



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL

ADRIANA FALCO DE BRITO

COMPARAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS EFEITOS DO VENENO
BRUTO DAS SERPENTES *CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS* E
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS EM RATOS WISTAR

Presidente Prudente - SP
2018

ADRIANA FALCO DE BRITO

**COMPARAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS EFEITOS DO VENENO
BRUTO DAS SERPENTES *CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS* E
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora – Área de concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Orientador:
Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira

636.089
B862c

Brito, Adriana Falco de.

Comparação clínica e laboratorial dos efeitos do veneno bruto das serpentes *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar / Adriana Falco de Brito. – Presidente Prudente, 2018.
63f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira.

1. Acidente crotálico. 2. Diagnóstico. 3. *Crotalus durissus*. I. Título.

ADRIANA FALCO DE BRITO

**COMPARAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS EFEITOS DO VENENO
BRUTO DAS SERPENTES *CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS* E
CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Presidente Prudente, 04 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Raimundo Alberto Tostes
Universidade Federal do Paraná - UFPR
Jandaia do Sul – PR

Dra. Danielle Alves Silva
Nikko Distribuidora Organnact
Curitiba - PR

Profa. Dra. Cecília Braga Laposy
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

*À minha mãe – Magda Martins Falco – exemplo de dedicação,
resiliência, resistência e força.*

*Ao meu filho - Gustavo Brito R. da Silva – melhor presente que a
vida me deu, por tudo que enfrentamos juntos até aqui e por tudo que
ainda há por vir.
Te amo de montão!!!*

*Aos meus irmãos – Thais e Paulo Marcos – tão iguais e tão
diferentes, tão longe e tão perto.*

Aos meus cunhados – Hélio e Lara – pela torcida.

*À doce -Maria dos Anjos - única criatura que pode me chamar de TIA, que veio
trazendo ainda mais amor e luz para todos nós.*

OHANA

AGRADECIMENTOS

*Como agradecer à orientadora, amiga e irmã de coração **Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira** pelo apoio, paciência e orientação?*

Não há palavras em nenhuma língua da face da terra.

*À banca examinadora desta defesa – **Prof. Dr. Raimundo A. Tostes, Dra. Danielle A. Silva, Prof. Dr. Rafael S. Floriano e Profa. Dra. Cecília B. Laposy** – é uma honra tê-los como avaliadores.*

*À banca de qualificação deste trabalho – **Profa. Dra. Cecília B. Laposy e Profa. Dra. Francis L. Pacagnelli** – por aceitarem o convite para contribuir na minha formação.*

*Aos colegas e amigos, irmã e filho de consideração, **Silvia Franco Andrade e Luís Felipe da Costa Zulim**, pelo apoio firme, incentivo, ajuda e estímulo nessa jornada.*

*Aos funcionários do Biotério de Experimentação **Gracielle Vieira Gonçalves e Lucas Batista dos Santos**, pela ajuda durante a execução deste projeto.*

Aos funcionários do Biotério Central e do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Unoeste.

*Aos colegas participantes deste projeto pelo companheirismo e cumplicidade **Paulo Felipe Izique Goiozo, Elaine Carrion de Fares, André Carrion de Fares Pinto, Cecília Braga Laposy, Ana Maria Siqueira Silveira Wehbe e Gabrielle Gomes dos Santos Ribeiro**.*

*Às minhas queridas Médicas Veterinárias Aprimorandas – **Giovanna, Mayra e Tauane** – pela retaguarda firme no atendimento da rotina e no acompanhamento dos alunos do setor, pela paciência e gestos de carinho nos momentos críticos de elaboração desse trabalho.*

*Aos colegas **Márcio Garcia Ribeiro** pela indicação da vaga que me trouxe para cá e pelo estímulo a seguir em frente e **Luís Carlos Vianna** que me apontou o caminho certo para lidar com alunos.*

In Memoriam

*Minha gratidão eterna aos mestres **José Giometti e Ênio Bandarra** por confiarem no meu potencial no início da carreira docente; se cheguei até aqui foi porque vocês me permitiram começar.*

*“Palavras são [...] nossa inesgotável fonte de magia.
Capazes de causar grandes sofrimentos e também de remediá-los.”
(Alvo Dumbledore – J. K. Rowling)*

RESUMO

COMPARAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS EFEITOS DO VENENO BRUTO DAS SERPENTES *CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS* E *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* EM RATOS WISTAR

Acidentes ofídicos representam um grave problema de Saúde Pública e fazem parte da lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde. Milhões de acidentes ocorrem anualmente, com milhares de mortes e incapacitações temporárias ou permanentes. O soro antiofídico para o tratamento nem sempre está disponível ou é adequado para o tipo de serpente da região. Há um grande impacto econômico nas famílias e comunidades atingidas. O Brasil relata a maioria dos casos da América Latina com mais de vinte mil casos anuais e letalidade média geral de 3,5% no período entre 2007 e 2016. A maioria desses acidentes é atribuída ao gênero *Bothrops*. O acidente crotálico corresponde a cerca de 19% do total, mas tem letalidade média de 8,12%. Em Medicina Veterinária os acidentes ofídicos não são de notificação obrigatória. O diagnóstico, quando a serpente não pode ser identificada, depende da avaliação clínica e laboratorial. Considerando a complexidade dos acidentes ofídicos, seu alto custo e riscos durante o tratamento, o diagnóstico clínico e laboratorial preciso é fundamental para que o profissional de saúde possa atuar de forma eficaz. Conhecer as alterações clínicas e laboratoriais facilita o diagnóstico correto e a avaliação da gravidade do quadro, orientando o tratamento do paciente. O objetivo desse estudo foi comparar os efeitos da intoxicação experimental em ratos Wistar com veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc) e *Crotalus durissus terrificus* (Cdt). Sessenta ratos Wistar foram distribuídos em três grupos (n=20) e tratados com: grupo 1 (G1): controle, solução salina a 0,9% intramuscular (IM); grupo 2 (G2): 1mg Kg⁻¹ de veneno de Cdc IM; grupo 3(G3): 1mg Kg⁻¹ de veneno de Cdt IM. Foram avaliados locomoção e postura, membro inoculado e atividade motora nos momentos: M0 (antes da inoculação), M1 (60 min. após) e M2 (120 min. após). Avaliação de hemograma, bioquímica sérica (alaninoaminotransferase - ALT, aspartatoaminotransferase - AST, fosfatase alcalina -ALP, ureia, creatinina, creatina quinase - CK e CK-MB) e histopatologia ocorreu seis horas após. Nossos achados concordam com os de outros autores, porém nenhum outro estudo compara os efeitos dos dois venenos crotálicos. Ambos os venenos provocaram alterações clínicas, laboratoriais e histológicas na primeira hora, com acentuação ao longo do tempo. As alterações clínica e histológica muscular foram mais evidentes nos animais intoxicados com veneno da Cdt. Já o veneno da Cdc provocou maiores alterações laboratoriais, tanto no hemograma como na bioquímica sérica. Conclui-se que os dois venenos provocam alterações clínica, laboratorial e histológica muscular na primeira hora após inoculação do veneno, com piora gradativa ao longo do tempo, sendo as alterações clínicas e histológicas mais evidentes nos animais intoxicados com veneno da Cdt e as laboratoriais do hemograma e bioquímica sérica mais evidentes para o veneno da Cdc. Sugere-se que outros estudos sejam realizados com as diferentes frações de cada veneno e do veneno bruto sobre os diferentes tipos musculares.

Palavras-chave: Acidente crotálico. Diagnóstico. *Crotalus durissus terrificus*. *Crotalus durissus collilineatus*. Análise clínica. Análise laboratorial.

ABSTRACT

CLINICAL AND LABORATORIAL COMPARISON OF THE EFFECTS OF THE SERPENT CROSS VENOM *CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS* AND *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* IN WISTAR RATS

Snakebites constitute a serious public health problem and are part of the list of neglected diseases of the World Health Organization. Million accidents occur annually, with thousands of deaths and temporary or permanent disability. The snake antivenoms for treatment not always available or is appropriate for the type of snake in the region. There is a large economic impact on families and communities affected. The Brazil reports the most cases of Latin America with more than 20000 annual cases and general average lethality of 3.5% in the period between 2007 and 2016. Most of these accidents is attributed to the genus *Bothrops*. The accident crotálico is about 19% of the total, but has average 8.12% lethality. In veterinary medicine the snakebites are not notifiable. The diagnosis, when the serpent cannot be identified, depends on the clinical and laboratory assessment. Considering the complexity of snakebites, your high cost and risks during treatment, the clinical and laboratory diagnosis need is fundamental for the health care professional can act effectively. Meet the clinical and laboratory facilitates the correct diagnosis and assessment of severity of the frame, guiding the patient's treatment. The aim of this study was to compare the effects of experimental poisoning in Wistar rats with *Crotalus durissus collilineatus* crude venom (*Cdc*) and *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*). 60 Wistar rats were divided into three groups (n = 20) and treated with: Group 1 (G1): control, saline solution 0.9% intramuscular (IM); Group 2 (G2): 1 mg Kg⁻¹ of poison from *Cdc* IM; Group 3 (G3): 1 mg Kg⁻¹ of poison of *Cdt* IM. Locomotion and posture were evaluated, and motor activity in inoculated Member moments: M0 (prior to inoculation), M1 (60 min. after) and M2 (120 min. after). Evaluation of complete blood count, serum Biochemistry (alaninoaminotransferase-ALT, AST, alkaline phosphatase-aspartatoaminotransferase-ALP, urea, creatinine, creatine kinase-CK and CK-MB) and histopathology occurred 6 hours after. Our findings agree with those of other authors, but no other study compares the effects of two poisons crotálicos. Both poisons have resulted in clinical, laboratory and histological changes in the first hour, with accent marks over time. Clinical and histological changes were most evident in muscle of animals poisoned with the poison of *Cdt*. *Cdc* caused major changes in both the laboratory blood test as in serum biochemistry. It is concluded that both poisons cause clinical, laboratory and histological changes of muscle in the first hour after inoculation of the venom, with gradual worsening over time, being clinical and histological changes more evident in animals intoxicated with venom of the *Cdt* and the blood count and serum biochemistry laboratory more evident to the venom of the *Cdc* suggests that other studies to be carried out with the different fractions of each poison and raw venom about the different muscle types.

Keywords: Crotalic Accident. Diagnosis. *Crotalus durissus terrificus*. *Crotalus durissus collilineatus*. Clinical analysis. Laboratory analysis.

LISTA DE SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
<i>C.d.</i>	<i>Crotalus durissus</i>
<i>Cdc.</i>	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>
<i>Cdt.</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CK	Creatina quinase
CK-MB	Fração MB da creatina quinase
DALY's	Disability Adjusted Life Years (Esperança de Vida corrigida pela Incapacidade)
DHL	Desidrogenase láctica
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
G1	Grupo 1 – controle
G2	Grupo 2 – inoculado com Cdc
G3	Grupo 3 – inoculado com Cdt
IM	Intramuscular
M0	Momento zero
M1	Momento 1 (60 minutos após inoculação)
M2	Momento 2 (120 minutos após inoculação)
Mg Kg ⁻¹	Miligrama por quilo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Peçonha Bruta
RDW-CV	<i>Red Cell Distribution Width</i> (Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNESP	Universidade Estadual Paulista

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Acidentes por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil.....	16
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quantidade relativa de espécies de serpentes com importância médica.....	18
Figura 2 - Detalhe da cabeça de uma cascavel e da fosseta loreal (seta).....	20
Figura 3 - Dentição solenóglifa presente nas cascavéis.....	21
Figura 4 - Características das caudas das serpentes peçonhentas.....	21
Figura 5 - Guizos de <i>Crotalus durissus terrificus</i> com quantidade diferente de anéis.....	22
Figura 6 - <i>Crotalus durissus</i> , América do Sul	22
Figura 7 - Distribuição do gênero <i>Crotalus durissus</i> no Brasil.....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Classificação das serpentes	18
2.2	Gênero <i>Crotalus</i>	22
2.3	Composição do veneno crotálico	24
2.3.1	Crotoxina	26
2.3.2	Crotamina.....	27
2.3.3	Giroxina	28
2.3.4	Convulxina	28
2.4	Sinais clínicos	28
2.5	Alterações laboratoriais	30
	REFERÊNCIAS	32
3	ARTIGO	40
	ANEXO A – Parecer de aprovação	61
	ANEXO B - Termo de doação do pool de venenos	62
	ANEXO C - Quadro comparativo de alterações encontradas	63

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um grave problema de Saúde Pública e foram reinseridos na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017, quando o órgão publicou uma resolução com várias iniciativas para melhoria da situação nas áreas mais afetadas (CHIPPPAUX, 2017; MEDIAVILLA, 2018). Estimativa da OMS aponta cerca de 5 milhões de acidentes ofídicos por ano, que resultam em até 2,7 milhões de envenenamentos. São relatadas anualmente entre 81.000 e 138.000 mortes, além de cerca de 400.000 amputações e outras incapacidades permanentes. Muitos acidentes ofídicos não são notificados, ou porque as vítimas procuram tratamentos não médicos ou porque não têm acesso a cuidados de saúde. Acredita-se, portanto, que esse número seja resultado de subnotificação (OMS, 2018).

A soroterapia é o tratamento padrão, com uso de soro antiofídico produzido geralmente em equinos. O processo é caro e sofre com problemas de regionalização das espécies de serpentes, distribuição e manutenção quando o produto não é liofilizado, prazos de validade curtos do produto e dificuldade de acessibilidade quando necessário em áreas isoladas (CHIPPAUX, 2017).

As consequências dos envenenamentos envolvem a família toda. Em muitos casos eles aumentam os níveis de pobreza e pode haver estresse pós-traumático; as famílias gastam suas poupanças ou têm que pedir empréstimo para pagar pelo tratamento. O acesso ao soro antiofídico e ao tratamento é precário em países de baixo desenvolvimento e em zonas rurais. O custo benefício de produção leva à interrupção de produção pelos grandes laboratórios, há dificuldade de distribuição de produtos biológicos por falta de fornecimento de energia elétrica e falhas de treinamento das equipes de saúde (MEDIAVILLA, 2018; SERVA, 2018).

O custo médio do tratamento e o cálculo das DALYs (Disability Adjusted Life Years – Esperança de Vida corrigida pela Incapacidade) não são facilmente encontrados, mas apenas o custo do soro antiofídico pode variar de US\$ 50 a US\$ 640. Na Índia, em 2010, o tratamento custava em média US\$ 5150, podendo dobrar por causa de complicações (WHO, 2018). Mediavilla (2018) cita que, na Espanha, cada internação custaria cerca de €2000,00 (R\$8566,00). Kasturiratne et al. (2017) estimaram as DALYs em 11,01 a 15,076 anos no Sri Lanka como resultado de acidentes ofídicos.

Habib e Brown (2018) discutem em seu artigo que as manifestações psiquiátricas pós-acidente incluem depressão e estresse pós-traumático e podem afetar as vítimas, suas famílias e a comunidade local de maneira crônica, especialmente em comunidades rurais com agricultura de subsistência, onde são comuns. O impacto geral dos acidentes ofídicos na agricultura familiar não costuma ser formalmente calculado e, embora os acidentes ofídicos tenham um impacto alto em DALYs quando comparado a outras doenças negligenciadas, sua parcela no orçamento dos sistemas de saúde costuma ser menor.

O custo médio do tratamento dos acidentes ofídicos por DALY é mais baixo que o de outros problemas de saúde e, portanto, o custo benefício do tratamento antiofídico na prevenção de morte e sequelas é alto, devendo ser levado em consideração e ser tratado com prioridade (BROWN; LANDON, 2010; HABIB et al., 2015). Apesar de seu amplo impacto nas famílias e comunidades atingidas, há falta de investimento até por entidades filantrópicas, que priorizam enfermidades transmissíveis ou preveníveis por vacinas (CALVETE et al., 2018).

No Brasil o soro antiofídico para uso humano é fornecido ao Ministério da Saúde pelos laboratórios produtores oficiais brasileiros: Instituto Butantan (SP), Instituto Vital Brazil (RJ) e Fundação Ezequiel Dias (MG). A solicitação das doses e manutenção dos estoques é responsabilidade dos Estados e Municípios, a partir dos dados epidemiológicos de ocorrência (AQUINO; SOUZA; ABREU, 2017).

O soro antiofídico brasileiro é líquido e necessita de refrigeração para transporte e armazenamento. Há soros liofilizados disponíveis na América Latina, mas não há importação destes produtos. Um dos problemas para a importação é a falta de especificidade do produto, já que não seria produzido com o veneno de serpentes locais. O custo por dose do soro líquido é de R\$ 150 a R\$ 200. Para haver produção nacional de soro liofilizado, o investimento em uma máquina de liofilização giraria em torno de R\$ 3,8 milhões e o custo do frasco de soro liofilizado seria cerca de 50% maior (SERVA, 2018).

Em estudo realizado no Estado de Roraima, o número médio de ampolas de soro antiofídico utilizado por tratamento variou de 6,5 a 11,5 com falhas no conhecimento clínico e epidemiológico para a real classificação do quadro e, por consequência, administração inadequada de doses. Os mesmos autores citam que a produção do soro utilizado na região é realizada em outros estados com espécies que não representam a fauna regional (RORIZ et al., 2018).

A realidade é que hospitais em áreas onde acidentes ofídicos são comuns nem sempre conseguem manter estoque necessário de soro antiofídico, mesmo que os pacientes tenham condições de pagar pelo tratamento. Isso aumenta o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento, pois as vítimas necessitam de transporte para hospitais mais distantes (HABIB; BROWN, 2018). O tempo máximo considerado adequado descrito na literatura médica é de 6 horas. No estudo de Roriz et al. (2018), 72,7% dos pacientes levaram mais de 6 horas entre a picada e a chegada ao hospital, tempo relacionado à distância entre o domicílio e o hospital de referência para tratamento antiofídico.

Devido ao amplo território e grande diversidade de espécies de serpentes peçonhentas, o Brasil apresenta o maior índice de acidentes ofídicos da América Latina, com cerca de 26 mil a 29 mil casos por ano, seguido pela Venezuela (7000), Colômbia (3000) e Equador (1400 – 1600). Segundo os últimos dados, houve uma redução nos impactos regionais dos acidentes, relacionada às melhorias no atendimento aos pacientes. As regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil possuem a maior proporção de casos de ofidismo em relação ao número de habitantes (RORIZ et al., 2018).

Bochner e Struchiner (2003) realizaram uma revisão de relatos de acidentes ofídicos no Brasil e observaram que as variáveis presentes em mais de 50% dos estudos - como sexo, idade, mês de ocorrência, local da picada, gênero da serpente, tempo decorrido entre o acidente e o atendimento e evolução - já haviam sido descritos por Vital Brazil em 1901. Segundo eles, o perfil dos acidentes se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos no Brasil. Ocorrem com maior frequência no início e no final do ano, em pessoas do sexo masculino, em trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva de 15 a 49 anos; atingem sobretudo os membros inferiores. A maioria desses acidentes é atribuída ao gênero *Bothrops*.

Segue número de notificações e óbitos causados por acidentes com serpentes no Brasil, de 2007 a 2016 (BRASIL, 2018). Apesar do acidente crotálico não ser o mais comum, é o que possui maior letalidade (8,12%) quando comparado aos outros acidentes ofídicos (Tabela 1). Em grande parte dos acidentes não há identificação da espécie agressora e o diagnóstico do tipo de envenenamento é baseado apenas em critérios clínicos e epidemiológicos. Há problemas de preenchimento dos formulários, em 28400 prontuários a causa da morte está

assinalada como ignorada ou em branco. Não há como identificar quais seriam as outras causas de óbito relacionadas aos acidentes ofídicos.

Tabela 1: Acidentes por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil
Notificações por Tipo Serpente e Evolução do caso. Período: 2007-2016

Tipo Serpente	Ign/Branco	Cura	Óbito pelo agravo notificado (Letalidade)	Óbito por outra causa	Total
<i>Bothrops</i>	24656	176864	752 (3,05%)	69	202341
<i>Crotalus</i>	2351	18230	191 (8,12%)	16	20788
<i>Micrurus</i>	276	1832	5 (1,81%)	-	2113
<i>Lachesis</i>	1117	7189	60 (5,37%)	3	8369
Total	28400	204115	1008 (3,5%)	88	233611

Fonte: Brasil (2018).

Castro (2006) cita que a incidência de casos de acidentes ofídicos no Brasil tinha média de 20 mil casos por ano em 1992, sendo 86,16% deles acidentes botrópicos e 8,94% crotálicos, número que se manteve inalterado pelo observado no Quadro 1. Em adição, a mortalidade geral seria de 6% à época. A letalidade geral dos acidentes observada entre 2007 e 2016 foi de 3,5%, o que representa uma queda significativa. Duarte e Menezes (2013) citam que o acidente crotálico é responsável por 7,7% dos 20 mil acidentes ofídicos ocorridos no Brasil.

Não há obrigatoriedade da notificação dos acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. Em um estudo retrospectivo dos dados dos prontuários de atendimento no período de 1972 a 1989 junto ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu, foram registrados 149 acidentes ofídicos, sendo 128 causados por *Bothrops*, 11 por *Crotalus* e 10 sem identificação. Dentre os acidentes, 103 ocorreram em caninos, 22 em equinos, 17 em bovinos, quatro em caprinos, dois em felinos e um em suíno (BICUDO, 1994).

Tokarnia e Peixoto (2006) realizaram um levantamento sobre a importância dos acidentes ofídicos em bovinos no Brasil e concluíram que as opiniões sobre o assunto eram divergentes entre os profissionais da área. Os diagnósticos eram realizados a distância, sem avaliação clínica ou laboratorial e sem realização de

necropsia ou histopatologia e que, baseados nos dados e em sua experiência, acidentes ofídicos fatais em bovinos seriam menos frequentes do que se acredita.

Santos et al. (2013) citam que no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram atendidos 10 cães envenenados por serpentes no ano de 2012 até maio de 2013, sendo nove acidentes crotálicos e um botrópico. Os diagnósticos caninos foram realizados com base na identificação da serpente, nas manifestações clínicas e achados laboratoriais.

Considerando a complexidade dos acidentes ofídicos, seu alto custo e riscos durante o tratamento, o diagnóstico clínico e laboratorial preciso é fundamental para que o profissional de saúde possa atuar de forma eficaz. Conhecer as alterações clínicas e laboratoriais facilita o diagnóstico correto e a avaliação da gravidade do quadro, orientando o tratamento do paciente.

O objetivo geral deste trabalho foi analisar e comparar os efeitos clínicos e laboratoriais do envenenamento experimental em ratos Wistar com a peçonha bruta de *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*.

Os objetivos específicos foram avaliar as alterações no membro inoculado e atividade motora nos momentos 60 e 120 minutos pós inoculação; avaliar as alterações no hemograma e na bioquímica sérica (alaninoaminotransferase - ALT, aspartatoaminotransferase - AST, fosfatase alcalina – ALP, ureia, creatinina, creatino quinase - CK e fração MB da creatino quinase – CK-MB); avaliar as alterações histopatológicas no músculo do membro inoculado; calcular o tamanho do efeito das variáveis segmentados, CK e ALT.

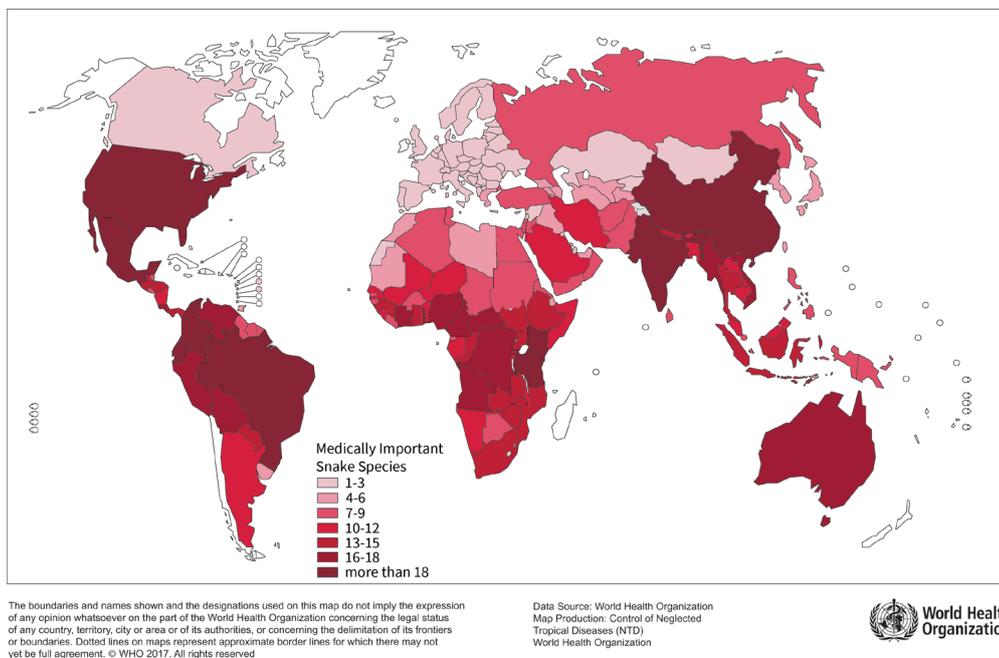
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação das serpentes

Serpentes estão amplamente distribuídas pelo mundo com maior concentração em regiões tropicais e subtropicais; não há serpentes na Antártida. Já foram descritas cerca de 2.900 espécies de serpentes, de 465 gêneros e 20 famílias (OMS, 2018). Seu corpo é alongado e recoberto por escamas, não possuem ouvidos externos nem apêndices locomotores. Sua respiração é pulmonar e a língua é delgada e bífida, relacionada com o sentido do olfato. São poiquilotérmicas e dependem de fonte externa de calor para a manutenção da temperatura corporal (BLANCO; MELO, 2014a).

Aproximadamente 250 espécies de serpentes são listadas pela OMS como sendo de importância médica em razão do dano que seu veneno pode causar. As serpentes podem ser encontradas em 160 países do mundo (Figura 1). O ofidismo é um problema de saúde pública particularmente importante em áreas rurais de países tropicais e subtropicais situados na África, Oriente Médio, Ásia, Oceania e América Latina (OMS, 2018).

Figura 1: Quantidade relativa de espécies de serpentes com importância médica.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2018).

Longbottom et al. (2018) realizaram um estudo global e seus dados mostram que cerca de 6,85 bilhões de pessoas vivem em áreas habitadas por serpentes peçonhentas, sendo que 146,7 milhões delas em áreas remotas, onde faltam recursos médicos eficazes. Há disponibilidade de soro antiofídico apenas contra 159 (57%) das espécies de serpentes conhecidas.

O Brasil apresenta uma das mais ricas faunas do Planeta, sendo conhecidas 366 espécies de serpentes, pertencentes a 10 famílias: *Anomalepididae* (6 espécies), *Leptotyphlopidae* (14), *Typhlopidae* (6), *Aniliidae* (1), *Tropidophiidae* (1), *Boidae* (12), *Colubridae* (34), *Dipsadidae* (237), *Elapidae* (27) e *Viperidae* (28). Dessas, 15% (55 espécies) são consideradas peçonhentas e são responsáveis por até 20 mil acidentes ofídicos anualmente no país (BERNARDE, 2011). As serpentes peçonhentas no país pertencem a duas famílias: *Viperidae* (acidentes botrópico, crotálico e laquélico) e *Elapidae* (acidente elapídico) (BLANCO; MELO, 2014a).

A família *Viperidae* apresenta cabeça triangular, olhos pequenos com pupilas em fendas e um par de fossetas loreais (Figura 2). Situada entre as narinas

e os olhos, a fosseta funciona como órgão sensorial termo receptor, captando também as vibrações do ar, por intermédio da membrana que reveste o septo entre suas duas câmaras (BLANCO; MELO, 2014a). Segundo a FUNASA (2001), a presença da fosseta loreal indica com segurança que a serpente é peçonhenta. É encontrada nos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, daí a denominação popular de “serpente de quatro ventas”. Todas as serpentes destes gêneros são providas de dentes inoculadores bem desenvolvidos e móveis, situados na porção anterior do maxilar.

Figura 2: Detalhe da cabeça de uma cascavel e da fosseta loreal (seta).



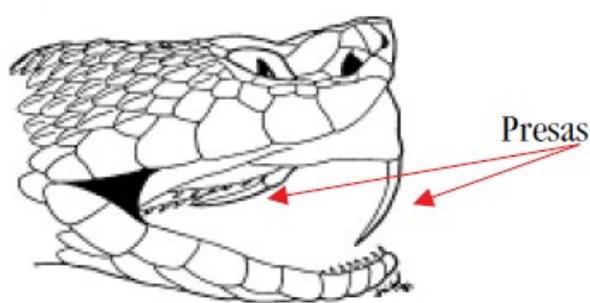
Fonte: Blanco e Melo (2014a).

A dentição das serpentes é uma característica importante, pois a inoculação do veneno depende de presas apropriadas para esta função. De acordo com a dentição as serpentes podem ser classificadas em quatro grupos: **áglifa** - não apresenta presas inoculadoras de veneno, os dentes são maciços, sem canal central nem sulco externo – são as serpentes não peçonhentas, como as jiboias e as sucuris; **opistóglifa** - possui duas ou mais presas com sulco externo na posição posterior do maxilar superior - fazem parte deste grupo as falsas corais; **proteróglifa** - dotada de um par de presas fixas com um canal central, localizadas na posição anterior do maxilar superior - característica das corais verdadeiras; **solenóglifa** -

possui um par de presas inoculadoras grandes pontiagudas e retráteis, com um canal central, localizadas na porção anterior do maxilar superior (Figura 3); está presente nas jararacas, cascavéis e surucucus (BLANCO; MELO, 2014a).

O veneno é produzido pelas glândulas de veneno supralabiais, presentes nos dois lados da cabeça, ao longo dos maxilares. A constituição dos venenos é bastante complexa, contendo toxinas com diversas atividades (BLANCO; MELO, 2014a). As principais frações do veneno crotálico são: crotóxina, crotamina, giroxina e convulxina (BLANCO; MELO, 2014b).

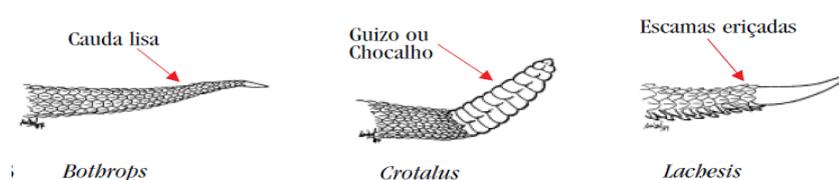
Figura 3: Dentição solenóglifa presente nas cascavéis.



Fonte: FUNASA (2001).

A cauda também é importante item para identificação das espécies dessa família (Figura 4). A presença do guizo ou chocalho identifica as serpentes do gênero *Crotalus*. A quantidade de anéis (Figura 5) está relacionada ao número de trocas de pele e à possível idade da serpente (FUNASA, 2001).

Figura 4: Características das caudas das serpentes peçonhentas.



Fonte: FUNASA (2001).

Figura 5: Guizos de *Crotalus durissus terrificus* com quantidade diferente de anéis.



Fonte: Blanco e Melo (2014b).

2.2 Gênero *Crotalus*

As serpentes do gênero *Crotalus* (Figura 6) encontram-se de modo geral em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas, encostas de morro, cerrados e, raramente, na faixa litorânea ou nas florestas úmidas (BLANCO; MELO 2014b).

Figura 6: *Crotalus durissus*, América do Sul



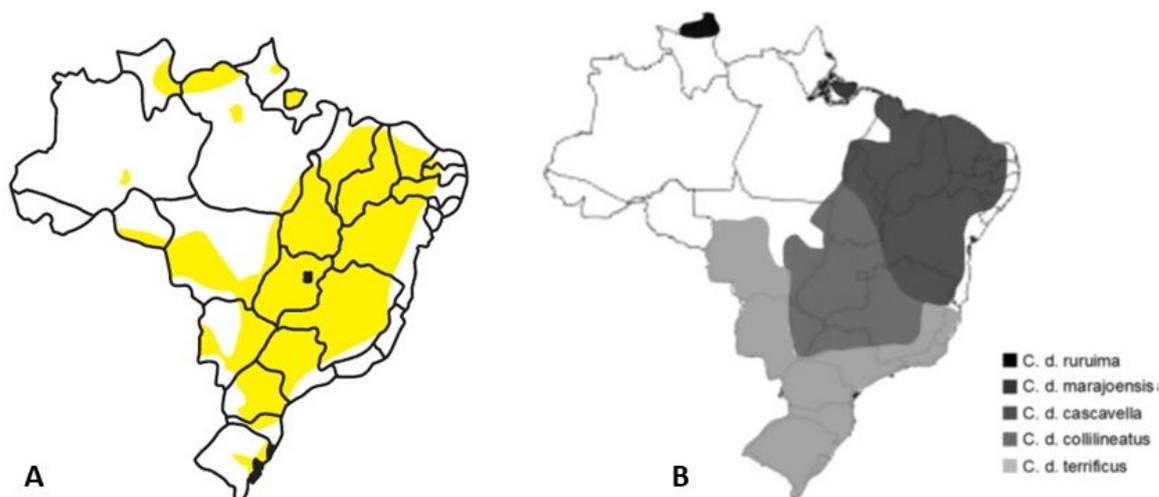
Fonte: Willians (2017).

Estão representadas, no Brasil, por uma única espécie, a *Crotalus durissus* (*C.d.*) e distribuídas em seis subespécies: *C.d. terrificus*, *C.d. collilineatus*, *C.d. cascavella*, *C.d. ruruima*, *C.d. marajoensis* e *C.d. trigonicus* (SAKATE, 2002; BERNARDE, 2011; BLANCO; MELO 2014b). Popularmente são conhecidas por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracamboia, maracá e outras denominações populares. Não costumam atacar e, quando provocadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho (FUNASA, 2001). As serpentes do gênero *Crotalus* têm distribuição irregular no Brasil, o que determina variações na frequência de registros de acidentes humanos. As subespécies *C.d. terrificus* e *C.d. collilineatus* são as mais frequentes no Sudeste (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

Ingenloff e Peterson (2015) utilizaram modelos de nicho ecológico para identificar corredores potenciais de dispersão das serpentes do gênero *Crotalus* durante o Pleistoceno (2.5 milhões e 11,7 mil anos atrás). Os estudos indicaram duas possíveis rotas de dispersão durante o último ciclo glacial que resultaram nas duas áreas de distribuição atual do gênero em habitats norte e sul da Bacia Amazônica.

É consenso que as espécies de *C. durissus* são derivadas de um ancestral norte americano, podendo ser vistas em áreas secas do México até a Argentina. São ausentes na América Central e na floresta amazônica, mas sua distribuição tem sido alterada pela atividade humana. A fragmentação da floresta amazônica e as enchentes se tornaram variáveis importantes de dispersão desse gênero (DUARTE; MENEZES, 2013). A figura 7 mostra a alteração de distribuição do gênero no Brasil segundo fonte oficial do MS (A) e uma mais recente (B), com indicação de mapeamento das diferentes subespécies.

Figura 7: Distribuição da espécie *Crotalus durissus* no Brasil



Fonte: A: Funasa (2001), B: Guidolin et al. (2013).

A classificação taxonômica das serpentes tem sofrido mudanças, o que pode gerar certa confusão no meio científico. As cascavéis, comumente descritas como pertencentes ao gênero *Crotalus*, foram alocadas no gênero *Caudisona* (BERNARDE, 2011). Blanco e Melo (2014b) relatam que esta classificação logo deixou de ser aceita.

2.3 Composição do veneno crotálico

A composição química das peçonhas é uma mistura extremamente complexa de proteínas farmacológica e bioquimicamente ativas e as lesões resultantes de sua inoculação, além de dependerem da natureza dos elementos dessa mistura, dependem também da interação biológica entre cada um deles (DAL PAI; NETO, 1994).

O principal componente da peçonha das serpentes do gênero *Crotalus* é uma neurotoxina fosfolipase A₂ denominada crotovina. Outras toxinas importantes foram identificadas, como a giroxina, que é uma serinoprotease trombina *like*, um agregador de proteínas denominado convulxina e um polipeptídeo miotóxico conhecido como crotamina (LIMA et al., 2018).

Céspedes et al. (2010) compararam na Colômbia a composição proteica e a ação da peçonha bruta (PB) de oito espécimes de *C. d. cumanensis*. Diferenças nos perfis proteicos, letalidade, propriedades hemolítica, coagulante e desfibrinante foram observadas, confirmando a alta variabilidade do veneno das espécies de *Crotalus*.

Boldrini-França et al. (2010) compararam a composição dos venenos das *C.d. cascavella* e *C.d. collilineatus* e concluíram que a PB dessas espécies possui entre 20 a 25 toxinas principais e que as espécies compartilham cerca de 90% da composição da peçonha. A fração crotamina representou 20,8% em média das proteínas totais da PB da *C.d.collilineatus*, mas estava ausente na PB da *C.d.cascavella*. A crotoxina neurotóxica foi a fração mais abundante nos dois venenos e frações miotóxicas tiveram concentrações mais baixas na PB da *C.d. collilineatus*. Baseados nesses achados, os autores discutem a eficácia dos antivenenos produzidos.

De Oliveira et al. (2009) realizaram análise comparativa da variação na composição do veneno de 22 espécimes de *C.d. collilineatus*. Houve diferenças qualitativas e quantitativas significativas. Alguns componentes do veneno foram identificados pela primeira vez em *C. d. collilineatus*, como a glutathione peroxidase, fator de crescimento nervoso, 5'-nucleotidase, enzima conversora de angiotensina, carboxipeptidase, fosfodiesterase, glutaminil ciclase e fosfolipase B. Em relação à atividade da hialuronidase, dois venenos não apresentaram atividade enzimática detectável nas quantidades testadas. Além disso, o envenenamento crotálico *in vivo* em camundongos mostrou que venenos de diferentes espécimes resultaram em alterações diferentes de parâmetros bioquímicos e imunológicos, como CK e interleucina 6 (IL6). Este estudo demonstrou variações intraespecíficas significativas no veneno de *C. d. collilineatus*, que podem ter impacto no diagnóstico dos acidentes e na produção e eficácia da terapia antiveneno.

2.3.1 Crotoxina

Cerca de 50% da fração do veneno é o complexo molar de proporção 1:1 denominado crotoxina. Esta é formada por uma fração básica, chamada crotoxina B, com atividade fosfolipase A2, e uma fração ácida chamada crotoxina A ou crotapotina, sem atividade enzimática (PUIG et al., 1995). A crotapotina de

C.d.terrificus apresenta um padrão de substituição de aminoácidos que produziriam dez tipos de crotapotinas diferentes (DE OLIVEIRA, 2017). Quando um componente da crotoxina é separado do outro, seu efeito tóxico é praticamente anulado, sendo dez vezes menor que a sua forma associada (SAMPAIO et al., 2010).

A fração crotoxina produz efeitos tanto no sistema nervoso central (SNC) como no sistema nervoso periférico (SNP). Causa lesões na junção neuromuscular e fibras musculares, provocando bloqueio periférico irreversível da transmissão neuromuscular, podendo levar o paciente a óbito por paralisia respiratória. Tem efeito bifásico na excitação da acetilcolina, atuando em canais iônicos e desencadeando falhas na liberação de acetilcolina na pré-sinapse. Ação pós-sináptica por dessensibilização do receptor nicotínico não pode ser excluída (CAVALCANTE et al., 2017).

As neurotoxinas são classicamente divididas em pré e pós-sinápticas, e estudos revelam que algumas neurotoxinas produzem redução do número de vesículas sinápticas do terminal motor das junções neuromusculares. Estes distúrbios podem estar relacionados ao mecanismo de reciclagem da membrana axolemal, durante os fenômenos de reconstituição das vesículas sinápticas ou à atividade fosfolipásica (DAL PAI; NETO, 1994). Ribeiro et al. (2012) estudaram os efeitos da crotoxina na indução de paralisia em músculo extraocular e concluíram que ela apresentou efeito semelhante ao da toxina botulínica tipo A.

A maior parte dos venenos ofídicos possui atividade fosfolipásica e, sendo a bainha de mielina constituída de lipídios, pode-se admitir que, dependendo da concentração dessa enzima, lesões de componentes nervosos intramusculares podem ocorrer. Após quatro a seis horas da inoculação da crotoxina são observadas lesões subsarcolêmicas com edema intramitocondrial e, após 24 a 48h, as mitocôndrias apresentam depósitos densos, com elevada concentração de cálcio. Na inoculação de fosfolipase A2, observou-se necrose com qualquer dose; concluindo, portanto, que as lesões provocadas pela crotoxina, embora mais graves, são as mesmas causadas pela fosfolipase A2 (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; KINI; EVANS, 1989).

A crotoxina também é capaz de produzir uma miotoxicidade moderada. Na atualidade, várias isoformas têm sido isoladas (TOYAMA et al., 2000). A atividade miotóxica ocorre por alteração nos canais de sódio da membrana plasmática das células musculares. Há liberação maciça de mioglobina e rbdomiólise com aumento

nos níveis de CK, desidrogenase láctica (DHL) e AST (CASTRO, 2006). Silva et al. (2012), em estudo de inoculação em pele de dorso de ratos Wistar, concluíram que não ocorrem manifestações clínicas macroscópicas visíveis da crotoxina, apesar dos efeitos edematogênico, inflamatório e necrosante.

2.3.2 Crotamina

A crotamina é um polipeptídeo básico muito menos tóxico que a crotoxina. Representa entre 10 a 25% do peso seco da peçonha bruta e nem todas as serpentes do gênero *Crotalus* expressam essa fração (LIMA et al., 2018). Ela ativa canais de sódio quase exclusivamente na membrana celular e nas fibras do músculo esquelético, induzindo um influxo desse cátion. A crotamina despolariza o músculo esquelético por meio de um mecanismo que envolve a participação de canais de sódio tetrodoxina sensíveis, enquanto a miotoxina promove a liberação do cálcio citoplasmático, através do receptor de iódine. Outro dado importante da crotamina recai sobre a sua potente ação analgésica, muitas vezes comparada à morfina, observada primeiramente em ratos (HUDELSON; HUDELSON, 1995; MANCIN et al., 1998).

Há indícios de que a musculatura esquelética seja o seu principal alvo de ação. A principal característica observada em inoculação experimental de crotamina pura em animais de laboratório é a síndrome da paralisia dos membros seguida de morte por paralisia respiratória. Esse efeito é dose dependente e representa uma vantagem evolutiva no ciclo natural uma vez que facilita a captura da presa (LIMA et al., 2018).

2.3.3 Giroxina

A giroxina, descrita por Barrio em 1961 e isolada por Barrabin et al. 1978, produz sintomas labirínticos e não é considerada letal. É uma enzima trombina símile com ação indutora de coágulos, pertencente ao grupo das serinoprotease, enzimas catalíticas que clivam ligações peptídicas nas quais uma serina é o aminoácido nucleofílico no sítio ativo. Pode, também, ter atividade esterásica, por induzir efeitos motores como espasmos, opistótono, arreflexias, parestesia e alterações do equilíbrio, culminando na síndrome de rolamento em barril, no qual o

animal executa giros em seu próprio eixo longitudinal, aparentemente devido a convulsões de origem central, como sugerido por eletroencefalogramas (SILVA et al., 2016).

Costa et al. (2018) purificaram e isolaram uma nova isoforma de gioxina a partir de *C.d. terrificus* com efeito pró inflamatório significativo. Os autores estudaram sua capacidade de causar edema pela via metabólica do ácido araquidônico envolvendo vários tipos de mediadores.

2.3.4 Convulxina

A convulxina induz a síntese de tromboxano A₂. É um potente agregador plaquetário com atividade similar à da trombina causando agregação plaquetária ou aglutinação plaquetária *in vitro* com transformação do fibrinogênio sérico em fibrina (BARRAVIERA, 1994; FRANCISCHETTI et al., 1997; BLANCO; MELO, 2014b). Outros sinais clínicos atribuídos à convulxina são o aparecimento de convulsões, alterações circulatórias e respiratórias (AMARAL; MAGALHÃES; REZENDE, 1991).

2.4 Sinais clínicos

Roriz et al. (2018) relatam que a identificação da serpente agressora é realizada pelo conjunto de sinais e sintomas apresentados pelo paciente no momento do atendimento. O sinal mais evidente em humanos é a *facies miastenica*, resultado da atividade neurotóxica do veneno crotálico. Nas primeiras seis horas há ptose palpebral, oftalmoplegia, visão turva ou diplopia. Queixas menos frequentes são dificuldade de deglutição, de respiração e alterações de olfato e paladar. Há mioglobulinúria e dores musculares generalizadas, resultado da ação miotóxica. Pode haver incoagulabilidade sanguínea em cerca de 40% dos pacientes, devido à ação coagulante da fração tipo trombina do veneno (PINHO; PEREIRA, 2001; AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

Envenenamento experimental em equinos causou aumento de volume no local de inoculação (escápula) que se estendeu por todo o membro, apatia e cabeça baixa, alterações locomotoras evidenciadas pelo arrastar das pinças no solo, decúbito e dificuldade para levantar, redução dos reflexos auricular, palatal, do lábio superior e de ameaça, e aumento das frequências cardíaca e respiratória (LOPES et

al., 2012). O edema no local de inoculação visto em equinos não pôde ser observado em outras espécies de produção e, apesar de relatado em literatura como frequente, não foi observada hemoglobinúria nem lesões renais em bovinos e equinos (TOKARNIA et al., 2014).

Inoculação experimental em bubalinos e bovinos de PB de *C.d.terrificus* produziu quadro nervoso com paralisia flácida e hipotonia muscular generalizada. Nos bubalinos não houve paralisia ocular, observada nos bovinos. Os bubalinos foram mais resistentes aos efeitos do veneno. O edema no local de inoculação foi quase imperceptível e facilmente passaria despercebido durante exame clínico e na necropsia, dificultando o diagnóstico correto (BARBOSA et al., 2011).

Lago et al. (2000) inocularam bovinos experimentalmente e os animais apresentaram, cronologicamente, as seguintes alterações a partir da segunda hora: apatia, cabeça baixa, letargia profunda e edema discreto no local da inoculação; em seis horas o edema local desapareceu e mioclonias foram observadas nas grandes massas musculares; em 10 horas, houve diminuição do tônus muscular e de reflexos superficiais, aparecimento de incoordenação motora e decúbito esternal; em 14 horas, observaram-se movimentos de pedalagem e diminuição da sensibilidade profunda; em 16 horas houve paralisia flácida dos membros pélvicos; e, a partir da 20ª hora, surgiram dispneia, sialorreia e morte de todos os animais. A duração do curso clínico foi de 28 ± 9 horas e, muito embora estas alterações clínicas sejam comuns a outras doenças, os autores julgam que a rapidez e a ordem com que aparecem seja um fator determinante no diagnóstico diferencial.

Em cães, o edema no local de inoculação é discreto nas primeiras horas, podendo desaparecer após 6h. Geralmente, não se consegue identificar o local da picada, e o animal não apresenta sinais nociceptivos. Após 24h aproximadamente, surge mialgia, decorrente do efeito miotóxico do veneno e mioglobínúria. Os cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG apresentaram oftalmoplegia; midríase bilateral; boca aberta e disfagia (devido paralisia flácida dos músculos mandibulares) acompanhada de sialorreia; paralisia flácida (especialmente dos membros posteriores); ataxia; perda dos reflexos superficiais e profundos; sedação em graus variados; redução da frequência cardíaca; diminuição da pressão arterial; dispneia, taquipneia, insuficiência respiratória aguda e vômitos (SANTOS et al., 2013). Os mesmos sinais foram observados por Nogueira et al. (2007a). No local da inoculação, houve edema discreto, além de áreas focais e multifocais de coloração

esbranquiçada, bem marcadas, devido à degeneração e necrose, resposta do linfonodo poplíteo e discreta atividade mio regenerativa (NOGUEIRA et al., 2007b).

O acidente crotálico tem como complicações a insuficiência renal aguda e a insuficiência respiratória aguda. A insuficiência renal aguda é a principal causa de morte dos pacientes picados, geralmente ocorrendo nos casos graves ou tratados tardiamente. A dispneia com insuficiência respiratória é atribuída à paralisia muscular transitória (BLANCO; MELO, 2014b). Sangiorgio et al. (2008) avaliaram aspectos histopatológicos em envenenamentos experimentais de cães com veneno de *C.d. terrificus*. Houve mionecrose no membro inoculado, degeneração tubular renal, hiperplasia linfóide do baço e hepatite reativa inespecífica, demonstrando a antigenicidade e ação do veneno no sistema imunológico.

2.5 Alterações Laboratoriais

Em seres humanos há lesão de fibras musculares e rabdomiólise com liberação de enzimas e mioglobina. Há aumento de CK, DHL, AST e ALT séricas. A CK-MB pode se encontrar elevada em torno de 6% do total da CK. Biópsias musculares mostram necrose de fibras musculares mesmo em pontos distantes da picada (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003).

Em intoxicação experimental em cães com peçonha bruta de *C.d. terrificus*, Nogueira et al. (2007a) observaram diminuição dos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, leucocitose com neutrofilia, diminuição do número de linfócitos e eosinófilos. Houve trombocitopenia, hipocelularidade em medula óssea e redução nos níveis de fibrinogênio seis horas após a inoculação do veneno. Incoagulabilidade sanguínea foi a alteração mais frequente, iniciada uma hora após a inoculação do veneno e retornando à normalidade 18 horas após a terapia com soro antiofídico. Embora incoagulabilidade e trombocitopenia tenham sido observadas, não houve sangramento importante.

A urinálise dos cães mostrou alteração de cor, proteinúria, sangue oculto e mioglobinúria seis horas após a administração do veneno, confirmando a atividade miotóxica (rabdomiólise) relacionada aos componentes crotóxina e crotamina. Os níveis de ureia e creatinina se mantiveram dentro da normalidade. Acidose respiratória na gasometria e dispneia foram observadas seis horas após a inoculação do veneno em todos os grupos experimentais (NOGUEIRA et al., 2007b).

Nos exames complementares, o perfil sanguíneo de animais intoxicados mostra aumento dos tempos de Coagulação (TC), Protrombina (PT) e Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa), diminuição significativa de fibrinogênio, leucocitose com neutrofilia e aumentos das enzimas CK, DHL e AST. Na urinálise, são frequentes mioglobinúria, proteinúria e cilindrúria em graus variados (SANTOS et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; REZENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico. Revista **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 251-255, aug.1991. DOI: 10.1590/S0036-46651991000400002.
- AQUINO, L.M.; SOUZA, L.R.O.; ABREU, R.G. Distribuição de soros antivenenos no Brasil. In: Seminário sobre vigilância de acidentes por animais peçonhentos. **Livro de resumos do Seminário sobre vigilância de acidentes por animais peçonhentos**. Niterói: Instituto Vital Brazil, 2017. Disponível em: <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/arquivos/seminarioanimaispeconhentosms.pdf>. Acesso em: 22 set. 2018.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina, Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 480-89, apr./dec. 2003. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v36i2/4p480-489.
- BARBOSA, J.D. et al. Quadro clínico-patológico do envenenamento crotálico experimental em bubalinos comparado com o de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.11, p.967-73, nov. 2011. DOI: 10.1590/S0100-736X2011001100005.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes dos gêneros “*Crotalus*” e “*Micrurus*” In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p.281-295.
- BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 85, n. 8, p. 55–63, 2011. Disponível em: <http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1141/1076>. Acesso em: 22 jun. 2018.
- BICUDO, P.L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p.375-387.
- BLANCO, B.S., MELO, M.M. Ofidismo. In: **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2014a. p. 9-14. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG; n.75)
- BLANCO, B.S., MELO, M.M. Acidente crotálico. In: **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2014b. p. 27-35. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG; n.75)
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos De Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.1, p. 7-16, 2003. DOI: 10.1590/S0102-311X2003000100002.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Poison and anti-venom of snakes of the *Crotalus*

durissus subspecies of Brazil: evaluation of the geographic variation and its implication in the management of the snake bite. **Journal of Proteomics**, v. 73, n.9, p.1758-76, Aug. 2010. DOI: 10.1016 / j.jprot.2010.06.001

BRASIL. Informações da Saúde TABNET. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso em: 26 abr. 2018.

BROWN, N.; LANDON, J. Antivenom: The most cost-effective treatment in the world? **Toxicon**, v. 55, n. 5, p. 1405-07, jun. 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.012.

CALVETE, J.J. et al. Toxin-resolved antivenomics-guided assessment of the immunorecognition landscape of antivenoms. **Toxicon**, v. 148, p. 107-122, april. 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.04.015.

CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. **O Mundo da Saúde São Paulo**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 644-53, out./dez. 2006.

CAVALCANTE, W.L.G. et al. Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom requires its acidic chaperone to concomitantly inhibit the release of acetylcholine and produce muscle blockade. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.334, n.1, p.8-17. nov. 2017. DOI: 10.1016/j.taap.2017.08.021.

CÉSPEDES, N. et al. Biochemical comparison of venoms from 330ung Colombian *Crotalus durissus cumanensis* and their parentes. **Journal of Venomous Animals and toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.16, n.2, p.268-84, may. 2010. DOI: 10.1590/S1678-91992010000200009

CHIPPAUX, J.P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.23, n.38, aug. 2017. DOI: 10.1186/s40409-017-0127-6

COSTA, C.R.C. et al. Edema induced by a *Crotalus durissus terrificus* venom serine protease (Cdtsp 2) involves the PAR pathway end PKC and PLC activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8. aug. 2018. DOI:10.3390/ijms19082405.

DAL PAI, V.; NETO, H.S. Ação dos venenos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais**. Uma visão integrada. São Paulo: Publicações Científicas, 1994. p.97-105.

DE OLIVEIRA, D.G. L. et al. Functional and structural analysis of two fibrinogen activating enzymes isolated from *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus* venoms. **Acta Biochimica and Biophysica Sinica**, Xangai, v.41, n.1, p.21-9, jan. 2009. DOI 10.1093/abbs/gmn003.

DE OLIVEIRA, L.A. et al. *Crotalus durissus terrificus* crotoxin naturally displays preferred positions for amino acid substitutions. **Journal of Venomous Animals and**

Toxins including Tropical Diseases, Botucatu, v.23, n.46, 2017. DOI: 10.1186/s40409-017-0136-5.

DUARTE, M.R.; MENEZES, F.A. Is the population of *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) expanding in Brazil? **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.19, n.30, dec. 2013. DOI: 10.1186/1678-9199-19-30.

FRANCISCHETTI, I.M.B. et al. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. **Toxicon**, v.35, n.8, p.1217-1228, aug.1997.

FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_peconhentos.pdf. Acesso em: 16 jul. 2018.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, v. 22, n.1, p.85-98, 1984.

GUIDOLIN, F.R et al. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**, v. 66, p. 7-17, may 2013. DOI:10.1016/j.toxicon.2013.01.015.

HABIB, A.; BROWN, N.I. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. **Toxicon**, v. 150, p. 115-23, Epub, may 2018. DOI: 10.1016/j.toxicon.2018.05.009.

HABIB, A.G. et al. Cost-effectiveness of Antivenoms for Snakebite Envenoming in Nigeria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Valencia, v. 9, n. 1, e3381, jan. 2015. DOI:10.1371/journal.pntd.0003381.

HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments-Part II. **Compendium on Continuous Education Practice Veterinary**, v.17, p.1035- 1040, 1995.

INGENLOFF, K.; PETERSON, A.T. Trans-Amazon dispersal potential for *Crotalus durissus* during Pleistocene climate events. **Biota Neotropica**, Campinas, v.15, n.2, e20130081, 2015. DOI: 10.1590/1676-06032015008113.

KASTURIRATNE, A. et al. The socio-economic burden of snakebite in Sri Lanka. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Valencia, v.11, n.7, eCollection, jul. 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005647.

KINI, R.M., EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, Oxford, v.27, p.613-635, 1989.

LAGO, L.A. et al. Quadro clínico do envenenamento crotálico experimental em bovinos (*Crotalus durissus terrificus* - crotamina positivo). **Brazilian Journal of**

Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v.37, n.4, p. 312-15, 2000. DOI: 10.1590/S1413-95962000000400010.

LIMA, S.C. et al. Pharmacological characterization of the effects of crostamine on hind limb paralysis of mice using *ex vivo* and *in vivo* assays: Findings on the involvement of voltage-dependent ion channels in the action of crostamine on the skeletal muscles. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Valencia, v.12, n.8, eCollection, aug. 2018. DOI 10.1371 / journal.pntd.0006700.

LONGBOTTOM, J. et al. Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. **The Lancet**, v. 392, n. 10148, aug. 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31224-8.

LOPES, C.T.A. et al. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crostálico experimental em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n.9, p. 843-49, set. 2012. DOI 10.1590/S0100-736X2012000900005.
MANCIN, A.C et al. The analgesic activity of crostamine a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v.36, n.12, p.1927-1937, 1998.

MEDIAVILLA, D. O mundo se une contra as picadas de cobra, outra grande doença mortal. **El País Brasil**, 29 mai 2018. Disponível em: https://brasil.elpais.com/brasil/2018/05/24/politica/1527179251_016445.html. Acesso em: 01 out. 2018.

NOGUEIRA, R.M.B. et al. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum – part I: Clinical evaluation, hematology and myelogram. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.13, n.4, p. 800-10, nov. 2007a. DOI: 0.1590/S1678-91992007000400010.

NOGUEIRA, R.M.B. et al. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum – part II: Laboratory aspects, electrocardiogram and histopathology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.13, n.4, p. 811-20, nov. 2007b. DOI: 10.1590/S1678-91992007000400011.

Organização Mundial da Saúde. Snakebite envenoming. Disponível em: <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>. Acesso em: 25 jul. 2018.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo v.47, n.1, p. 2-13, mar. 2001. DOI: 10.1590/S0104-42302001000100026.

PUIG, J. et al. Acute intrinsic renal failure and blood coagulation disorders after a snakebite in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.36, p. 333-336, jul. 1995.

RIBEIRO, G.B. et al. Study of crostoxin on the induction of paralysis in extraocular muscle in animal model. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v.75, n.5, p.307-312, oct. 2012. DOI: 10.1590/S0004-27492012000500002.

RORIZ, K.R.P.S. et al. Epidemiological study of snakebite cases in Brazilian Western Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 51, n. 3, p. 338-46, may-jun. 2018. DOI: 10.1590/0037-8682-0489-2017.

SAKATE, M. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. São Paulo: Roca, 2002.p.523-555.

SAMPAIO, S.C. et al. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v.55, n.6, p.1045-60, jun. 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.01.011.

SANGIORGIO, F. et al. Histopathological evaluation in experimental envenomation of dogs with *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Venomous Animals and toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.14, n.1, p. 82-99, 2008. DOI: 10.1590/S1678-91992008000100007.

SANTOS, W.G. et al. Envenenamento crotálico em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.13, supl., p. 5-6, 2013.

SERVA, L. No Brasil, áreas com mais picadas de cobra têm acesso difícil a soro. **Folha de São Paulo**. São Paulo. 02 jul. 2018. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2018/07/no-brasil-areas-com-mais-picadas-de-cobra-tem-acesso-dificil-a-soro.shtml>. Acesso em: 01 out. 2018.

SILVA, T.F. et al. Avaliação histológica dos efeitos da crotoxina de – *Crotalus durissus terrificus* na pele do dorso de ratos Wistar. **Scientia Plena**, Sergipe, v.8, n.2, 2012.

SILVA, V.A.R. et al. Determinação da estrutura da gioxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por modelagem molecular. **Journal of the Health Sciences Institute**, São Paulo, v. 34, n.3, p. 168-72, jul./set. 2016.

TOKARNIA, C.H et al. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops spp.* em animais de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.34, n.4, p.301-12, abr. 2014. DOI 10.1590/S0100-736X2014000400001.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p. 55-68, abr./jun. 2006. DOI 10.1590/S0100-736X2006000200001.

TOYAMA, M.H. et al. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.6, n.1474, p.56-60, mar. 2000. DOI: 10.1016/S0304-4165(99)00211-1.

WHO World Health Organization. Global snakebite burden. **Seventy-First World Health Assembly**. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA71/A71_17-en.pdf>. Acesso em: 01 out.

2018.

WILLIAMS, D.J. ***Crotalus durissus*, South America**. Disponível em:
<http://www.who.int/snakebites/resources/photo_gallery_snakes/en/#&gid=1&pid=12
>. Last update: 29 August 2017. Acesso em: 29/08/2018.

3 ARTIGO¹

Clinical and laboratorial comparison of the effects of the serpent cross venom *Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus* in Wistar rats

Comparação clínica e laboratorial dos efeitos do veneno bruto das serpentes *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar

Adriana Falco de Brito^{1*}, Paulo Felipe Izique Goiozo¹, Elaine Carrion de Fares², André Carrion de Fares Pinto³, Cecília Braga Laposy⁴, Ana Maria Siqueira Silveira Wehbe⁵, Gabrielle Gomes dos Santos Ribeiro⁶, Rosa Maria Barilli Nogueira⁴

Abstract

The objective was to compare the effects of experimental intoxication on Wistar rats with crude venom of *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc) and *Crotalus durissus terrificus* (Cdt). Sixty Wistar rats were divided into three groups (n = 20) and treated with: group 1 (G1): control, intramuscular saline solution (IM); group 2 (G2): 1 mg Kg-1 of Cdc IM venom; group 3 (G3): 1 mg Kg-1 of Cdt IM venom. Locomotion and posture, inoculated limb and motor activity were evaluated at moments: M0 (before inoculation), M1 (60 min after) and M2 (120 min after). Blood count, serum biochemistry (alanine aminotransferase - ALT, aspartate aminotransferase - AST, alkaline phosphatase - ALP, urea, creatinine and creatine kinase - CK and CK - MB) and histopathology occurred six hours later. Locomotion decreased in G2 and G3 animals with higher intensity in G3; Member edema occurred in 70% of G3 animals and 20% of G2 animals; increased erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, platelets and CHCM in G2 and G3, mainly erythrocytes in G2. Increased CV RDW in G3, reduction of total plasma protein and VCM compared to G1; increased leucocytes, segmented and monocytes in G2 and G3 with difference between them; reduction of lymphocytes in G2 and G3, with difference between them; increased AST, ALT, CK, urea and creatinine in G2 and G3, mainly in G2; decrease in ALP and CK-MB in G2. The findings agree with those of other authors, however, no other study compares the effects of the two crotalic poisons. Both venoms caused clinical, laboratory and histological changes in the first hour, with accentuation over time. Clinical and muscular histological changes were more evident in animals poisoned with venom from *Cdt*. On the other hand, *Cdc* venom caused more laboratory alterations, both in the blood count and in the serum biochemistry. It is concluded that the two poisons provoke clinical, laboratory and histological changes in the first hour after inoculation of the venom, with gradual worsening over time, and clinical and histological changes are more evident

¹ Artigo formatado nas normas da revista Semina: Ciências Agrárias. disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/about/submissions>. As figuras e tabelas estão mantidas no corpo do texto para facilitar leitura.

in the animals poisoned with *Cdt* venom and laboratorial of the venom. The hemogram and serum biochemistry was more evident for the *Cdc* venom. It is suggested that other studies be carried out with the different fractions of each venom and the crude venom on the different muscle types.

Key words: Blood count. Serum biochemistry. Histology. *Crotalus durissus*. Wistar rats. Reptiles.

¹ Discente, curso de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, e-mail: adrianabrito@unoeste.br; pauloizique@unoeste.br

² Discente, curso de Graduação em Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, e-mail: elainecarr@ig.com.br

³ Discente, curso de Graduação em Medicina, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, e-mail: andrecf192734@gmail.com

⁴ Docente, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, e-mail: rosa@unoeste.br; claposv@unoeste.br

⁵ Farmacêutica e Bioquímica do Laboratório Clínico da Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, e-mail: anasilveira@unoeste.br

⁶ Estatista da Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil, e-mail: gabrielle@unoeste.br

* Autor para correspondência

Resumo

O objetivo desse estudo foi comparar os efeitos da intoxicação experimental em ratos Wistar com veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* (*Cdc*) e *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*). Sessenta ratos Wistar foram distribuídos em três grupos (n=20) e tratados com: grupo 1 (G1): controle, solução salina a 0,9% intramuscular (IM); grupo 2 (G2): 1mg Kg⁻¹ de veneno de *Cdc* IM; grupo 3(G3): 1mg Kg⁻¹ de veneno de *Cdt* IM. Foram avaliados locomoção e postura, membro inoculado e atividade motora nos momentos: M0 (antes da inoculação), M1 (60 min. após) e M2 (120 min. após). Avaliação de hemograma, bioquímica sérica (alaninoaminotransferase - ALT, aspartatoaminotransferase - AST, fosfatase alcalina -ALP, ureia, creatinina, creatina quinase - CK e CK-MB) e histopatologia ocorreu seis horas após. A locomoção diminuiu nos animais do G2 e G3, com maior intensidade no G3; edema do membro ocorreu em 70% dos animais do G3 e 20% do G2; aumento de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e CHCM em G2 e G3, principalmente eritrócitos no G2. Aumento do RDW CV no G3, redução de proteína plasmática total e VCM em comparação ao G1; aumento de leucócitos, segmentados e monócitos no G2 e G3 com diferença entre eles; diminuição de linfócitos no G2 e G3, com diferença entre eles; aumento de AST, ALT, CK, ureia e creatinina no G2 e G3, principalmente no G2; diminuição de ALP e CK-MB no G2. Os achados concordam com os de outros autores, porém nenhum outro estudo compara os efeitos dos dois venenos crotálicos. Ambos os venenos provocaram alterações clínicas, laboratoriais e histológicas na primeira hora, com acentuação ao longo do tempo. As alterações clínica e histológica muscular foram mais evidentes nos animais intoxicados com veneno da *Cdt*. Já o veneno da *Cdc* provocou maiores alterações laboratoriais, tanto no hemograma

como na bioquímica sérica. Conclui-se que os dois venenos provocam alterações clínicas, laboratorial e histológica muscular na primeira hora após inoculação do veneno, com piora gradativa ao longo do tempo, sendo as alterações clínicas e histológicas mais evidentes nos animais intoxicados com veneno da *Cdt* e as laboratoriais do hemograma e bioquímica sérica mais evidentes para o veneno da *Cdc*. Sugere-se que outros estudos sejam realizados com as diferentes frações de cada veneno e do veneno bruto sobre os diferentes tipos musculares.

Palavras-chave: Hemograma. Bioquímica sérica. Histologia. *Crotalus durissus*. Ratos Wistar. Répteis.

Introdução

Os acidentes ofídicos são um grave problema de Saúde Pública e foram reinseridos na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017 (CHIPPAUX, 2017; MEDIAVILLA, 2018). São relatadas anualmente entre 81.000 e 138.000 mortes, além de cerca de 400.000 amputações e outras incapacidades permanentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). O tratamento específico padrão é com uso de soro antiofídico cujo processo de produção é caro e sofre com problemas de regionalização das espécies das serpentes, distribuição e manutenção de rede de frio quando o produto não é liofilizado, prazos de validade curtos do produto e acessibilidade quando necessário (CHIPPAUX, 2017).

Em estudo realizado no Estado de Roraima, o número médio de ampolas de soro antiofídico utilizado para tratamento de acidentes em humanos variou de 6,5 a 11,5, com falhas no conhecimento clínico e epidemiológico para a real classificação do quadro e consequente administração inadequada de doses. Os mesmos autores citam que a produção do soro utilizado na região é realizada em outros estados com espécies que não representam a fauna da região (RORIZ et al., 2018).

Os acidentes são responsáveis por mortes e mutilações em muitas regiões do mundo, com alto impacto em DALYs (Disability-Adjusted-Life-Years) e na economia de comunidades rurais. A realidade é que hospitais em áreas onde acidentes ofídicos são comuns nem sempre conseguem manter estoque necessário de soro antiofídico, mesmo que os pacientes tenham condições de pagar pelo tratamento. Isso aumenta o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento, pois as vítimas necessitam de transporte para hospitais mais distantes (HABIB; BROWN, 2018).

O Brasil relata a maioria dos acidentes ofídicos da América Latina, com cerca de 26 mil a 29 mil casos por ano (RORIZ et al. 2018). Revisão dos relatos de acidentes ofídicos no Brasil mostrou que as variáveis presentes em mais de 50% dos acidentes já haviam sido descritas por Vital Brazil em 1901. O perfil dos acidentes se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos. Ocorrem com maior frequência no início e no final do ano, em pessoas do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva de 15 a 49 anos; atingem sobretudo os membros inferiores e, em média, há um intervalo de 6 horas entre o acidente e o atendimento. A maioria desses acidentes é atribuída ao gênero

Bothrops (BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Apesar de responderem por 18,9% do total, os acidentes crotálicos apresentam letalidade média de 8,1% (BRASIL, 2018).

Não há obrigatoriedade da notificação dos acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. Estudo retrospectivo no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu, apontou 149 acidentes ofídicos, sendo 128 causados por *Bothrops*, 11 por *Crotalus* e 10 sem identificação (BICUDO, 1994). Santos et al. (2013) citam o atendimento de 10 cães envenenados por serpentes no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no ano de 2012 até maio de 2013, sendo nove acidentes crotálicos e um botrópico. Os diagnósticos caninos foram realizados com base na identificação da serpente, nas manifestações clínicas e achados laboratoriais.

Em levantamento sobre a importância dos acidentes ofídicos em bovinos no Brasil, os autores concluíram que os diagnósticos eram realizados à distância, sem avaliação clínica ou laboratorial e sem realização de necropsia ou exame (TOKARNIA; PEIXOTO, 2006).

Os principais componentes da peçonha das serpentes do gênero *Crotalus* na América do Sul são: uma neurotoxina fosfolipase A2 denominada crotoxina, a giroxina que é uma serinoprotease trombina like, um agregador de proteínas denominado convulxina e um polipeptídeo miotóxico conhecido como crotamina (LIMA et al., 2018). Estudos sobre a composição química e os efeitos da peçonha de diferentes espécies de *Crotalus* encontraram diferenças significativas nos perfis proteicos e propriedades tóxicas, o que pode causar dificuldade de diagnóstico e falhas no tratamento com soro antiofídico (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; CÉSPEDES et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2018).

A variedade de frações e interações entre esses componentes produz efeitos que podem ser divididos em: ação neurotóxica - causada principalmente pela crotoxina, que age no sistema nervoso periférico com bloqueio da transmissão nervosa em junção neuromuscular, induzindo paralisia semelhante ao curare; ação miotóxica – atribuída à crotoxina e à crotamina, com lesão muscular sistêmica, necrose hialina das fibras musculares esqueléticas (rabdomiólise) e mioglobínúria; ação coagulante – resultado da atividade do tipo trombina que converte o fibrinogênio diretamente em fibrina, ou seja, o quadro de incoagulabilidade sanguínea é decorrente do consumo do fibrinogênio; ação nefrotóxica – relacionada a necrose tubular aguda secundária a rabdomiólise (TOYAMA et al, 2000; SAMPAIO et al. 2010; RIBEIRO et al., 2012; BLANCO; MELO 2014; SILVA et al., 2016; CAVALCANTE et al, 2017; LIMA et al., 2018).

Considerando a complexidade dos acidentes ofídicos, seu alto custo e riscos durante o tratamento, os achados clínicos e laboratoriais são preciosos para facilitar o diagnóstico correto, além de fundamental para que o profissional de saúde possa atuar de forma eficaz, avaliando a gravidade do quadro e orientando o tratamento correto do paciente.

O objetivo geral deste trabalho foi analisar e comparar os efeitos clínico e laboratorial do envenenamento experimental em ratos Wistar com a peçonha bruta de *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus*, serpentes de maior ocorrência no Estado de São Paulo.

Os objetivos específicos foram avaliar a mobilidade e propriocepção antes e após a inoculação; avaliar as alterações no membro inoculado e atividade motora nos momentos 60 e 120 minutos pós inoculação; avaliar as alterações no hemograma e na bioquímica sérica (alanino aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina – ALP, ureia, creatinina, creatino quinase - CK e fração MB da creatino quinase – CK-MB); avaliar as alterações histopatológicas no músculo do membro inoculado.

Material e Métodos

O protocolo utilizado neste estudo foi revisado e cumpriu os princípios éticos preconizados pela Resolução Normativa 33 do CONCEA (BRASIL, 2016) e as diretrizes ARRIVE (KILKENNY et al., 2010).

Veneno Bruto

Amostras liofilizadas do "Pool" de venenos de *Crotalus durissus collilineatus* e *Crotalus durissus terrificus* foram fornecidas pelo Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC de Goiás e mantidas congeladas a -20°C até o momento de uso.

Grupos Experimentais e intoxicação experimental

Foram utilizados 60 ratos Wistar adultos, machos, peso médio de $325\text{g} \pm 25\text{g}$, que permaneceram alojados de acordo com a Resolução Normativa 15 do CONCEA (BRASIL, 2013) em ambiente controlado com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de $50\% \pm 5\%$, fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro e receberam água e ração comercial *ad libidum*. Os animais foram avaliados com início às 07h00 durante um período de seis horas, considerado como *end point* humanitário.

Os animais foram subdivididos aleatoriamente por randomização simples de números elaborados no Excel® em três grupos ($n=20$ cada grupo), sendo:

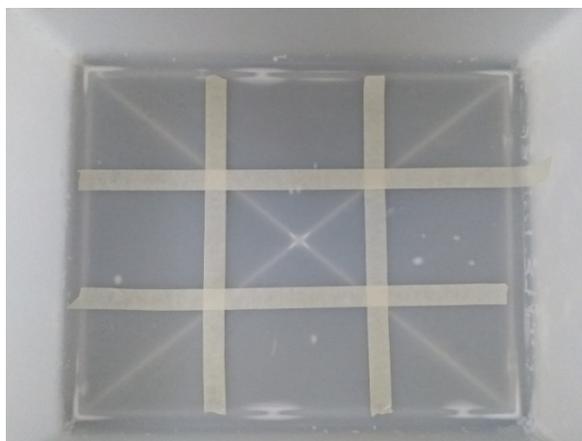
- **Grupo 1 (G1):** controle negativo inoculado com solução salina a 0,9% intramuscular (0,1 mL);
- **Grupo 2 (G2):** inoculado com veneno de *Crotalus durissus collilineatus* na dose de 1mg Kg^{-1} (PEREIRA; NOGUEIRA., 2012) intramuscular (0,1 mL);
- **Grupo 3 (G3):** inoculado com veneno de *Crotalus durissus terrificus* na concentração de 1mg Kg^{-1} intramuscular (0,1 mL).

Exame clínico

Foram avaliados a locomoção do animal, membro inoculado e atividade motora antes da inoculação do veneno (M0), 60 minutos após a inoculação (M1) e 120 minutos após a inoculação (M2). Para a avaliação da locomoção e atividade motora, os animais foram observados individualmente durante a exposição ao teste de campo aberto (Open Field) (Figura 1) para contagem dos quadrantes durante a movimentação espontânea do animal em um minuto e observação de

deambulação, postura e alterações de propriocepção (Arruda et al, 2011). Em seguida, o animal foi contido manualmente e observou-se a presença ou ausência de edema no membro inoculado.

Figura1- Instrumento de avaliação campo aberto (Open Field) utilizado para avaliação da mobilidade do animal.



Fonte: Próprio autor

Exames laboratoriais

Seis horas após a inoculação do veneno, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano para indução de inconsciência verificada pela ausência de reflexos da cauda, interdigitais e de córnea e em seguida foram mortos por exsanguinação, conforme recomenda a RN37 do CONCEA (BRASIL, 2018a).

O processo de exsanguinação foi realizado mediante colheita de 15mL de sangue por punção cardíaca utilizando frasco com vácuo (BD Vacutainer®) específico para cada exame proposto na metodologia (hemograma e bioquímica sérica). O material coletado foi encaminhado ao laboratório de Patologia Clínica para processamento conforme a rotina do laboratório. O óbito foi verificado pela ausência de batimentos cardíacos.

O hemograma foi realizado em contador automático (Poch-Diff, São Paulo, SP). A contagem diferencial de leucócitos foi feita pela técnica do esfregaço sanguíneo. As análises bioquímicas (alanino aminotransferase-ALT, aspartato aminotransferase-AST, fosfatase alcalina-ALP, ureia, creatinina e creatina quinase-CK e CK-MB) foram realizadas por equipamento automatizado (Cobas C111-Roche – São Paulo, SP).

Exame histopatológico

Para a análise histopatológica, após exsanguinação, foram retiradas amostras de tecido muscular do membro inoculado, acondicionadas em formol tamponado a 10% e enviadas ao laboratório de Patologia, onde foram emblocadas em parafina, cortadas em micrótomo com 4µm de espessura, distendidas em lâminas de vidro com extremidade fosca e, posteriormente, coradas com hematoxilina e eosina (HE).

O escore de cada lesão foi obtido multiplicando-se o fator gravidade pela extensão da lesão. O escore de órgão foi então obtido pela soma de cada escore de lesão. Fator de gravidade (grau de gravidade): 1-lesão leve, 2-lesão moderada e 3-grave. A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) avaliada e pontuada como 0-nenhuma lesão, 1-baixa extensão (25% do tecido afetado), 2-extensão intermediária (50% do tecido afetado) e 3- grande extensão (75% ou mais do tecido afetado). No tecido muscular foram avaliados (alteração/fator de gravidade): congestão/2; infiltrado inflamatório/2; edema intersticial/2; hemorragia/2; degeneração/2; hipertrofia dos miócitos/2; necrose/3, obtendo-se o escore lesional máximo de 45 pontos (MANN et al., 2012; GIBSON-CORLEY et al., 2013).

Análise Estatística

O número de animais por grupo baseou-se nos valores séricos de creatino quinase (CK) ($477,42 \pm 195,59$ UI L⁻¹) descritos por Motta (2008), tendo em vista que dentre todas as análises dos efeitos da peçonha, esta enzima foi a que apresentou o maior coeficiente de variação (CV=Desvio Padrão/Média), 40,97%. Procedeu-se o cálculo de amostras (animais) necessárias por grupo a partir da fórmula abaixo (Sampaio, 2002), optando-se pelo CV de 18%

$$\bar{X} \pm t \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Em que,

\bar{X} = intervalo obtido a partir do CV de 18% $\rightarrow 0,18 \times 477,42 = 85,93$

t = valor médio tabelado

S = desvio padrão referência (195,59)

$n \rightarrow 85,93 = 2 \times \frac{195,59}{\sqrt{n}} \therefore n = 20,7 \sim 20 - 21$ animais

A normalidade dos dados foi verificada pelo Teste de normalidade das variáveis contínuas de Anderson Darling e a homogeneidade das variâncias foi determinada pelo teste de Bertlett com p-valor maior que 0,05. Os dados que atenderam a estes dois pressupostos (contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, RDW-CV%, ureia e ALP) foram submetidos ao Teste Tukey para comparação dos grupos. Os dados que não atenderam aos pressupostos citados ou que são variáveis discretas (Plaquetas, CHCM, PPT, AST, ALT, CK, creatinina e CK-MB) foram submetidos ao teste não-paramétrico Kruskall Wallis. Em todos os testes aplicados foi adotado um nível de significância de 5%. O cálculo do tamanho do efeito para as variáveis consideradas mais relevantes (segmentados, CK e ALT) foi realizado pelo teste de Cohen.

Resultados e Discussão

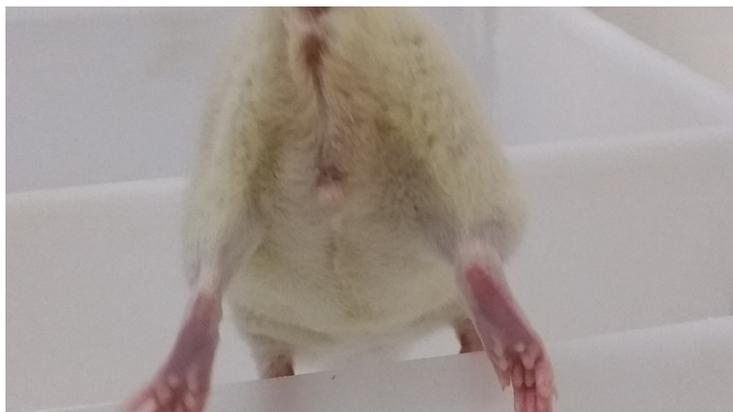
Os achados clínicos de maior importância podem ser visualizados na Tabela 1. Não encontramos nenhum estudo que comparasse os efeitos do veneno bruto da *Cdc* e *Cdt*, mostrando a diferença clínica entre eles.

Tabela 1 – Sinais clínicos observados em porcentagem dos animais do G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20) nos diferentes momentos de avaliação (M1-60 minutos após inoculação; M2-120 minutos após inoculação).

Sinais clínicos	Animais por Grupo (%)					
	G1		G2		G3	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2
Claudicação	0	0	20	20	10	10
Edema membro	0	0	0	15	70	70
Sedação	0	0	5	10	0	0
Tremor	0	0	5	5	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	5	0	0
Taquipneia	0	0	0	0	10	10
Paresia membro	0	0	0	0	10	10

Alterações na locomoção e local da inoculação do veneno encontradas neste estudo, corroboram com diferentes autores que relatam em diferentes espécies sinais de claudicação, edema no local da inoculação do veneno (Figura 2) e paresia do membro, tremor, ptose palpebral, dispneia ou taquipneia (AMARAL et al., 1991; LAGO et al., 2001; COLLICCHIO et al., 2002; NOGUEIRA; SAKATE, 2006; NOGUEIRA et al., 2007a; FLORIANO et al., 2009; LOPES et al., 2012; BUCARETCHI et al., 2014; TOKARNIA et al., 2014). Lima et al (2018), estudaram a fração crotamina isolada a partir de *Cdt* e relatam paralisia de membros dose dependente secundária à inoculação o que está de acordo com nosso estudo, em que a paresia de membro inoculado ocorreu mais frequentemente no G3.

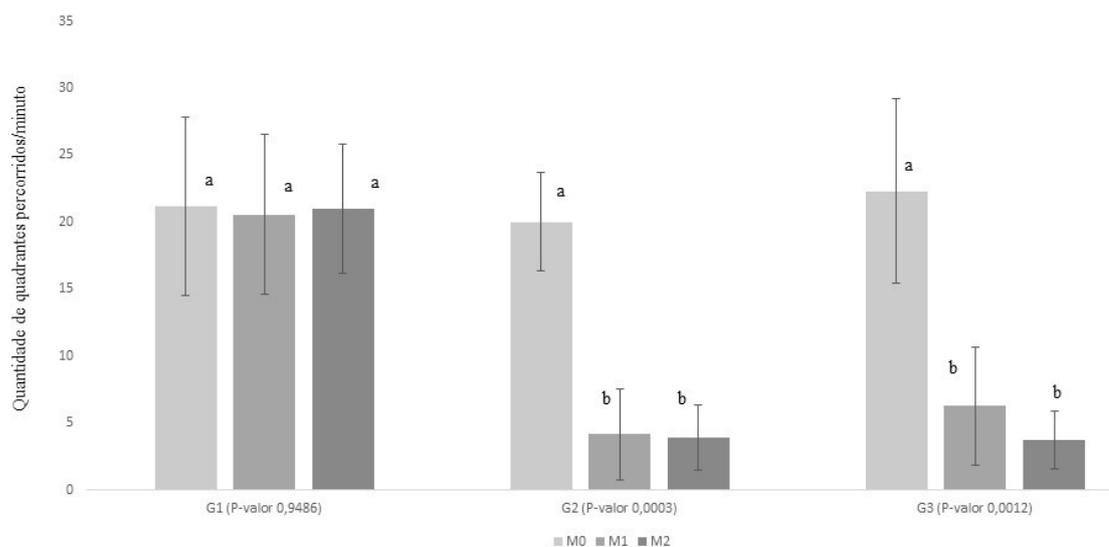
Figura 2 - Edema em membro posterior direito inoculado com veneno de *Crotalus durissus collilineatus* após 60 minutos.



Fonte: Próprio autor

A diminuição da atividade motora (Figura 3) pôde ser observada nos animais do G2 e G3 60 minutos após inoculação do veneno acentuando-se duas horas após, diferindo do G1, mas não entre eles. Os efeitos observados são secundários à ação neurotóxica (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; TOKARNIA et al., 2014) e miotóxica do veneno crotálico.

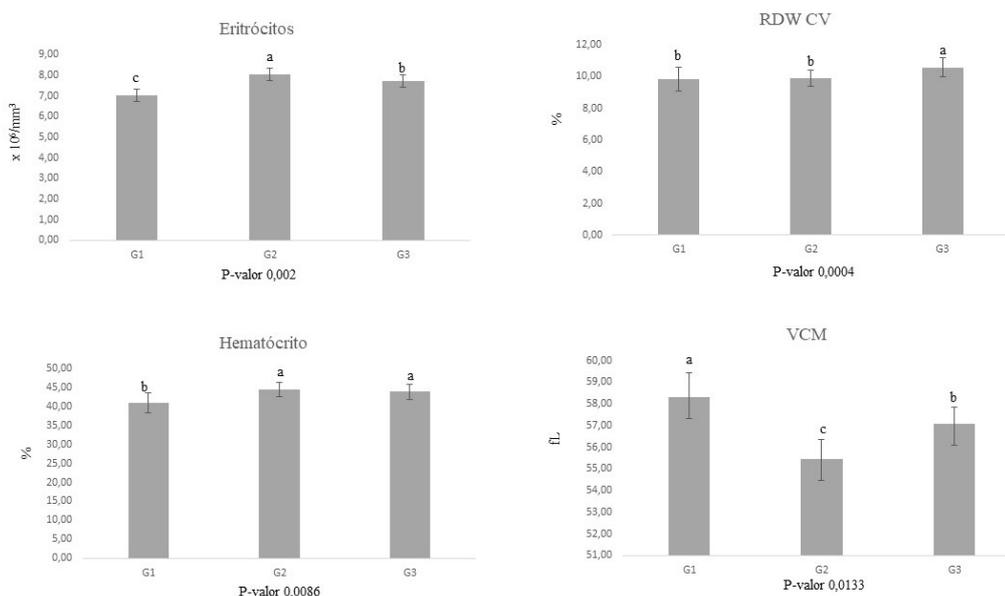
Figura 3 - Médias e desvio padrão de atividade motora, determinada pela quantidade de quadrantes percorridos em um minuto pelos animais do G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20) nos diferentes momentos de avaliação (M0-antes da inoculação do veneno; M1-60 minutos após inoculação; M2-120 minutos após inoculação).



Letras minúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo

No eritrograma (Figuras 4 e 5) houve aumento significativo na contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e CHCM nos animais do G2 e G3 em relação ao controle e redução do VCM, e PPT para os mesmos grupos. Não houve alteração significativa nos valores de fibrinogênio sérico. O G2 e G3 diferiram entre si apenas na contagem de eritrócitos e no VCM. Quanto ao RDW CV, houve aumento significativo apenas no G3.

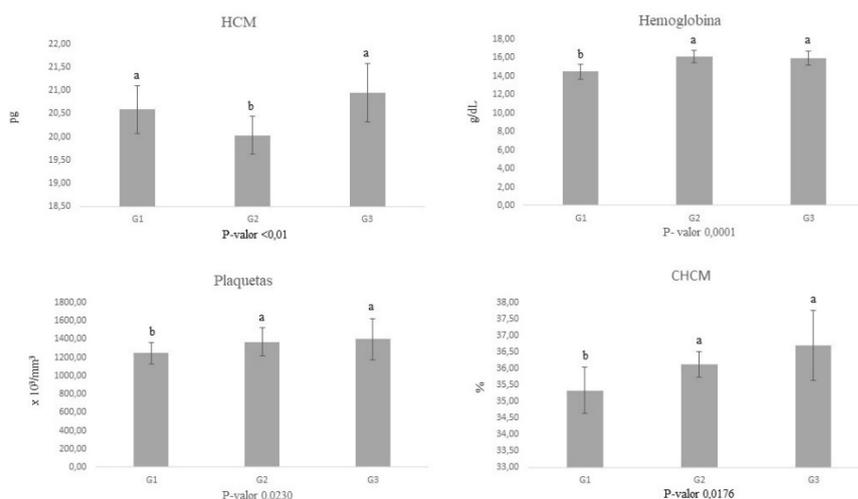
Figura 4 – Média e desvio padrão dos valores de eritrócitos, RDW CV*, Hematócrito e VCM** nos diferentes grupos G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20), seis horas após inoculação do veneno.



Letras minúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo

*RDW CV - Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos medido como Coeficiente de Variação;
 **VCM -volume corpuscular médio.

Figura 5 – Média e desvio padrão dos valores de HCM*, hemoglobina, plaquetas e CHCM** nos diferentes grupos G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20), seis horas após inoculação do veneno.



Letras minúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo

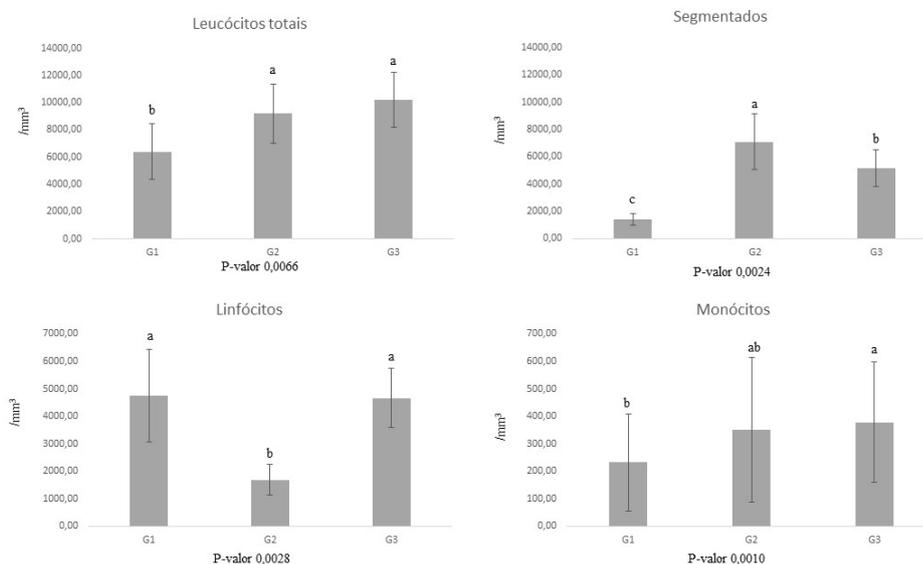
*HCM – hemoglobina corpuscular média; ** CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

Os achados do eritrograma diferem de outros estudos realizados com veneno de *Cdt* com cães (NOGUEIRA et al., 2007b) e ratos (MOTTA, 2008; FLORIANO et al., 2009) os quais relatam, duas horas após inoculação do veneno de *Cdt*, diminuição de hemácias, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas, no entanto, concordam com achados de Lago et al., (2001) e Graça et al., (2008) em estudo com bovinos. Não encontramos estudos que se referissem a alterações no RDW - CV.

A discreta hemoconcentração pode ser explicada pela privação de água e ação de prostaglandinas que aumentam no soro e, conseqüentemente, a permeabilidade capilar frente a presença de fosfolipases (LAGO et al. 2001).

Para o leucograma (Figura 6) houve aumento significativo de leucócitos totais, segmentados e monócitos no G2 e G3 diferindo do G1, além do G2 ter maior elevação e diferir do G3. Os linfócitos diminuíram no G2 e G3 frente ao G1, sendo no G2 significativo comparado ao G3.

Figura 6 - Média e desvio padrão dos valores em que houve diferenças significativas do leucograma nos diferentes grupos G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20), seis horas após inoculação do veneno.



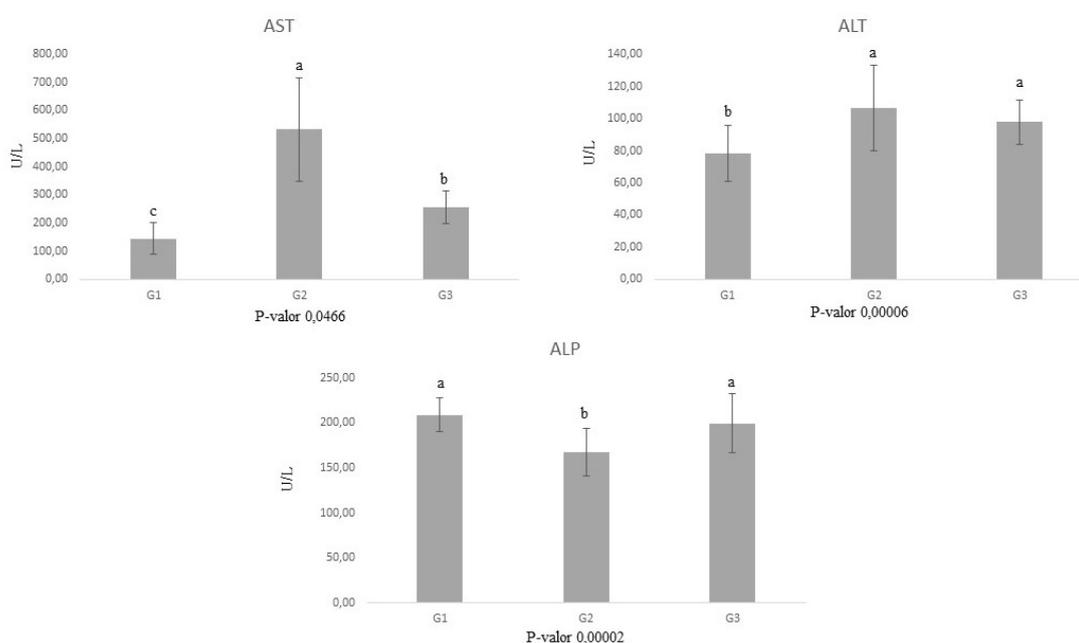
Letras minúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo

Leucocitose, neutrofilia, linfopenia e monocitose são achados laboratoriais relatados por muitos autores em diferentes espécies animais como bovinos (LAGO et al., 2001; GRAÇA et al., 2008), cão (COLLICHIO et al., 2002; NOGUEIRA; SAKATE, 2006; NOGUEIRA et al., 2007b), rato (MOTTA,

2008; FLORIANO et al., 2009) e equinos (LOPES et al., 2012) e são secundários à resposta de fase aguda e liberação de catecolaminas e mediadores celulares.

Na bioquímica sérica houve elevação nos valores de AST, ALT, CK, ureia e creatinina no G2 e G3, com maior elevação no G2 (Figura 7 e 8). Os valores de ALP e CK-MB diminuíram principalmente no G2. Os grupos diferiram quanto à dosagem de AST, com aumento expressivo no G2. A dosagem de ALT teve aumento quando comparada à do grupo controle com uma grande diferença desse feito, mas não houve diferenças entre os G2 e G3 apesar do efeito da diferença das médias ter sido considerado médio (Tabela 2).

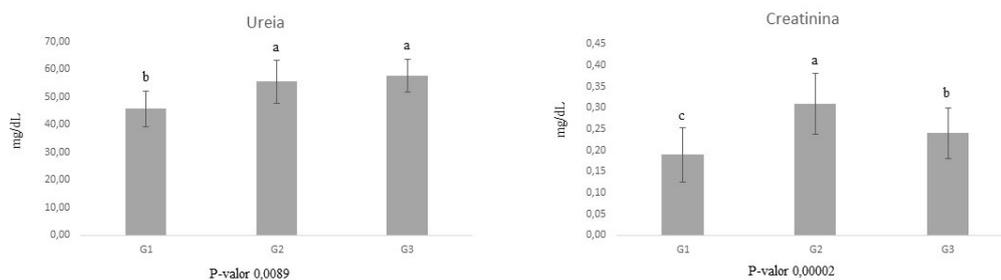
Figura 7 - Média e desvio padrão dos valores de AST*, ALT** e ALP*** séricas nos diferentes grupos G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20), seis horas após inoculação do veneno.



Letras minúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo.

*AST-aspartatoaminotransferase; **ALT-alaninoaminostransferase; *** ALP-fosfatase alcalina.

Figura 8 – Média e desvio padrão dos valores de ureia e creatinina séricas nos diferentes grupos G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20), seis horas após inoculação do veneno.

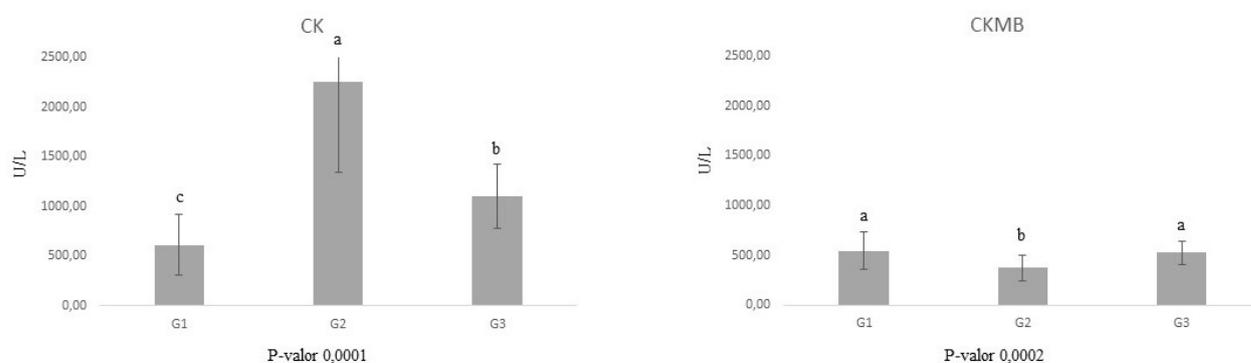


Letras minúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo.

As alterações encontradas na bioquímica sérica se explicam pela ação miotóxica e nefrotóxica dos venenos, concordando com outros autores (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2007a; LOPES et al., 2012).

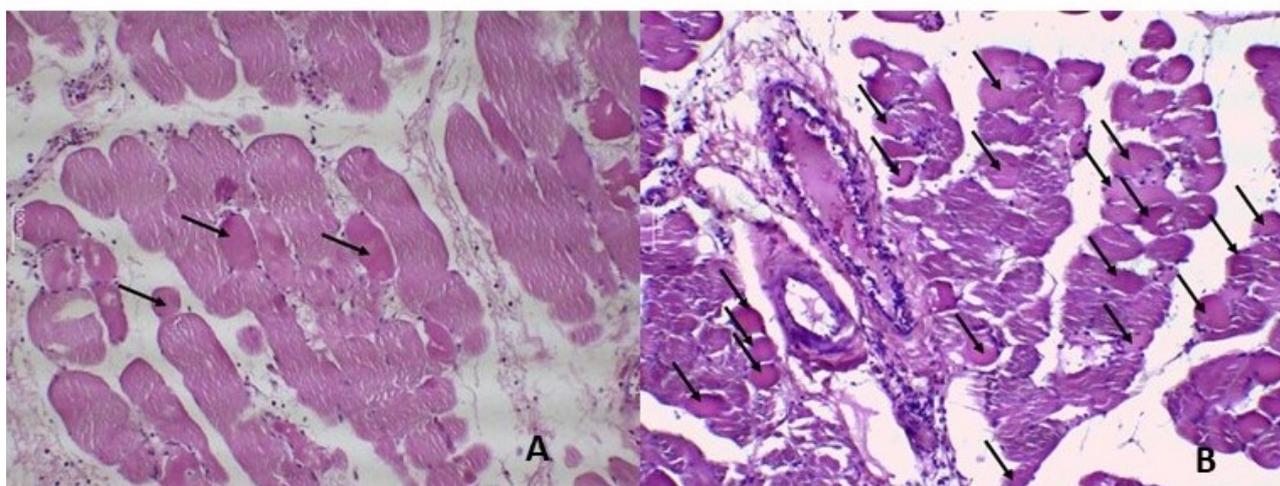
Na histopatologia do G1, observou-se apenas congestão vascular discreta (escore lesional médio = 0,7). No G2 foram observados, além de congestão, discreto infiltrado inflamatório e em maior intensidade, degeneração e necrose dos miócitos (escore lesional = 12). Para o G3, constatou-se o maior escore lesional (14,88) com as mesmas lesões observadas no G1, porém, com degeneração e necrose com maior intensidade (Figuras 9, 10 e 11).

Figura 9 – Média e desvio padrão dos valores de CK* e CK MB séricas nos diferentes grupos G1 (controle n=20), G2 (*Crotalus durissus collilineatus* n=20), G3 (*Crotalus durissus terrificus* n=20), seis horas após inoculação do veneno.



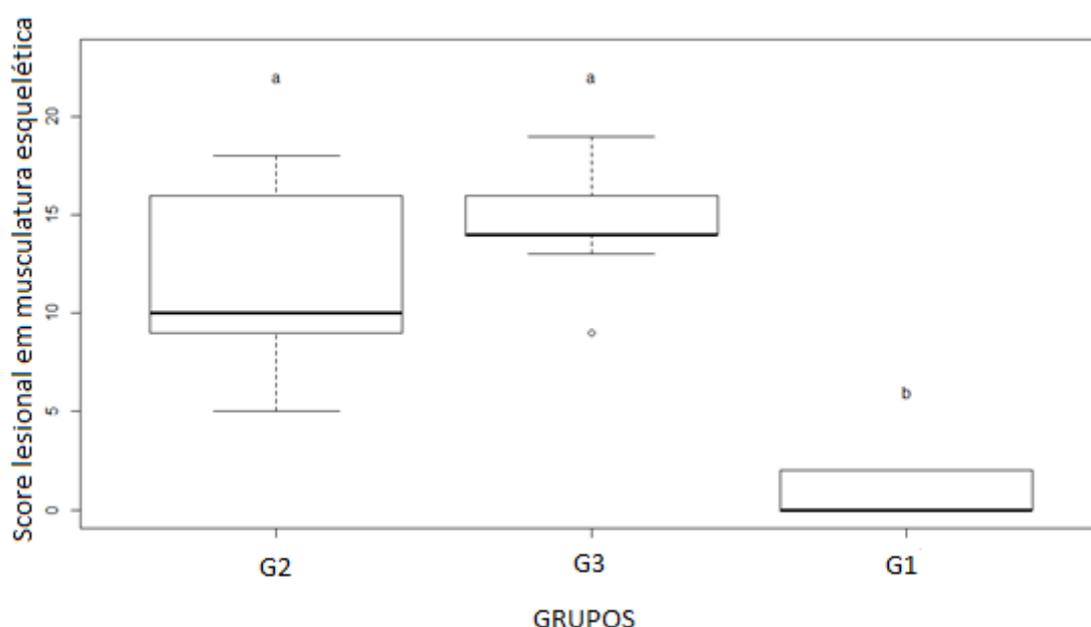
Letras minúsculas comparam momentos dentro do mesmo grupo. *CK – creatina quinase.

Figura 10 – A: Fotomicrografia de tecido muscular – G2: Infiltrado inflamatório com predomínio mononuclear no interstício e fibras apresentando coagulação no sarcoplasma (seta) evidenciando necrose de zenker multifocal com intensidade moderada. HE Barra 100 μ m. B: Fotomicrografia de tecido muscular – G3: Infiltrado inflamatório com predomínio mononuclear no interstício e fibras apresentando coagulação no sarcoplasma (seta) evidenciando necrose de zenker multifocal com intensidade severa. HE Barra 100 μ m.



Fonte: Paulo Felipe Izique Goiozo

Figura 11 – Escore lesional e achados histopatológico na musculatura esquelética (local da inoculação do veneno) seis horas após inoculação do veneno nos animais do G1 (grupo controle) com escore lesional médio = 0,7 (congestão vascular discreta); G2 (grupo *Crotalus durissus collilineatus*) com escore lesional = 12 (congestão, discreto infiltrado inflamatório, degeneração e necrose dos miócitos; G3 (grupo *Crotalus durissus terrificus*) com escore lesional 14,88 (congestão, discreto infiltrado inflamatório, degeneração e necrose dos miócitos de maior intensidade).



Letras minúsculas comparam grupos dentro do mesmo momento

A miotoxicidade no local da inoculação do veneno da *Cdt* mostrou ser maior, em comparação ao veneno da *Cdc* na histopatologia, no entanto, de acordo com os achados de CK, AST e ALT na bioquímica sérica, pode-se afirmar que a miotoxicidade sistêmica foi maior nos animais intoxicados com *Cdc*. Para a variável CK e ALT a diferença de suas médias foi grande entre os grupos tratados e controle e entre os tratados para CK; para ALT entre os tratados foi considerado médio (Tabela 2). A fração CK-MB representa em torno de 5 a 6% da CK total e a isoenzima MB está presente principalmente no músculo cardíaco. A diferença de alterações sistêmicas em fibras musculares induzidas pela crotoxina podem estar relacionadas aos diferentes tipos de fibras encontradas no organismo e sua seletividade por fibras musculares oxidativas (SALVINI et al., 2001).

Para o cálculo do tamanho do efeito foram selecionadas as variáveis segmentados, CK e ALT. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Quando comparados com o G1, as variáveis ALT e segmentados tiveram efeito grande e de tamanho semelhante em G2 e G3; a para a variável CK, o efeito foi maior no G2. Quando comparados G2 e G3, a variável ALT teve efeito médio e as variáveis segmentados e CK apresentou efeito grande.

Tabela 2 – Cálculo do tamanho do efeito (d) para as variáveis segmentados, creatina quinase (CK) e alanino aminotransferase (ALT), consideradas de maior relevância entre os diferentes grupos G1 (controle), G2 (*Crotalus durissus collilineatus*), G3 (*Crotalus durissus terrificus*).

Variável	Pares de grupos		
	G1 – G2 (d)	G1 – G3 (d)	G2 – G3 (d)
Segmentados/mm ³	3,82	3,79	1,11
CK-U/L	2,47	1,73	1,68
ALT-U/L	1,25	1,22	0,41

Tamanho do efeito (d): pequeno (0,20-0,30); médio (0,40-0,70); grande ($\geq 0,80$).

O estudo foi limitado pela impossibilidade de estudar a composição exata da peçonha utilizada, para comparação dos efeitos clínicos e laboratoriais, no entanto, lembramos que a composição do veneno bruto pode sofrer uma grande variação da sua composição e os acidentes ocorrem com o veneno bruto, o que é importante para o clínico no momento do atendimento. Ainda há que se pesquisar as variações de CK e CK-MB, correlacionadas com as lesões histológicas musculares gerais.

Conclusões

Os dois venenos provocaram alterações clínicas, laboratoriais e histológicas já na primeira hora, com piora gradativa ao longo do tempo. Alterações clínicas foram mais evidentes nos animais intoxicados com veneno da *Cdt*, assim como foram mais intensas as alterações histológicas no músculo inoculado. Já o veneno da *Cdc* provocou maiores alterações laboratoriais, tanto no hemograma como na bioquímica sérica. Sugere-se que outros estudos sejam realizados com as diferentes frações de cada veneno e do veneno bruto sobre os diferentes tipos musculares.

Agradecimentos

Ao Dr. Nelson Jorge da Silva Jr e a Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela doação do *pool* de veneno utilizado neste experimento.

Referências

AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; REZENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, v. 33, p. 251-255, 1991.

ARRUDA, E.J.; KITAMURA, J.H.; CHAVES, T.P.; DA SILVA, C.A.; MASCARIM, A.L. Comportamento Exploratório e Ansiolítico de Ratos e Ratas Submetidos à Estimulação Somatossensorial Exploratory and Anxiolytic Behavior of Rats Submitted do Somatosensory Stimulation. *Revista Brasileira de Terapias e Saúde*, v.2, n.1, p.7-12, 2011.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO P.; HERING S.E. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 36, p.480-489, 2003.

BICUDO, P.L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In: BARRAVIERA, B. *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, p.375-387, 1994.

BLANCO, B.S., MELO, M.M. Acidente crotálico. In: *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG), Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, n.75, p. 27-35, 2014.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, n.1, p. 7-16, 2003.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M.M.; RODRIGUES, R.S.; DE LA TORRE, P.; PÉREZ, A.; SOARES, A.M.; ZINGALI, R.B.; NOGUEIRA, R.A., RODRIGUES, V.M.; SANZ, L.; CALÇVETE, J.J. Poison and anti-venom of snakes of the *Crotalus durissus subspecies* of Brazil: evaluation of the geographic variation and its implication in the management of the snake bite. *Journal of Proteomics*, v. 73, n.9, p.1758-76, Aug. 2010.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa 15 de 16 de dezembro de 2013. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica. *Diário Oficial da União* de 18/12/2013, Seção I, Pág. 9. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-15-de-16.12.2013-D.O.U.-de-18.12.2013-

[Secao-I-Pag.-9.pdf](#). Acesso em: 06/06/2017.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa 33 de 18 de novembro de 2016. Baixa o Capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. *Diário Oficial da União* de 21/11/2016, Seção I, Pág.05. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf. Acesso em: 06/06/2017.

BRASIL. Informações da Saúde *TABNET*. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso em 26/04/2018.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa 37 de 15 de fevereiro de 2018a. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. *Diário Oficial da União* de 21/11/2016, Seção I, Pág.05. Disponível em: http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/RN-37.pdf. Acesso em: 06/06/2017.

BUCARETCHI, F.; DE CAPITANI, E.M.; HYSLOP, S.; MELLO, S.M.; FERNANDES, C.B.; BERGO, F.; NASCIMENTO, F.B. Compartment syndrome after South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation. *Clinical Toxicology*, v.52, n.6, p.639-641, 2014.

CAVALCANTE, W.L.G.; NORONHA-MATOS, J.B.; TIMÓTEO, M.A.; FONTES, M.R.M.; GALLACCI, M.; CORREIA DE SÁ, P. Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom requires its acidic chaperone to concomitantly inhibit the release of acetylcholine and produce muscle blockade. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.334, n.1, p.8-17. nov. 2017. DOI: 10.1016/j.taap.2017.08.021.

CÉSPEDES, N.; CASTRO, F.; JIMÉNEZ, E.; MONTEALEGRE, L.; CASTELLANOS, A.; CAÑAS, C.A.; ARÉVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S. Biochemical comparison of venoms from 560ung Colombian *Crotalus durissus cumanensis* and their parentes. **Journal of Venomous Animals and toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.16, n.2, p.268-84, May. 2010. DOI: 10.1590/S1678-91992010000200009

CHIPPAUX, J.P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.23, n.38, Aug. 2017. DOI: 10.1186/s40409-017-0127-6

COLLICCHIO RC., SAKATE M., BALARIN MRS., HATAKA A., KLEIN RP., VIANA L., NOGUEIRA FS. Relato de caso: Alterações clínicas e laboratoriais conseqüentes à picada de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em uma cadela gestante. *Clín. Vet.*, São Paulo, 2002, 40, 45-8.

GRAÇA, F.A.S.; PEIXOTO, P.V.; COELHO, C.D.; CALDAS, S.A.; TOKARNIA, C.H. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crotálico experimental em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.6, p.261-270, 2008.

HABIB, A.G.; BROWN, N.I. The snakebite problem and antivenom crisis from a health-economic perspective. *Toxicon*, v.150, p. 115-123, May. 2018.

KILKENNY, C.; BROWNE, W.; CUTHILL, I.C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D.G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, v.8, n.6, e1000412, Jun. 2010.

LAGO, L.A.; MELO, M.M.; FERREIRA, P.M.; FACURY FILHO E.J. Alterações hematológicas em bovinos submetidos ao envenenamento crotálico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.1, p. 7-13, 2001.

LIMA, S.C.; PORTA, L.C.; LIMA, A.C.; CAMPEIRO, J.D.; MEURER, Y.; TEIXEIRA, N.B.; DUARTE, T.; OLIVEIRA, E.B.; PICOLO, G.; GODINHO, R.O.; SILVA, R.H.; HAYASHI, M.A.F. Pharmacological characterization of the effects of crotamine on hind limb paralysis of mice using ex vivo and in vivo assays: Findings on the involvement of voltage-dependent ion channels in the action of crotamine on the skeletal muscles. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Valencia, v.12, n.8, eCollection, Aug, 2018.

LOPES, C.T.A.; TOKARNIA, C.H.; MARILENE, F.B.; SOUSA, M.G.S.; OLIVEIRA, C.M.C.; SILVA, N.S.; LIMA, D.H.S.; BARBOSA, J.D. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais de envenenamento crotálico experimental em equinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.32, n.9, p.843-849, 2012.

MANN, P.C.; VAHLE, J.; KEENAN, C.M.; BAKER, J.F.; BRADLEY, A.E.; GOODMAN, D.G,

HARADA, T.; HERBERT, R.; KAUFMANN, W.; KELLNER, R.; NOLTE, T.; RITTINGHAUSEN, S.; TANAKA, T. International Harmonization of Toxicologic Pathology Nomenclature: An Overview and Review of Basic Principles. *Toxicologic Pathology*, v.40, n.4, p. 7S–13S, 2012.

MEDIAVILLA, D. O mundo se une contra as picadas de cobra, outra grande doença mortal. *El País Brasil*, 29 mai 2018. Disponível em: <https://brasil.elpais.com/brasil/2018/05/24/politica/1527179251_016445.html> Acesso em: 01 out. 2018.

MOTTA, Y.P. *Aspectos clínico, laboratorial e histopatológico da intoxicação experimental pelos venenos das serpentes Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus em ratos Wistar tratados com antiveneno e Mikania glomerata* 2008. 238f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

NOGUEIRA, R.M.B., SAKATE M. Alterações clínicas e hematológicas em cães durante o envenenamento experimental com veneno de *Crotalus durissus terrificus* e tratados com soro antiofídico. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v.12, 285-96, 2006.

NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE,; SANGIORGIO, F.; LAPOSY, C.B.; MELERO, M. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum-Part I: clinical evaluation, hematology and myelogram. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13: 800-810, 2007a.

NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M.; SANGIORGIO, F.; LAPOSY, C.B.; TOSTES, R. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum-Part II: Laboratory aspects, eletrocardiograma and histopathology. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 13, n. 4, p. 811-820, 2007b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Snakebite envenoming*. Disponível em: <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>. Acesso em:25/07/2018.

PEREIRA, C.P.; NOGUEIRA, R.M.B. *Clinical and hepatotoxicity of the venom of Crotalus durissus terrificus and snakebite serum in Wistar rats* 2012. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2012.

RIBEIRO, G.B.; ALMEIDA, H.C.; VEARDE, D.T.; SÁ, L.V.M. Study of crotoxin on the induction of paralysis in extraocular muscle in animal model. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, São Paulo, v.75, n.5, p.307-312, Oct. 2012.

RORIZ, K.R.P.S.; ZAQUEO, K.D.; SETUBAL, S.S.; KATSURAGAWA, T.H.; SILVA, R.R.; FERNANDES, C.F.C.; CARDOSO, L.A.P.; RODRIGUES, M.M.S.; SOARES, A.M.; STÁBELI, R.G.; ZULIANI, J.P. Epidemiological study of snakebite cases in Brazilian Western Amazonia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.51, n.3, p.338-46, May-June, 2018.

SALVINI, T.F.; AMARAL, A.C.; MIYABARA, E.H.; TURRI, J.A.O.; DANELLA, P.M.; SELIESTRE DE ARAÚJO, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*, v.39, n.8, p.1141-1149, Nov. 2001.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. - 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2002. 265 p.

SAMPAIO, S.C; HYSLOP, S.; FONTES, M.R.; PRADO-FRANCHESCHI, J.; ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P.; CURY, Y. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. *Toxicon*, v.55, n.6, p.1045-60. Jun. 2010

SANTOS, W.G.; BEIER, S.L.; SOTO-BLANCO, B.; MELO, M.M. Envenenamento crotálico em cães. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v.13, supl., p. 5-6, 2013.

SILVA, V.A.R.; MORIGUCHI, P.; CARMO, A.O.; GUERREIRO, J.R. Determinação da estrutura da gioxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por modelagem molecular. *Journal of the Health Sciences Institute*, São Paulo, v. 34, n.3, p. 168-72, jul./set. 2016.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p. 55-68, abr./jun. 2006.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; DÖBEREINER, J. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops* spp. em animais de produção.

Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.34, n.4, p. 301-312, abr. 2014.

TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; BARBOSA, R.L.; CORSO, G.; BOSCHERO, C. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochimica and Biophysica Acta*, v.6, n.1474, p.56-60, 2000.

ANEXO A – Parecer de aprovação

28/08/2018

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE CLÍNICA E LABORATORIAL DOS EFEITOS DO VENENO BRUTO DA SERPENTE CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS (AMARAL, 1926) EM RATOS WISTAR", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3793 e tendo como participante(s) ADRIANA FALCO DE BRITO (discente), ISABELLA K N SANESHIGUE DOS SANTOS (discente), ANDRE CARRION DE FARES PINTO (discente), ELAINE CARRION DE FARES (discente), ISABELA ALVES BESERRA (discente), ANA MARIA SIQUEIRA SILVEIRA WEHBE (técnico participante), CECILIA BRAGA LAPOSY (docente), ROGERIO GIUFFRIDA (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 10/05/2017.

Vigência do projeto: 04/2017 a 05/2018.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Ratos wistar	60	325 gramas	80 dias	M	projeto 3220

Presidente Prudente, 23 de Novembro de 2017.



Prof. Dr. Air Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI



Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 7f9b2696bb7bb2ee543d7e2b52b590dd

ANEXO B – Termo de doação do pool de venenos



Coleção Herpetológica do Centro de Estudos e
Pesquisas Biológicas – PUC Goiás

Escola de Ciências Agrárias e Biológicas, ECAB
Av. Engler, s/n, Goiânia, GO, Brasil
CEP: 74885-460
Fone: (062) 3946-1740



Para: Dr. Nelson Jorge da Silva Jr.
(To):

Coleção de: Répteis (Biotério)
(Collection of)

Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Guia de Remessa nº: 01/2018
(Shipping invoice nº)

Data: 04/04/2018
(Date)

Período: não se aplica
(Loan period)

Este material está sendo enviado como (This material is being send as):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Empréstimo (Loan) | <input type="checkbox"/> Devolução (Return) |
| <input type="checkbox"/> Permuta (Exchange) | <input type="checkbox"/> Identificação (For identification) |
| <input checked="" type="checkbox"/> Doação (Gift) | <input type="checkbox"/> Outros (Others): |

Discriminação:
(Discrimination)

Aliquotas de veneno de *Crotalus durissus* (30mg, classe 1 = jovens; 30mg, classe 2 = subadultos; 30mg, classe 3 = adultos) para uso no projeto “Análise clínica e laboratorial dos efeitos do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral, 1926) em ratos Wistar”.

Material recebido em boas condições
(Material received in good order)

Assinatura:
(Signature)

Data:
(Date)

Favor assinar e devolver a cópia
(Please sign and return the copy)

Autorizado:
(Authorized)

Dr. Wilian Vaz Silva
Coordenador do CEPB

Responsável pelo transporte:
(Responsible for transit)

Data: 04/04/2018
(Date)

Nelson Jorge da Silva Jr. - Ph.D.
CRBio 12527-4 CEPB 001.5.

ANEXO C – Quadro comparativo de alterações encontradas

Parâmetro	G2 (Cdc)	G3 (Cdt)
Locomoção	↓↓↓	↓↓↓
Sedação	↑↑	--
Edema local inoculação	↑↑↑	↑
Hemoconcentração	↑↑	↑
RDW-CV	--	↑
Leucócitos totais, segmentados e monócitos	↑↑	↑
AST, ALT, CK, Ureia e Creatinina	↑↑	↑
ALP e CK MB	↓	--
Miotoxicidade local	↑↑	↑↑↑