas de veneno. Na concentração mais baixa do veneno utilizada, já foi possível diagnosticar a separação entre a derme e epiderme. Porém, um achado inesperado foi a presença do extravasamento de eritrócitos e outras células sanguíneas com a caracterização de um quadro hemorrágico que contribuiu para o espessamento da pata dos camundongos, que mesmo imperceptível a escala macroscópica. Ambos os efeitos desencadeados, separação dermo-epidérmica e hemorragia, permaneceram como achados-chave em todas as concentrações do veneno utilizadas. Juntos, estes dois mecanismos, podem constituir os principais responsáveis pelo efeito edematogênico estabelecido após envenenamento experimental com o veneno de *B. erythromelas*.

As SVMPs, particularmente as da classe PI, propiciam de forma experimental em camundongos a separação da dermo-epidérmica, bem como o surgimento da ulceração que vem sendo documentado em casos clínicos (JIMÉNEZ et al., 2008, OLIVEIRA et al. al., 2017). Análises com imuno-histoquímica têm revelado a perda parcial de laminina na interfase dermo-epidérmica (JIMÉNEZ et al., 2008, GUTIÉRREZ et al., 2009).

A presença de fragmentos de proteínas da membrana basal detectada em exsudatos coletados após seccionar a pele em camundongos injetados com um PI SVMP (GUTIÉRREZ et al., 2009) resultado da hidrólise de proteínas na interfase dermoepidérmica, a causa mais provável de formação de bolhas. Porém, a identidade dos principais componentes da membrana basal que determinam a separação dermo-epidérmica permanece desconhecida.

4.4 Alterações hematológicas durante o desenvolvimento do edema

O envenenamento é caracterizado por alterações sistêmicas, avaliadas através de parâmetros hematológicos utilizados para o acompanhamento do quadro clínico, diagnóstico e evolução do caso. Com base na análise dos hemogramas de camundongos envenenados, percebe-se que o veneno de *B. erythromelas* e suas toxinas não têm como alvo os eritrócitos. Todos os valores da série vermelha, número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, permaneceram dentro dos valores normais quando comparados ao grupo controle. Contrapondo os dados obtidos no presente trabalho, Senise et al. (2015) identificaram a presença de hemólise intravascular, que durou pelo menos 6 horas após a administração do veneno de *B. jararaca*. Os autores relatam que a cor das amostras do plasma e da urina de camundongos envenenados era avermelhada, sugerindo hemoglobinemia. Conseqüentemente, foi observado que os níveis de hemoglobina no plasma estavam notavelmente elevados, especialmente às 3 e 6 horas, com retorno a normalidade às 24 horas.

Em até 60 minutos após a injeção do veneno de *B. erythromelas*, os camundongos não apresentaram um quadro de trombocitopenia. Santoro e Sano-Martins (2004) constataram que o veneno de *B. jararaca* induzia uma diminuição acentuada das plaquetas em 1 hora após o envenenamento e que esse quadro de trombocitopenia permanecia até 96 horas. Cavalcante et al. (2016) ao estudar os dados plaquetométricos de pacientes envenenados por *B. erythromelas*, constataram que 3 horas após envenenamentos, ocorria

um quadro trombocitopênico. A presente investigação fornece dados que alertam para a importância do rápido atendimento ao paciente. A partir do exposto, sugere-se que o quadro trombocitopênico, induzido pelo veneno de *B. erythromelas*, ocorra em um período de tempo entre 1 e 3 horas após a exposição do indivíduo. Provavelmente, essa manifestação sistêmica já relatada, poderia ser parcialmente ou totalmente inibida com a introdução precoce da soroterapia.

Os parâmetros hematológicos, neste estudo, foram analisados após a injeção intraplantar do veneno de *B. erythromelas*, com a posterior formação do edema. Como anteriormente foi constatado, que o pico máximo de atividade edematogênica do veneno corresponde a 30 minutos e que sua queda ocorre nos momentos subsequentes, foram selecionados 30 e 60 minutos para a investigação. Assim, os valores plaquetimétricos sugerem que não existe envolvimento das plaquetas circulantes em relação ao edema desencadeado pelo veneno. É de conhecimento que as plaquetas estão relacionadas com a presença da algesia e edema. Yamashita et al. (2011) obtiveram resultados contraditórios aos aqui apresentados ao constatarem uma redução de cerca de 25% do edema modulado pelo veneno de *B. jararaca* em ratos trombocitopênicos. Sugerindo assim, uma interface plaquetas-edema no modelo de envenenamento.

No que se refere a análise do leucograma dos camundongos, observou-se uma queda significativa nos leucócitos totais em relação ao grupo controle, o que caracteriza um quadro clínico de leucopenia aos 30 e 60 minutos após o envenenamento. Diferente dos resultados obtidos, Yamashita (2013) identificou um quadro de leucocitose induzida pelo veneno de *B. jararaca* após 3 e 6 horas decorridas do envenenamento. De forma similar, Santoro et al. (2008) identificaram um quadro de leucocitose em pacientes picados por *B. jararaca*. Entretanto, corroborando com o presente estudo, Oliveira et al. (2017) identificaram um quadro de leucopenia induzido de forma dose-resposta pelo veneno de *Philodryas olfersi* em camundongos.

O veneno é considerado uma inovação predatória no reino animal (CASEWELL et al., 2013). Em contrapartida assim, a defesa fisiológica da presa/vítima contra a ação do envenenamento é tentar capturar as toxinas perto do local da picada, com a mobilização de leucócitos para gerar uma armadilha extracelular (KATKAR et al., 2016). É importante mencionar que o processo de migração celular, como uma estratégia de defesa para captura de toxinas presentes no tecido local consiste também em um mecanismo de ativação do sistema de reparo tecidual (GUTIÉRREZ et al., 2018). Uma vez que o sistema de entrega

do veneno, em associação a toxinas citotóxicas danifica o local (JACKSON; FRY, 2016), há como resultado a presença de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio lesado (RUCAVADO et al., 2016).

A migração de leucócitos está relacionada a uma resposta inflamatória, assim como o extravasamento de líquidos e a vasodilatação arteriolar. Stock e Hoffman (2000) mostram que a leucopenia é uma queda global do número de células relacionadas à resposta imunológica do organismo. Frequentemente, essa manifestação é desencadeada pela redução no número circulante de neutrófilo, seguido da redução de leucócitos. Neutrófilos e monócitos desempenham um importante papel na defesa do organismo através da fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios. Entretanto, o neutrófilo é o tipo celular predominante durante a fase aguda do processo inflamatório, sendo depois substituído pelos monócitos (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2005).

Os valores hematológicos de contagem de neutrófilos, valores absoluto e relativo, revelaram um quadro de neutropenia em camundongos envenenados após 30 minutos, para os valores absoluto, e 60 minutos para os relativos. Um aumento progressivo de áreas lesionadas pela ação do veneno de *B. jararacussu*, com a predominância de neutrófilos, foi constatada por Wanderley et al. (2014). Provavelmente, a neutropenia encontrada na presente investigação, ao utilizar o veneno de *B. erythromelas*, é semelhante a induzida pelo veneno de *B. jararacussu*. Isso deve-se ao fato de que os neutrófilos são uma das primeiras células a deixar a vasculatura e migrar para o tecido durante o processo inflamatório. Essas células são atraídas por quimiocinas e mediadores inflamatórios, como IL-8 e INF-g liberados pelas células endoteliais ativadas, macrófagos e mastócitos, e pelos produtos C3a e C5a do complemento ativado por veneno (DELAFONTAINE et al., 2017, 2018; OWEN et al., 2013). A migração é orientada pelo gradiente de concentração de mediadores (mecanismo denominado quimiotaxia) que são reconhecidos por receptores de superfície dos neutrófilos. Esta interação favorece o deslocamento dos neutrófilos pela matriz extracelular e sua rápida chegada ao sítio inflamatório (MESQUITA et al., 2008).

Foi verificado que os monócitos apresentaram queda 60 minutos após o presente envenenamento experimental. Após a resposta imunológica que induz a migração de neutrófilos 30 minutos após o envenenamento, a resposta agora foi substituída pela dos monócitos. Oliveira et al. (2017) constataram que o veneno de *P.olfersi* induz um quadro de monocitose.

No que se refere à população linfocitária, foi identificado um quadro de linfopenia induzido pelo veneno de *B. erythromelas* em ambos os tempos de análise. Quando investigada a diferenciação das populações linfocitárias, foi revelado que o quadro de linfopenia deu-se devido a queda do número de linfócitos atípicos. Um quadro de linfopenia também foi verificado em camundongos envenenados por *P. olfersi* por Oliveira et al. (2017). Entretanto, os autores não realizaram a diferenciação linfocitária,

Luna (2010), através da identificação de marcadores da superfície de células do sangue periférico, observou uma queda em relação ao percentual de linfócitos T 12 horas após o tratamento soroterápico. Subsequentemente, ocorreu a manutenção de níveis semelhantes nos pacientes leves e um ligeiro aumento seguido de leve diminuição ou manutenção de níveis semelhantes antes do tratamento em pacientes graves ou moderados.

O quadro de linfopenia sugere que, a queda do número de linfócitos indicaria a migração dessas células para os tecidos e sistemas afetados, contribuindo e/ou regulando os quadros inflamatórios observados; com isso, sua diminuição no sangue periférico. No entanto, com o fim do tratamento e a remissão dos sintomas e o equilíbrio percentual desses linfócitos seria estabelecido.

Finalmente, as populações de basófilos e eosinófilos não apresentaram alterações. Sugere-se que essas células, nas condições experimentais performadas, não participam da resposta imunológica em um prazo de até 60 minutos após o envenenamento. Oliveira et al. (2017) identificaram um quadro de basofilia em camundongos 6 horas após envenenamento experimental por *P. olfersi*.

5 Considerações finais

O presente trabalho relata a primeira caracterização dos efeitos locais e hematológicos deflagrados pelo veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, reproduzidos experimentalmente em modelos murinos. O veneno de *B. erythromelas* demonstrou um efeito tóxico potente e um alto potencial coagulante.

Quanto ao efeito hemorrágico, o veneno apresentou Dose Mínima hemorrágica estimada em 3,5 µg. As lesões hemorrágicas locais manifestaram-se inicialmente aos 15 minutos, com trechos de congestão vascular, e se estabeleceu aos 120 minutos após o envenenamento. A hemorragia se concentrou, especialmente, na hipoderme, e foi acompanhada por saponificação.

No que se refere ao efeito edematogênico modulado pelo veneno de *B. erythromelas*, houve elucidação no tempo-dose do desenvolvimento do edema. A constatação de que o desenvolvimento máximo da atividade em questão ocorre em 30 minutos após a inoculação, fornece um novo subsídio para que os métodos de avaliação de ensaios de neutralização possam ser mais efetivos. Os ensaios são realizados de forma padrão, em que o edema e a neutralização dessa manifestação são, geralmente, avaliados em uma hora após a injeção, o que podendo resultar em dados falso-positivos para o veneno de *B. erythromelas*.

Adicionalmente, a não resolução do edema em até 12 horas após o envenenamento, suscita um relevante alerta para a saúde pública. Em decorrência desse efeito, existe um risco acentuado de evolução do quadro do paciente para a síndrome compartimental e, em casos mais graves, necrose tecidual. Infelizmente, até então, a aplicação de um fármaco que possa suprir a necessidade do antiveneno em neutralizar tal efeito é inexistente. Para tal resolução, quando o quadro clínico do paciente evolui, a fasciotomia não deve ser retardada, mas as condições hemostáticas do paciente consistem em um agravo para que esse procedimento possa ser realizado.

O comprometimento da junção dermo-epidérmica, que resulta na formação de bolhas, preenchidas com conteúdo plasmático ou sanguinolento, revelou a gênese da formação do edema e de bolhas no local da picada. O agravo desse cenário ocorre de forma dose-resposta. Assim, quanto maior a quantidade de veneno inoculado na vítima, maior o comprometimento dessa junção e a manifestação hemorrágica local.

Simultaneamente ao desenvolvimento do edema, está o estabelecimento de quadros de leucopenia aos 30 e 60 minutos após o envenenamento. O leucograma revelou quadros de neutrofilia, monocitopenia e linfopenia absoluta devido à queda dos valores absolutos de linfócitos atípicos. Tais achados indicam a capacidade do veneno em ativar células imunológicas, com a função de identificar e destruir células do organismo que estejam alteradas. Fato que contribui, cada vez mais, para o desenvolvimento do edema. Salienta-se que a trombocitopenia é um mal do qual o paciente pode ser poupado caso ocorra a introdução de uma terapia antivenômica em até uma hora após acidente.

Vale a pena considerar o fato de que, nosso conhecimento, referente a função das toxinas do veneno de *B. erythromelas* está longe de ser abrangente, já que poucos estudos visando o isolamento e a caracterização foram realizados. Por essa razão, especulações como as destacadas permanecerão “apenas para histórias” até que novas investigações sejam conduzidas. Pode ser que tais investigações falsifiquem algumas das conjecturas apresentadas nesse estudo. Essa vulnerabilidade à falsificação é, de fato, parte do valor das primeiras evidências aqui fundamentadas.

Os dados ora apresentados são suficientes para começar a avaliar a existência e o caráter dos mecanismos que influenciam o estabelecimento da patologia, bem como, a evolução do quadro clínico do paciente. Como os toxicologistas continuam a trabalhar, esclarecendo ainda mais sobre a composição e as atividades dos venenos, a presente investigação seguirá na busca por biomarcadores da lesão tecidual modulado pelo veneno de *B. erythromelas*. Espera-se que este trabalho preliminar ajude a incentivar pesquisas futuras nesta fascinante área.

Referências

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran-Patologia**. Elsevier Brasil, 2005.
- BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 6, p. e727, 2010.
- BARBOSA, A. M.; DO AMARAL, R. O.; TEIXEIRA, C. F.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 515-523, 2003.
- Campbell, Jonathan A. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. No. 597.96165 C3. 2004.
- CAMPBELL, J. A.; WILLIAM W. L. The venomous reptiles of Latin America. 1989.
- CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013.
- CHIPPAUX, J. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005662, 2017.
- DE OLIVEIRA, S. S.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A., ALVES, E. C., DE LIMA FERREIRA, L. C., DA SILVA, I. M., DE LACERDA, M. V. G., FAN, H. W.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MONTEIRO, W. M. Fatal stroke after *Bothrops* snakebite in the Amazonas state, Brazil: A case report. **Toxicon**, v. 138, p. 102-106, 2017.
- DELAFONTAINE, M.; VILLAS-BOAS, I.; MATHIEU, L.; JOSSET, P.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. Enzymatic and pro-inflammatory activities of *Bothrops lanceolatus* venom: Relevance for envenomation. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 244, 2017.
- DELAFONTAINE, M.; VILLAS-BOAS, I. M.; PIDDE, G.; VAN DEN BERG, C. W.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Venom from *Bothrops lanceolatus*, a Snake Species Native to Martinique, Potently Activates the Complement System. **Journal of immunology research**, v. 2018, 2018.
- DELAFONTAINE, M. P. J. **Veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*: caracterização, ativação do sistema complemento e mecanismos potenciais envolvidos no envenenamento**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J.A.; XAVIER-SANTOS, J.B.; PASSOS, J.G.; SILVA-JUNIOR, A.A.; TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v.125, p. 74-83, 2017.

FERNANDES-FERREIRA, H.; CRUZ, R. L.; BORGES-NOJOSA, D. M.; ALVES, R. R. N. Crenças associadas a serpentes no estado do Ceará, Nordeste do Brasil. *Sitientibus*, v. 11, n. 2, p. 153-163, 2012.

FOX, J.; GUTIÉRREZ, J. M. (Ed.). **Snake venom metalloproteinases**. MDPI, 2018.

GAY, C.; SANZ, L.; CALVETE, J.; PLA, D. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina. **Toxins**, v. 8, n. 1, p. 9, 2016.

GONÇALVES-MACHADO, L., PLA, D., SANZ, L., JORGE, R. J. B., LEITÃO-DE-ARAÚJO, M., ALVES, M. L. M.; ALVARES, D. J.; MIRANDA, J.; NOWATZKI, J.; MORAIS-ZANI, K.; FERNANDES, W.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; FERNÁNDEZ, J.; ZINGALI, R. B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORRÊA-NETTO, C.; FERNANDES, W. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of proteomics**, v. 135, p. 73-89, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17063, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; Escalante, T.; Rucavado, A.; Herrera, C. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 93, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; VILALLTA, M.; SÁNCHEZ, A.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; CALVETE, J.J. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 163, 2017.

GUTIÉRREZ, J.; ESCALANTE, T.; HERNÁNDEZ, R.; GASTALDELLO, S.; SARAVIA-OTTEN, P.; RUCAVADO, A. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 182, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958-975, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; HERRERA, C.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; FOX, J. W. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. **Toxicon**, 2018.

JACKSON, T. N.; KOLUDAROV, I.; ALI, S. A.; DOBSON, J.; ZDENEK, C. N.; DASHEVSKY, D.; OP DEN BROUW, B.; MASCI, P. P.; NOUWENS, A.; JOSH, P.; GOLDENBERG, J.; CIPRIANI, V.; HAY, C.; HENDRIKX, I.; DUNSTAN, N.; ALLEN, L.; FRY, B. G. Rapid radiations and the race to redundancy: An investigation of the evolution of Australian elapid snake venoms. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 309, 2016.

JACKSON, T.; FRY, B. A tricky trait: Applying the fruits of the “function debate” in the philosophy of biology to the “venom debate” in the science of toxinology. **Toxins**, v. 8, n. 9, p. 263, 2016.

JIMÉNEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2421-2428, 2008.

JOHNSTON, C. I.; JOHNSTON, C. I.; RYAN, N. M.; PAGE, C. B.; BUCKLEY, N. A.; BROWN, S. G.; O'LEARY, M. A.; ISBISTER, G. K. " The Australian Snakebite Project, 2005–2015 (ASP-20). **Medical journal of Australia**, v. 207, n. 3, p. 119-125, 2017.

JORGE, R.J.B.; MONTEIRO, H.S.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M.C.; XIMENES, R.M.; BORGES-NOJOSA, D.M.; LUNA, K.P.O.; ZINGALI, R.B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 93-114, 2015.

KASTURIRATNE, A.; PATHMESWARAN, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; JAYAMANNE, S. F.; DAWSON, A.; ISBISTER, G. K.; SILVA, H. J.; LALLOO, D. G. The socio-economic burden of snakebite in Sri Lanka. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005647, 2017.

KATKAR, G. D., SUNDARAM, M. S., NAVEENKUMAR, S. K., SWETHAKUMAR, B., SHARMA, R. D., PAUL, M., VISHALAKSHI, G. J.; DEVAJARA, S.; GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. NETosis and lack of DNase activity are key factors in *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction. **Nature communications**, v. 7, p. 11361, 2016.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; MISE, Y. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T. K. Serpentes de importância médica do nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LONGBOTTOM, J.; SHEARER, F. M.; DEVINE, M.; ALCOBA, G.; CHAPPUIS, F.; WEISS, D. J.; RAY, N.; WARELL, D. A.; CASTAÑEDA, R. R.; WILLIAMS, D. J. Vulnerability to snakebite envenoming: A global mapping of hotspots. **The Lancet**, v. 392, n. 10148, p. 673-684, 2018.

MAGALHÃES, H. I.; DE ALMEIDA, A. L. M. C.; DA SILVA, G. R.; RABELO, J. I. D. L. B.; DA SILVA, P. M. G.; LACERDA, N. P. Relato de acidente botrópico que resultou em amputação. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017

MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 10, p. 66-81, 2008.

MOREIRA, J. P. L.; MORATO, R. G. Incidência e ocorrência de ataques ofídicos no Brasil em 2012. **Simpósio Mineiro de Geografia**, v. 1, 2014.

MOURA-DA-SILVA, A.; ALMEIDA, M.; PORTES-JUNIOR, J.; NICOLAU, C.; GOMES-NETO, F.; VALENTE, R. Processing of snake venom metalloproteinases: generation of toxin diversity and enzyme inactivation. **Toxins**, v. 8, n. 6, p. 183, 2016.

NERY, N. M.; LUNA, K. P.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P. An overview of *Bothrops erythromelas* venom. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 680-686, 2016.

OLIVEIRA, F. N.; BRITO, M. T.; MORAIS, I. C. O. D.; FOOK, S. M. L.; ALBUQUERQUE, H. N. D. Accidents caused by *Bothrops* and *Bothropoides* in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 662-667, 2010.

OLIVEIRA, J. S.; SANT'ANNA, L. B.; JUNIOR, M. C. O.; SOUZA, P. R.; SOUZA, A. S. A.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C. Local and hematological alterations induced by *Philodryas olfersii* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 132, p. 9-17, 2017.

OLIVEIRA, S. S. **Atividades biológicas do veneno de serpentes *Bothrops atrox* capturadas na Floresta Nacional do Tapajós, Oeste do Pará**. 2014. Tese de Doutorado. Instituto Butantan.

OWEN, J. A. **Kuby immunology**. New York: WH Freeman, 2013.

RUCAVADO, A.; NICOLAU, C.; ESCALANTE, T.; KIM, J.; HERRERA, C.; GUTIÉRREZ, J.; FOX, J. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 349, 2016.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.

SANTORO, M. L.; DO CARMO, T.; CUNHA, B. H. L.; ALVES, A. F.; ZELANIS, A.; DE TOLEDO SERRANO, S. M.; SANT'ANNA, S. S.; FERNANDES, W. Ontogenetic variation in biological activities of venoms from hybrids between *Bothrops erythromelas* and *Bothrops neuwiedi* snakes. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145516, 2015.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. **Thrombosis and haemostasis**, v. 92, n. 08, p. 369-383, 2004.

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L. R. D. C.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, M. Y.; ARAÚJO, H. P.; BOLLER, M. A. A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANO-MARTINS, I. S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G. P.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980-989, 2010.

SENISE, L. V.; YAMASHITA, K. M.; SANTORO, M. L. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 11, p. 1528-1536, 2015.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C. A.; POZNER, R. G.; VENTURA, J. S.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v. 369, n. 1, p. 129-139, 2003.

STOCK, W.; HOFFMAN, R. White blood cells 1: non-malignant disorders. **The Lancet**, v. 355, n. 9212, p. 1351-1357, 2000.

TEIXEIRA, C.; MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M. **Venoms**. In: CAVAILLON, Jean-Marc; SINGER, Mervyn (Ed.). Inflammation, 4 volume set: From molecular and cellular mechanisms to the clinic. John Wiley & Sons, 2018.

VALLE, L. A.; SILVA, D. D. F. R.; MAGALHÃES, P. H.; MATTOS, P. A.; LEAL, J. A. Amputação bilateral de extremidades inferiores após acidente botrópico grave: relato de um caso. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 81-84, 2018.

WANDERLEY, C. W. S.; Silva, C. M. S.; Wong, D. V. T.; Ximenes, R. M.; Morelo, D. F. C.; Cosker, F.; Brito, G. A. *C. Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid-and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134-147, 2014.

WILLIAMS, D. J.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J. J.; WUSTER, W.; RATANABANANGKON, K.; PAIVA, O.; BROWN, N. I.; CASEWELL, N. R.; HARRISON, R. A.; ROWLEY, P. D.; O'SHEA, M.; JENSEN, S. D.; WINKEL, K. D.; WARREL, D. A. Ending the drought: new strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1735-1767, 2011.

YAMASHITA, K. M.; NOGUEIRA, T. O.; SENISE, L. V.; CIRILLO, M. C.; GONÇALVES, L. R. C.; SANO-MARTINS, I. S.; GIORGI, R.; SANTORO, M. L. Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 9, n. 10, p. 2057-2066, 2011.

YAMASHITA, K. M. **Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

+ Capítulo IV: Perspectivas para o tratamento do dano tissular
modulado pelo veneno de *Bothrops erythromelas* (Amaral,
1923) (Squamata, Viperidae)

**Perspectivas para o tratamento do dano tissular modulado pelo veneno de
Bothrops erythromelas (Amaral, 1923) (Squamata, Viperidae)**

Joeliton dos Santos Cavalcante¹, Wesley Ruan Borges Guimarães da Silva¹, Cayo Antônio Soares de Almeida², Roberta Jeane Bezerra Jorge³, Carla de Lima Bicho¹

¹ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil.

² Centro de Matemática, Ciências da Computação e Cognição, Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

Correspondência deve ser endereçada para:

Joeliton dos Santos Cavalcante

Endereço: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil

R. Baraúnas N° 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: joeliton.biologia@gmail.com

Fone: +55-83-99377 7819

Resumo:

Bothrops erythromelas é a principal responsável por casos de acidentes ofídicos no Nordeste brasileiro. Suas toxinas deflagram um amplo espectro de manifestações fisiopatológicas que vai desde o comprometimento local, com danos teciduais, até sistêmico. Para o tratamento dos casos de envenenamentos, o único produto validado é o antiveneno botrópico, que apresenta a capacidade de neutralizar os efeitos sistêmicos. Entretanto, esse produto apresenta baixa eficácia na neutralização do dano tissular local na região da picada. Em razão da magnitude do melhoramento antivenômico e/ou do desenvolvimento de um produto mais eficaz, que supra esse déficit, foi desenvolvido o presente trabalho que teve por objetivo investigar o efeito edematogênico modulado pelo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) e pela heparina sódica, bem como verificar o potencial neutralizante desses inibidores frente ao mecanismo edematogênico do veneno de *B. erythromelas*. Os bioensaios foram realizados em camundongos *swiss* com base no edema de pata. Para investigar o edema modulado pelo EDTA e pela heparina sódica, diferentes concentrações dessas drogas (10; 5,0; 2,5 e 1,0 mM de EDTA ou 50, 25 e 10 UI de heparina), diluídas em PBS, foram injetadas via intraplantar. Posteriormente, para avaliar a eficácia desses inibidores frente ao veneno, diferentes concentrações dos agentes supramencionados e do veneno foram misturadas, pré-incubadas a 37°C e injetadas nos animais. Os grupos experimentais para cada tratamento foram compostos por 6 animais. Em todos os casos, o edema foi mensurado com um paquímetro digital. Amostras da pata de camundongos de ambos os experimentos foram coletadas para a análise histopatológica. O EDTA e a heparina sódica não induziram edema, nem alteração no arranjo espacial das camadas da pele. Para os dois casos, foi possível a visualização de células do sistema imunológico, relacionadas com a resposta inflamatória e preparo para o processo de reparo tecidual. Os tratamentos de pré-incubação do veneno com as diferentes concentrações de EDTA e heparina sódica inibiram em mais de 50% a atividade edematogênica. O mecanismo recém relatado como responsável pelo efeito edematogênico, a separação dermo-epidérmica, foi inibida, de forma que a análise do tecido mostrou apenas traços da manifestação supramencionada. A hemorragia epidérmica incidente com o edema foi neutralizada pelo EDTA e pela heparina sódica, nas concentrações mais altas adotadas para o estudo (50 e 25 UI). Os tratamentos com diferentes concentrações de EDTA e heparina sódica demonstraram inibição da modulação edematogênica pelo veneno de *B. erythromelas*, apresentando, portanto, um potencial promissor no tratamento complementar ao recurso terapêutico com os antivenenos. A alta difusibilidade, longa vida de prateleira e fácil aquisição, convergem para que sejam aplicados logo após o envenenamento.

Palavras-chave: EDTA, heparina sódica, inibição, edema, jararaca-da-seca.

1 Introdução

No Brasil, o principal grupo de serpentes que acomete os humanos são as jararacas, gênero *Bothrops* (BRASIL, 2019). A ação do veneno dessas serpentes induz a respostas de ordem inflamatória, miotóxica, coagulante e hemorrágica, responsáveis por deflagrar uma série de manifestações locais e sistêmicas (GUTIÉRREZ et al., 2017). Dentre as manifestações locais estão o surgimento de lesões hemorrágicas, mionecrose e edema intenso, exsudato purulento e dor forte no local da picada, em casos mais graves, pode haver dano tecidual, que pode resultar em perda funcional ou permanente do tecido ou do membro afetado (MAGALHÃES et al., 2017; VALLE et al., 2018).

O edema é um dos primeiros efeitos deflagrados pelo acesso do veneno botrópicos no organismo em caso de envenenamento. Essa manifestação local é o resultado da interação sinérgica de várias toxinas encontradas nos venenos de *Bothrops*, que atuam de forma expedita no tecido conjuntivo e muscular, e induzem a liberação de vários mediadores inflamatórios endógenos. Esse fenômeno patológico leva a diminuição da eficácia da terapia convencional que utiliza antivenenos no tratamento dessas reações inflamatórias locais (ARA et al., 2007; PATRÃO-NETO et al., 2013; FÉLIX-SILVA et al., 2017). Além disso, a injeção do veneno da *B. erythromelas* em patas de camundongos induz edema, cujo mecanismo específico da resposta edematogênica modulada encontra-se em fase de elucidação (Vide capítulo III). Porém, sabe-se que a a modulação do edema por outros venenos botrópicos, se dá principalmente, pelos metabólitos do ácido araquidônico e o envolvimento, em baixo nível, da histamina, serotonina e do fator ativador de plaquetas (GUTIÉRREZ et al., 2009; TEIXEIRA; MOREIRA, GUTIÉRREZ et al., 2018).

Com relação ao quadro sistêmico, ele é caracterizado principalmente pelos distúrbios da coagulação, um resultado da ação de toxinas que deflagram um quadro de coagulação intravascular seguido de uma coagulopatias de consumo (MADWAGE et al., 2015; SLAGBOOM et al., 2017).

O tratamento consiste na administração de antivenenos que salvam milhares de vidas a cada ano (CHIPPAUX et al., 2017). Para validação da efetividade do produto, esse é submetido a ensaios que avaliem seu potencial neutralizante perante ao efeito letal de venenos (GUTIÉRREZ et al., 2017). De fato, os antivenenos apresentam um bom espectro de atividade neutralizante frente às toxinas livres no plasma de paciente. Mesmo havendo uma variabilidade venômica inter e intraespecífica, os antivenenos apresentam reatividade

cruzada, sendo validados como um produto eficaz (RITA DE CÁSSIA et al., 2017). Por outro lado, esse produto apresenta baixa eficácia na neutralização do dano tissular desencadeado no local em que o veneno teve acesso ao organismo (FÉLIX-SILVA et al., 2017). Nesse contexto, o tempo entre o desenvolvimento desse dano e o atraso na administração da soroterapia, atuam desfavoravelmente sobre a clínica do paciente, o que favorece o desenvolvimento de sequelas temporárias e, em casos, mais graves, permanentes.

De uso de rotina como anticoagulante de amostras sanguíneas, o Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) é uma substância pertencente ao grupo dos quelantes (OLIVEIRA et al., 2010). EDTA apresenta nas extremidades de suas moléculas um par de radicais livres que se unem a íons metálicos, convertendo íons, como cálcio, ferro, cobre e magnésio, a sua forma aniônica, e criam um complexo de metal-EDTA (SEELY; WU; MILLS, 2005).

Por outro lado, a heparina sódica é uma droga tradicionalmente conhecida pela sua atividade anticoagulante, decorrente de suas interações com o sistema de coagulação do sangue, uma vez que inibe a atividade da trombina e do fator Stuart Power ativado (FXa). Além de seus efeitos anticoagulantes, é de conhecimento que a heparina possui uma gama de outras ações biológicas, dentre elas a possibilidade de inibir a ativação de células envolvidas no processo inflamatório (MULLOY et al., 2016)

O efeito anti-inflamatório da heparina pode ser atribuído, em parte, à ligação e neutralização de mediadores citotóxicos e enzimas liberados durante a resposta inflamatória, que poderiam levar à ativação de células inflamatórias e dano tecidual. Assim, pode ser evidenciada a possibilidade de sua aplicação em desordens inflamatórias. Um aspecto importante é que o tratamento com heparina não provoca efeitos colaterais hemorrágicos significativos, nem quando administrado a nível sistêmico nem local.

Portanto, o principal objetivo deste estudo consistiu na investigação do efeito edematogênico modulado pelo EDTA e pela heparina sódica, bem como verificar o potencial neutralizante desses inibidores frente ao mecanismo edematogênico do veneno de *B. erythromelas*.

2 Material e métodos

2.1 Veneno

Para a obtenção das amostras de veneno de *B. erythromelas*, os espécimes foram anestesiados com o auxílio de CO₂. Após a extração, o veneno foi liofilizado e armazenado a -20°C até o momento da utilização. As amostras foram obtidas através da colaboração com a Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

2.2 Animais

Os estudos utilizaram como modelo experimental camundongos *swiss*, os quais foram fornecidos pelo Núcleo de Mutagênese Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, oriundos do Laboratório de Biogenética. Camundongos machos, com peso entre 20 – 25g foram mantidos em temperatura ambiente em estante ventilada, com fotofase de 12 horas e oferta de água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (protocolo 2018.01-04).

2.3 Investigação da atividade edematogênica modulada pelo EDTA e Heparina Sódica

Para conhecer os possíveis efeitos edematogênico dos candidatos a inibidores do veneno, grupos de camundongos *swiss* machos, (n=6), foram injetados via intraplantar na pata direita, com diferentes doses contendo 10; 5,0; 2,5 e 1,0 mM de EDTA ou 50, 25 e 10 UI de heparina diluídas em PBS. Como controle negativo, camundongos (n=6) receberam uma injeção intraplantar apenas com o PBS. Em 30 minutos após a injeção, o edema foi mensurado com um paquímetro digital. Os resultados foram expressos como a porcentagem de aumento em relação ao tamanho inicial.

2.4 Experimento de incubação: Veneno e EDTA ou Heparina Sódica

Uma dose edematogênica do veneno de *B. erythromelas* foi padronizada anteriormente (Vide capítulo III) para a realização dos ensaios de neutralização. Essa dose, correspondente a indução de 30% de edema, foi submetida a um período de incubação com 10; 5,0; 2,5 e 1,0 mM de EDTA ou 50, 25 e 10 UI de heparina sódica na proporção de 1:1 (v/v) diluídas em PBS. Alíquotas de 15 µL com as misturas, contendo 1,75 µg de veneno com os inibidores, foram incubadas em banho maria a 37°C e, de forma imediata, injetadas via intraplantar na almofada da pata direita dos camundongos *swiss*. Como controle negativo, camundongos (n=6) receberam uma injeção intraplantar apenas com o PBS. Em 30 minutos, o edema foi mensurado com um paquímetro digital. Os resultados foram expressos como a porcentagem de aumento em relação ao tamanho inicial.

2.5 Biblioteca de tecidos e preparo para análise histopatológica

Após mensurar o edema das patas dos camundongos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O tecido correspondente ao local da injeção foi coletado com o auxílio de um bisturi. As amostras foram acondicionadas em microtubos plásticos do tipo eppendorf com capacidade para 1mL e, fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (formaldeído 4% (v/v), metanol 0,1% (v/v), fosfato de sódio monossódico (s/v), fosfato de sódio dissódico (s/v) e H₂O deionizada) até o momento do uso.

Após fixação, as amostras foram lavadas em água corrente e seccionadas em plano sagital com uma lâmina para a microtomia e depositadas em cacetes histológicos. Sucessivamente, os cacetes histológicos, com as amostras, foram submetidos a uma bateria de banhos para a desidratação. Para tanto, utilizaram-se soluções constantes de álcool etílico absoluto (quatro banhos de 1 hora cada). Por fim, as amostras foram diafanizadas em banhos sucessivos de xilol (três de 0,5 hora e um de 1 hora). As amostras, após desidratadas e diafanizadas, foram embebidas em parafina por 30 minutos (dois banhos) e emblocadas. O bloco de parafina, contendo a amostra, foi submetido a microtomia, gerando cortes de 5 µm que foram aderidas a lâminas de vidro (26 x 76 mm) e secas a temperatura ambiente. Os cortes foram desparafinados em xileno e hidratados em água destilada. Subsequentemente, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina e encobertos com lamínulas de vidro aderidas com Novo Entellan®.

2.6 Análise histopatológica

As análises foram realizadas em microscópio óptico ZEISS AXIO LAB.A1 com câmera digital AxioCam MRc. Todo o diagnóstico foi realizado em objetiva óptica com aumento de 20X. Foi considerado como parâmetro para efetividade de neutralização a distância dermo-epidérmica, uma vez constatado que esse era um dos mecanismos pelo qual o veneno de *B. erythromelas* induzia a manifestação edematogênica (Vide capítulo III). As imagens foram capturadas através do software próprio da câmera digital supramencionada e manipuladas com o *software* PhotoScape versão 3.7.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 7.00 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) San Diego, sendo consideradas estatisticamente significativas as diferenças com o $p < 0,05$. Os resultados foram comparados por meio do ANOVA test para medidas repetidas, seguido Dunnett's test. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. O recurso gráfico foi gerado através do *software* supramencionado.

3 Resultados

3.1 Atividade edematogênica modulada pelo EDTA e heparina sódica

Para o estudo do papel do Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) e da heparina sódica, como possíveis inibidores da resposta inflamatória modulada pelo veneno da serpente *B. erythromelas*, foi realizado o bioensaio de edema de pata em camundongos. Adotaram-se esses bioensaios como experimento controle, para verificar a ausência da indução de edema do tampão utilizado, *phosphate buffered saline* (abreviado PBS), junto aos inibidores. E também para validar a metodologia empregada, no sentido de verificar e quantificar a alteração causada pela injeção.

Por meio dos dados obtidos percebe-se que houve pequeno aumento do edema de pata induzido pelo tampão e pelos inibidores. Embora as diferentes concentrações de EDTA, tenham induzido respostas análogas, quando comparadas com a resposta modulada pelo tampão (PBS), foi constatado que não houve diferença significativa entre elas ($p > 0,5$) (Figura 1).

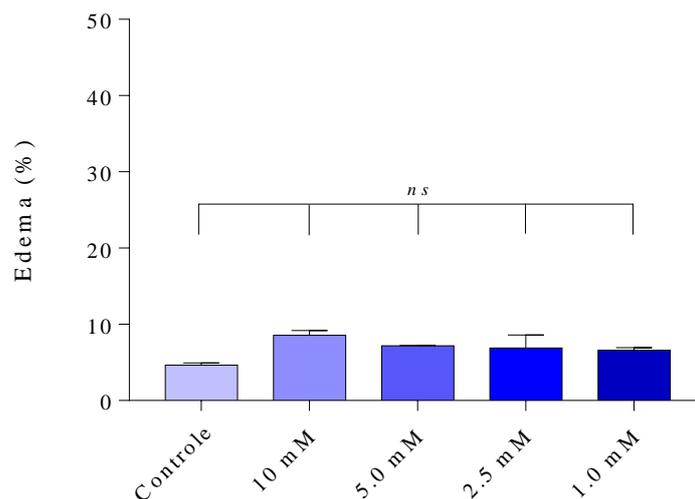


Figura 1 - Avaliação da atividade edematogênica modulada pelo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. Ns $p > 0,5$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o *software* GraphPad Prism versão 7.00.

As análises histopatológicas do grupo controle e dos grupos submetidos a diferentes concentrações de EDTA não apresentaram alteração no arranjo espacial das camadas da pele. Derme, epiderme e hipoderme, além do tecido muscular - cuja visualização foi

possível nos cortes do tecido tratado com o agente supramencionado – não apresentaram sinais de degradação, desconfiguração ou qualquer outra alteração de cunho patológico. Por conseguinte, foi perceptível a visualização de células do sistema imunológico relacionadas com a resposta inflamatória, o que caracteriza, um cenário de infiltrado inflamatório. Entretanto, vale ressaltar que a presença dessas células está intimamente vinculada ao processo de reparo e regeneração tecidual (Figura 2).

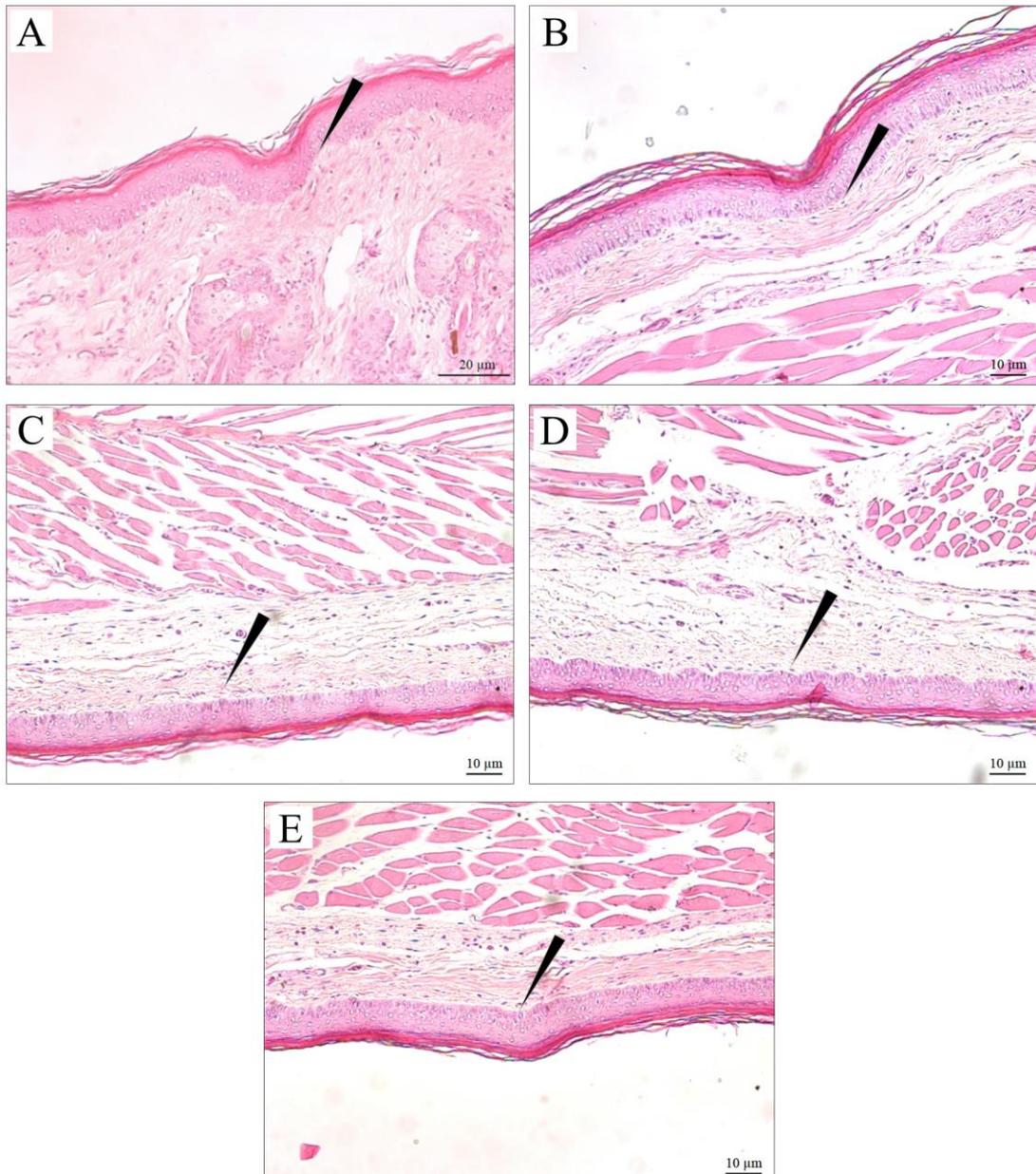


Figura 2 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de atividade edematogênica modulada pelo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Cortes histológicos da pata de camundongo *swiss* injetada com (A) PBS e EDTA (B) 10 mM, (C) 5.0 mM, (D) 2.5 mM e (E) 1.0 mM. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica sem alterações.

Por meio dos dados obtidos percebe-se que, embora as diferentes concentrações de heparina sódica, tenham induzido respostas análogas, quando comparadas com a resposta modulada pelo tampão (PBS), foi constatado que não houve diferença significativa entre elas ($p>0,5$) (Figura 3).

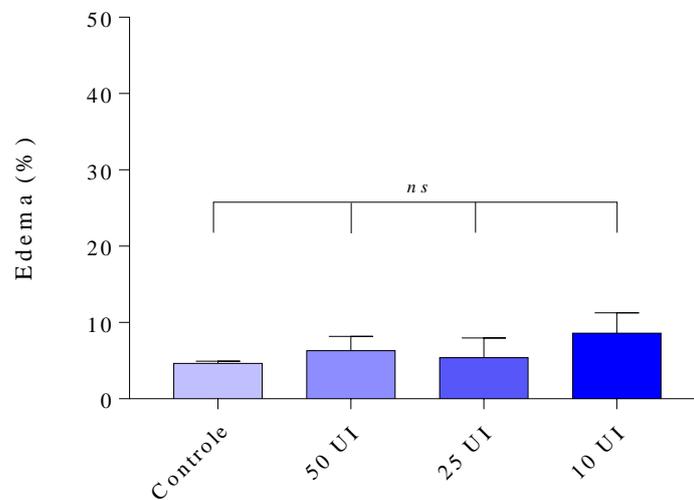


Figura 3 - Avaliação da atividade edematogênica modulada pela Heparina Sódica (Hemofol®). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. Ns $p>0,5$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o software GraphPad Prism versão 7.00.

As análises histopatológicas do grupo controle e dos grupos submetidos a diferentes concentrações de heparina sódica não apresentaram alteração no arranjo espacial das camadas da pele. Derme, epiderme e hipoderme, além do tecido muscular - cuja visualização foi possível nos cortes do tecido tratado com o agente supramencionado - não apresentaram sinais de degradação, desconfiguração ou qualquer outra alteração de cunho patológico. Por conseguinte, foi perceptível a visualização de células do sistema imunológico relacionadas com a resposta inflamatória, o que caracteriza, um cenário de infiltrado inflamatório. Entretanto, vale ressaltar que a presença dessas células está intimamente vinculada ao processo de reparo e regeneração tecidual (Figura 4).

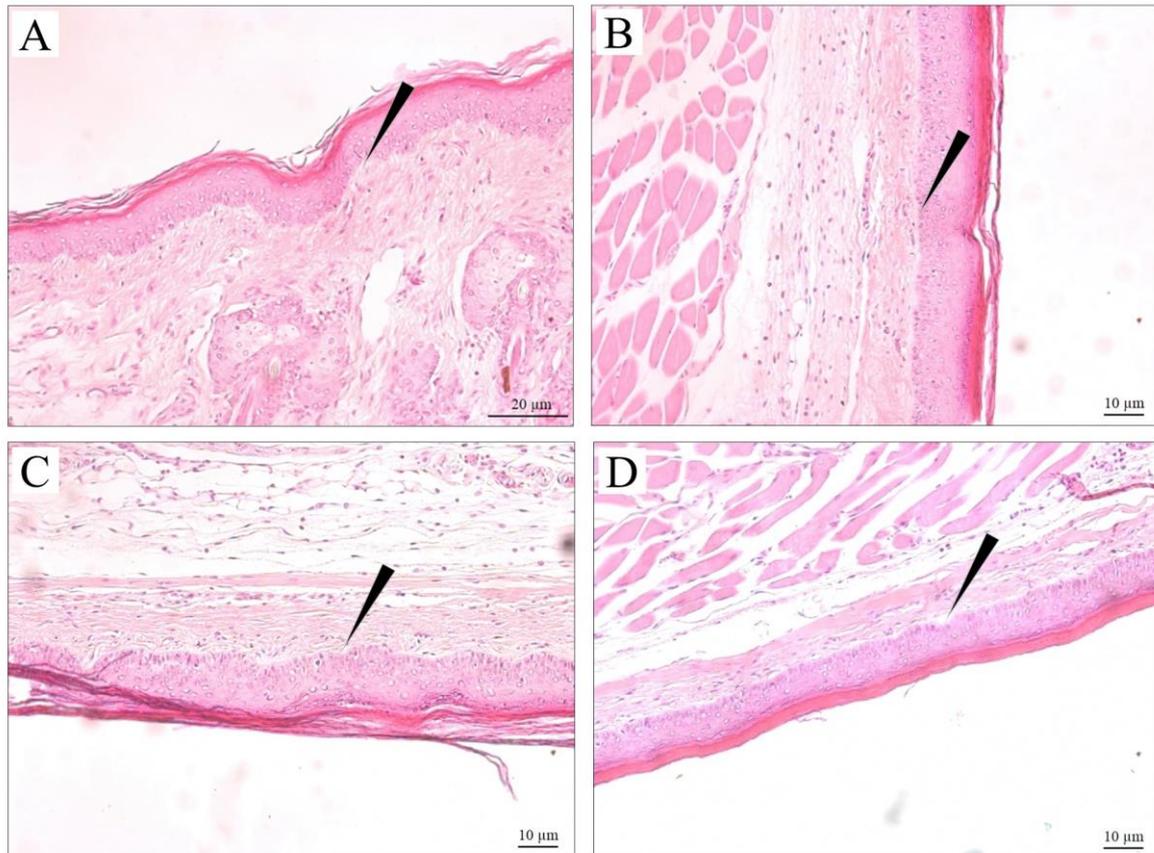


Figura 4 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de atividade edematogênica modulada pela Heparina Sódica (Hemofol®). Cortes histológicos da pata de camundongo *swiss* injetada com (A) PBS e Heparina (B) 50 UI, (C) 25 UI e (D) 10 UI. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica sem alterações.

3.2 Investigação da atividade inibidora do efeito edematogênica do veneno de *Bothrops erythromelas* pelo EDTA e Heparina Sódica

Uma vez validadas as doses e a metodologia, foi testado os inibidores (EDTA e Heparina Sódica) em associação com uma Dose Mínima Edematogênica (DME) do veneno de *B. erythromelas* através do protocolo de pré-incubação. É possível observar que houve diferença significativa entre o potencial edematogênico do grupo que recebeu somente a DME perante àqueles tratados com a DME acrescida das diferentes concentrações de EDTA ($p < 0.0001$) (Figura 5).

Os tratamentos de pré-incubação com DME e 10, 5,0, 2,5 e 1,0 mM de EDTA inibiram em mais de 50% a atividade edematogênica. Dentro do recurso terapêutico utilizado foram verificadas respostas diferenciadas. Ao comparar o grupo que recebeu a DME + 10 mM de EDTA com cada um dos grupos que recebeu uma concentração menor

de EDTA (5,0; 2,5; e 1,0 mM) constatou-se que houve diferença significativa ($p < 0.1$; $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente) (Figura 5).

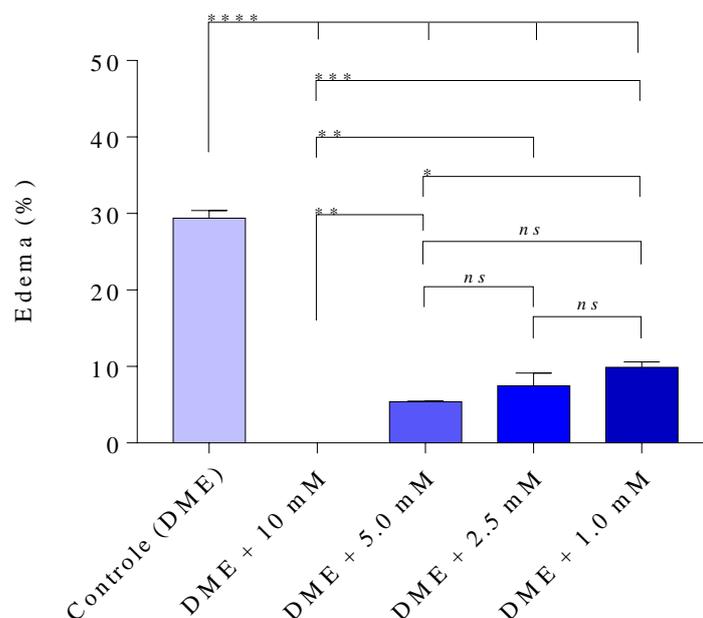


Figura 5 - Avaliação do potencial edematogênico modulado pelo veneno da serpente *Bothrops erythromelas* frente ao inibidor Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o software GraphPad Prism versão 7.00.

Verifica-se na análise histopatológica que o EDTA apresentou um potencial promissor como tratamento complementar ao recurso terapêutico com os antivenenos. Os danos teciduais locais modulados pelo veneno, visualizados no controle foram neutralizados. Histopatologicamente os tecidos que receberam a DME acrescida do EDTA apresentaram maior conservação quanto a organização das camadas da pele. Em contraste com o controle (Figura 6 A), os tratamentos com EDTA (Figuras 6 B, C, D e E) apresentaram redução no número de células sanguíneas e de células inflamatórias. Pode-se verificar apenas traços de separação dermo-epidérmica.

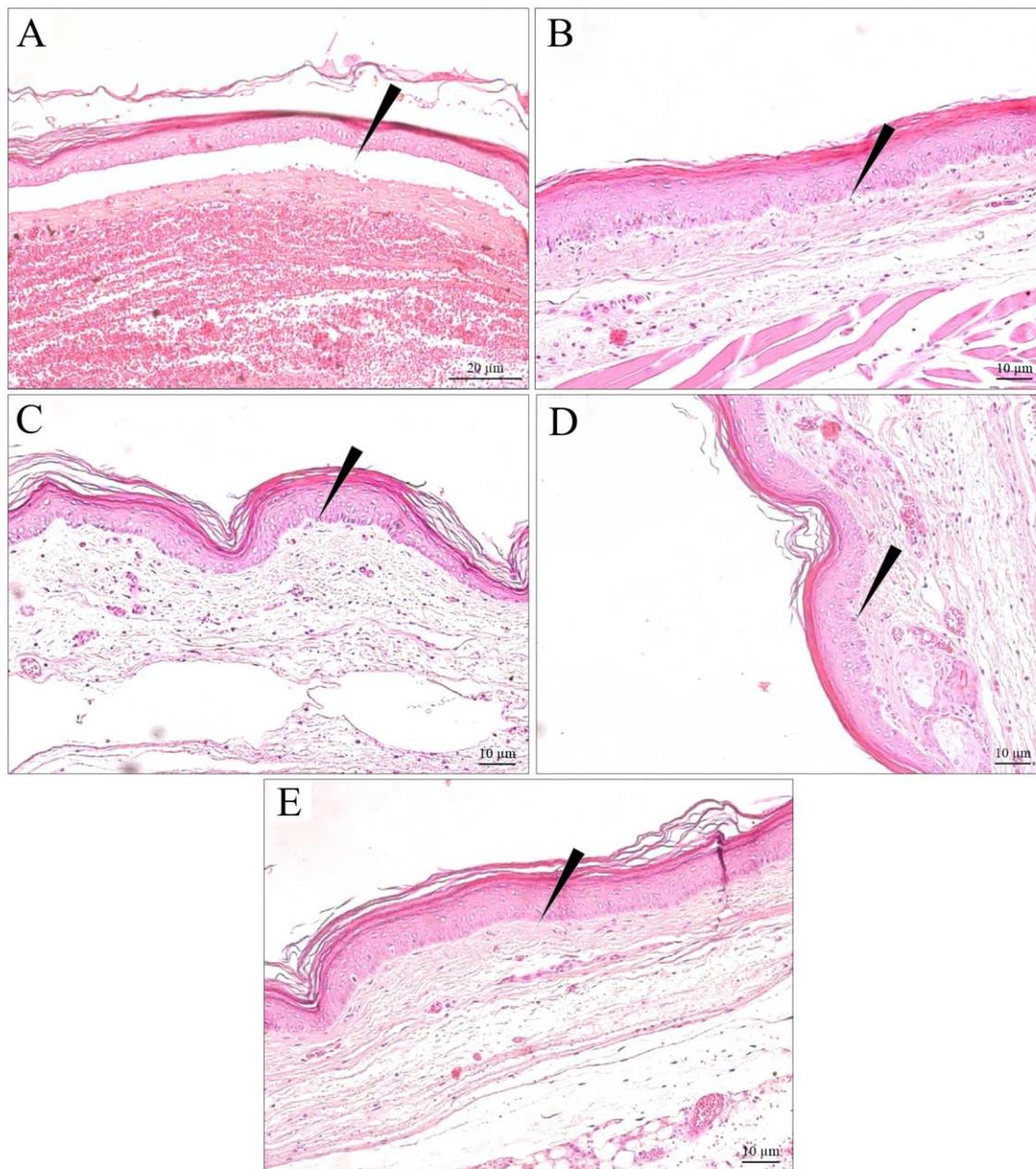


Figura 6 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de neutralização da atividade edematogênica modulada pelo veneno de *Bothrops erythromelas* utilizando o Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Cortes histológicos da pata de camundongo *swiss* injetada com (A) veneno de *Bothrops erythromelas* diluído em PBS e veneno incubado com (B) 10 mM, (C) 5.0 mM, (D) 2.5 mM e (E) 1.0 mM de EDTA. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica.

Os tratamentos de pré-incubação com DME e 50, 25 e 10 UI de heparina sódica inibiram em mais de 50% a atividade edematogênica. Dentro do recurso terapêutico utilizado foram verificadas respostas análogas ($p < 0.01$) quando comparadas com o grupo controle que recebeu apenas a DME (Figura 5).

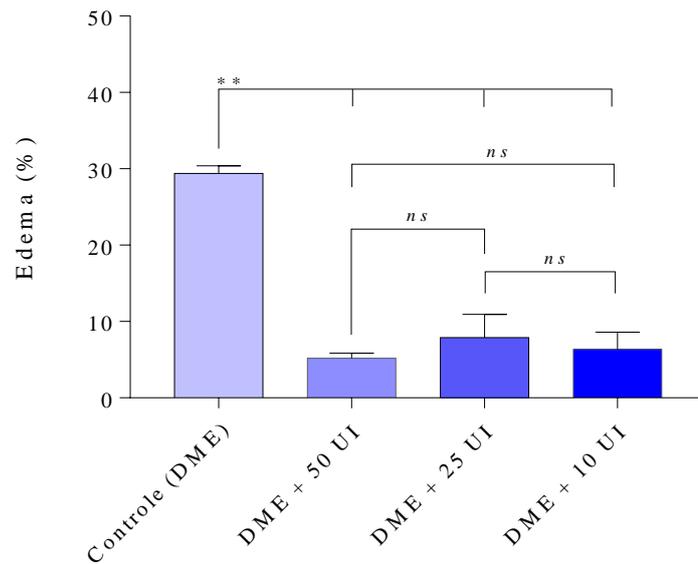


Figura 7 - Avaliação do potencial edematogênico modulado pelo veneno da serpente *Bothrops erythromelas* frente ao inibidor Heparina Sódica (Hemofol®). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 6 animais para cada tratamento. * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$. Os dados foram analisados estatisticamente por one-way ANOVA test e Dunnett's test de múltiplas comparações utilizando o *software* GraphPad Prism versão 7.00.

Verifica-se na análise histopatológica que a heparina sódica apresentou um potencial promissor como tratamento complementar a soroterapia antivenômica. Os tecidos apresentaram conservação quanto a organização das camadas da pele preservada. Em contraste com o controle que recebeu a DME (Figura 8 A), nos tratamentos com heparina sódica (Figuras 8 B, C e D) pode-se verificar apenas traços de separação dermo-epidérmica (indicado pelas setas pretas). Adicionalmente, pode-se verificar que a heparina também reduziu a hemorragia nas concentrações 50 e 25 UI (Figuras 8 B e C).

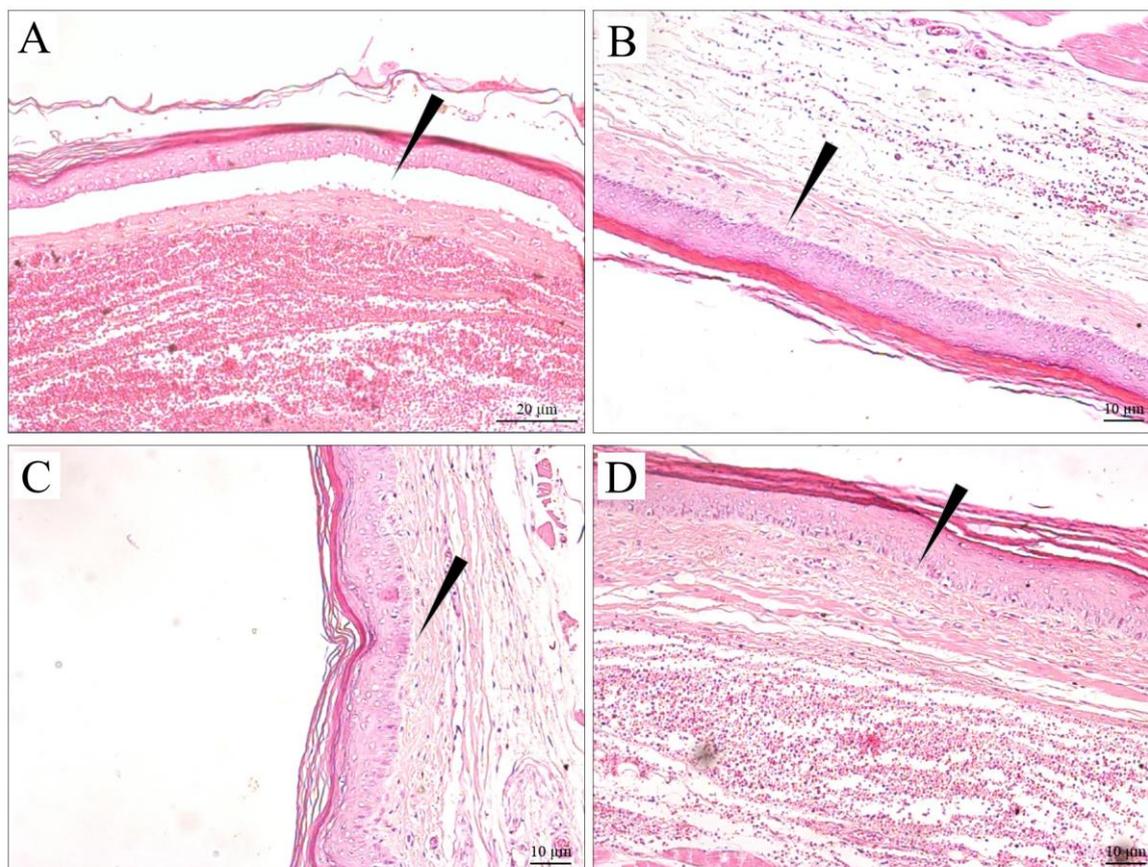


Figura 8 - Análise histopatológica do tecido submetido ao modelo experimental de neutralização da atividade edematogênica modulada pelo veneno de *Bothrops erythromelas* utilizando a Heparina Sódica (Hemofol®). Cortes histológicos da pata de camundongo *swiss* injetada com (A) veneno de *Bothrops erythromelas* diluído em PBS e veneno incubado com Heparina (B) 50 UI, (C) 25 UI e (D) 10 UI. Setas pretas indicam a junção dérmico-epidérmica.

4 Discussão

O presente estudo mostrou que o tratamento de uma unidade mínima edematogênica do veneno de *B. erythromelas*, após ser incubado com diferentes concentrações (mM) de EDTA apresentou redução significativa no efeito edematogênico modulado pelo veneno, ocorrendo inibição total do efeito sob concentração de 10 mM. Dessa forma, os dados demonstram uma eficácia relevante do EDTA em impossibilitar o desenvolvimento do edema no envenenamento.

Em contraposição aos dados aqui relatados, Silva-Neto e colaboradores (2018), constataram que o tratamento local e endovenoso com EDTA 30 minutos após a inoculação intradérmica do veneno de *B. alternatus* em coelhos não foi capaz de reduzir o dano tecidual local. Entretanto, os animais que receberam EDTA intramuscular apresentaram redução na formação de edema local e, portanto, a sensibilidade no local da inoculação. Portanto, a injeção de EDTA poderia reduzir o dano do envenenamento *in situ* e evitar complicações clínicas. Esses achados intensificam a dependência de íons metálicos nas principais enzimas de venenos botrópicos. Estudos adicionais são necessários para elucidar o potencial do EDTA após a instalação do envenenamento e para acessar diferentes locais de injeção do quelato.

A injeção de EDTA via subcutânea, entre 5 e 10 minutos, após o envenenamento experimental com *B. atrox* reduziu significativamente a hemorragia, o edema e a necrose em coelhos (FLOWERS; GOUCHER, 1965). Por outro lado, a pré-incubação do EDTA com o veneno das serpentes *B. asper* (BORKOW et al., 1997), *B. jararaca* (TANIZAKI et al., 1989) e *B. jararacussu* (MAZZI et al., 2004) não inibiu a formação de mionecrose e edema. Através da injeção intraperitoneal do veneno de *B. asper* pré-incubado com EDTA a infiltração leucocitária foi significativamente reduzida (FERNANDES et al., 2006).

A capacidade do EDTA de quelar íons proporcionaria um potencial inibitório das fosfolipases dependentes de Ca^{2+} do veneno botrópico, responsáveis pela maioria das lesões teciduais. Uma vez que se ligam ao Ca^{2+} , um co-factor chave que é crítico para a hidrólise lipídica mediada pelas PLA_2 por meio da quebra da ligação acila-sn-2 dos glicerofosfolipídeos da membrana plasmática, o processo de quelação do Ca^{2+} pelo EDTA compromete a função fosfolipásica do veneno (OJEDA et al., 2018).

O potencial edematogênico do veneno de *B. erythromelas* foi reduzido em 46,41% ao se utilizar como candidato terapêutico o extrato de *Jatropha mollissima* na dose de 50 mg / kg e 57,58% por dexametasona (GOMES et al., 2015). Por outro lado, o antiveneno botrópico utilizado clinicamente no tratamento de envenenamentos humanos não inibe tal efeito (FÉLIX-SILVA et al., 2017). Uma possível justificativa para esse potencial neutralizante insatisfatório do antiveneno, é o fato de que o antiveneno neutraliza as toxinas, mas não apresenta a capacidade de neutralizar a ação dos mediadores inflamatórios endógenos posteriormente liberados.

Destarte, existe a necessidade do delineamento de um procedimento terapêutico, complementar ao antiveneno, que tenha como alvo a neutralização de células inflamatórias, inibindo a sua ativação, bem como a ação dos mediadores inflamatórios. Por esse contexto, o EDTA seria descartado haja vista que atua nas toxinas. Assim, optou-se pela avaliação pré-clínica de um segundo candidato que apresentasse longa vida de prateleira e fácil aquisição, permitindo sua utilização no leito, a heparina sódica.

A heparina sódica tem sido indicada como um forte inibidor inflamatório, devido a sua atuação sobre diferentes mecanismos que promovem o processo inflamatório, atuando sobre a superfície de células inflamatórias, na ligação de enzimas e no bloqueio de vias de sinalização celular (MULLOY et al., 2016)

Precipuaente, a heparina sódica é um potente inibidor da liberação de citocinas por mastócitos, o que compromete a ativação da via do recrutamento de células inflamatórias para os sítios de lesão (MULLOY et al., 2016). Em pacientes envenenados por *B. erythromelas*, observa-se uma diminuição no percentual de células inflamatórias, o que sugere que a redução pode ser um indicativo da migração celular para os tecidos, contribuir e/ou regular os quadros inflamatórios observados. Com isso, a redução quantitativa no sangue periférico (LUNA, 2010). Essa migração celular, no entanto, pode ser inibida com a introdução da heparina no microambiente lesionado. Como supramencionado, é sabido seu caráter anti-inflamatório, atribuído à inibição da ativação de células inflamatórias, através da ligação e neutralização de enzimas e mediadores relacionados ao processo inflamatório (MULLOY et al., 2016).

Os tratamentos que empregaram a pré-incubação da dose mínima edematogênica com diferentes concentrações de heparina, demonstraram inibição da modulação edematogênica pelo veneno. Todos os tratamentos com o inibidor da resposta inflamatória supramencionado diferiram do controle, sendo constatada uma similariedade estatística

entre as concentrações inibitórias utilizadas no estudo. Por conseguinte, foi verificada que a inibição edematogênica não se dá de forma dose-resposta, havendo uma necessidade da padronização de doses e vias para administração para continuidade deste estudo, o que constituirá o *scopo* de trabalhos futuros.

5 Considerações finais

A partir dos dados obtidos, verificou-se que tanto o Ácido Etilenodiamino Tetra-Ácético (EDTA) quanto a heparina sódica, não apresentam a capacidade de deflagrar edema. Adicionalmente, a análise histopatológica corroborou tais achados. Não foram diagnosticadas quaisquer alterações no arranjo espacial das camadas da pele, embora células imunológicas, relacionadas ao mecanismo de reparo e regeneração tecidual, foram identificadas.

Esse estudo revelou que a presença de quelantes, no caso o EDTA e a heparina sódica, é capaz de neutralizar o efeito edematogênico modulado pelo veneno de *B. erythromelas* através de protocolos de pré-incubação. Embora os mecanismos precisos e as vias de sinalização envolvidas nesse processo permaneçam enigmáticos, e elucidá-los esteja além do *scopo* desse estudo, a autenticidade dos resultados expressos quantitativamente é apoiada pelos dados histopatológicos aqui apresentados. Vale a pena considerar o fato de que o tratamento atual de envenenamentos com o antiveneno está longe de atingir a perfeição, uma vez que enfrenta barreiras como a qualidade de produção, a variabilidade apresentada pelos venenos e o déficit inibitório de danos tissulares. Por essa razão, especulações como as destacadas devem avançar prontamente.

Os dados ora apresentados são suficientes para começar a afirmar a existência do potencial terapêutico advindo das moléculas de EDTA e da heparina sódica. O uso de inibidores sintéticos de venenos com alta difusibilidade, longa vida de prateleira e fácil aquisição, que poderiam ser aplicados logo após o envenenamento, representa uma alternativa para superar limitações na terapia com antiveneno em relação ao dano tecidual local.

Como os toxinologistas continuam a trabalhar para desenvolver e validar novos produtos para a terapêutica das atividades dos venenos, a presente investigação seguirá na busca por biomarcadores visando compreender o sucesso terapêutico da lesão tecidual modulado pelo veneno de *B. erythromelas*. Espera-se que este trabalho preliminar ajude a incentivar pesquisas futuras nesta fascinante área.

Referências

ARA, S. D.; DE SOUZA, A.; NUNES, F. P. B.; GONŠALVES, L. R. C. Effect of dexamethasone associated with serum therapy on treatment of *Bothrops jararaca* venom-induced paw edema in mice. **Inflammation Research**, v. 56, n. 10, p. 409-413, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Acidentes por animais peçonhentos - situação epidemiológica. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-oministerio/614-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/11-acidentes-por-animais-peconhentos/13931-situacao-epidemiologica-peconhentos>>. Acesso em: 28 de março de 2019.

CHIPPAUX, J. P. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005662, 2017.

CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 38, 2017.

FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J. A.; XAVIER-SANTOS, J. B.; PASSOS, J. G.; SILVA-JUNIOR, A. A.; TAMBOURGI, D. V.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v.125, p. 74-83, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17063, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; VILALLTA, M.; SÁNCHEZ, A.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; CALVETE, J.J. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 163, 2017.

MAGALHÃES, H. I.; DE ALMEIDA, A. L. M. C.; DA SILVA, G. R.; RABELO, J. I. D. L. B.; DA SILVA, P. M. G.; LACERDA, N. P. Relato de acidente botrópico que resultou em amputação. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017.

MOREIRA, J. P. L.; MORATO, R. G. Incidência e ocorrência de ataques ofídicos no Brasil em 2012. **Simpósio Mineiro de Geografia**, v. 1, 2014.

OJEDA, P.; RAMÍREZ, D.; ALZATE-MORALES, J.; CABALLERO, J.; KAAS, Q.; GONZÁLEZ, W. Computational Studies of Snake Venom Toxins. **Toxins**, v. 10, n. 1, p. 8, 2018.

OLIVEIRA, A. C. D.; RIBEIRO FILHO, J. D.; GUIMARÃES, J. D.; SILVA, A. R.; DANTAS, W. D. M. F.; BONFÁ, L. D. P.; FARIAS, S. K. D. Anticoagulant concentration, time and storage temperature on hematological parameters in automated blood count. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2521-2526, 2010.

PATRÃO-NETO, F. C.; TOMAZ, M. A.; STRAUCH, M. A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; ROCHA-JUNIOR, J. R. D. S.; BORGES, P. A.; CALIL-ELIAS, S.; MELO, P. A. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, v. 69, p. 55-64, 2013.

RITA DE CÁSSIA, O. C.; RANDAZZO-MOURA, P.; TAMASCIA, M. L.; DA SILVA, I. R. F.; ROCHA, T.; COGO, J. C.; HYSLOP, S.; SANNY, C. G.; RODRIGUES-SIMIONI, L. *Bothrops fonsecai* snake venom activities and cross-reactivity with commercial bothropic venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 191, p. 86-100, 2017.

SEELY, D. M.; WU, P.; MILLS, E. J. EDTA chelation therapy for cardiovascular disease: a systematic review. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 5, n. 1, p. 32, 2005.

SILVA-NETO, A. V.; SANTOS, W. G.; BOTELHO, A. F. M.; DIAMANTINO, G. M. L.; SOTO-BLANCO, B.; MELO, M. M. Use of EDTA in the treatment of local tissue damage caused by the *Bothrops alternatus* venom. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1529-1538, 2018.

SLAGBOOM, J.; KOOL, J.; HARRISON, R. A.; CASEWELL, N. R. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British journal of haematology**, v. 177, n. 6, p. 947-959, 2017.

TEIXEIRA, C.; MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M. **Venoms**. In: CAVAILLON, Jean-Marc; SINGER, Mervyn (Ed.). *Inflammation*, 4 volume set: From molecular and cellular mechanisms to the clinic. John Wiley & Sons, 2018.

VALLE, L. A.; SILVA, D. D. F. R.; MAGALHÃES, P. H.; MATTOS, P. A.; LEAL, J. A. Amputação bilateral de extremidades inferiores após acidente botrópico grave: relato de um caso. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 81-84, 2018.

 Anexo: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais -
CEUA



Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

PARECER CEUA - ESTÁCIO/FMJ

Protocolo número: 2018.01-04

Título do Projeto: “Multifuncionalidade biológica do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*: Contribuições a investigação da patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos e manifestações hemorrágicas durante o envenenamento”

Responsável pelo projeto: Auryclennedy Calou de Araújo

A comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte decidiu pela **APROVAÇÃO** dos procedimentos éticos apresentados neste protocolo.

Juazeiro de Norte/CE, 20 de Setembro de
2018

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Monalisa Ribeiro Silva'. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the end.

Monalisa Ribeiro Silva

Presidente da CEUA