

**Maria Beatriz Bernardez Amorim**

**Comparação da resposta inflamatória nas lesões musculares causadas pelos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

**Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador: Dr. Luís Roberto de Camargo Gonçalves**

**SÃO PAULO**

**2019**

**Maria Beatriz Bernardez Amorim**

**Comparação da resposta inflamatória nas lesões musculares causadas pelos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

**Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientador: Dr. Luís Roberto de Camargo Gonçalves**

**SÃO PAULO**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Amorim, Maria Beatriz Bernardez

Comparação da resposta inflamatória nas lesões musculares causadas pelos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*/ Maria Beatriz Bernardez Amorim. -2019.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves.

1. Bothrops. 2. Crotalus. 3. Inflamação. 4. Ferimentos e lesões. 5. Envenenamento.

SES/CCD/CD-396/2019

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

## Dedicatória

Ao meu pai, **Demóstenes Conceição Amorim**, por todo incentivo, dedicação, carinho, paciência e por nunca me deixar desistir dos meus objetivos.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e irmãos, principalmente a minha irmã Isabel Cristina por me apoiar e ajudar sempre.

Ao orientador Dr. Luís Roberto de Camargo Gonçalves, pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos, paciência e dedicação durante esses anos.

Á Magna, pelo trabalho de fazer as lâminas histológicas que ficaram lindíssimas.

Á todos os colegas do laboratório de Fisiopatologia, por tornar meus dias mais alegres e por todos os ensinamentos.

Ao auxílio financeiro da CAPES.

**Resumo:** No Brasil ocorrem anualmente cerca de 30.000 acidentes ofídicos, sendo os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* responsáveis por 90% e 8% desses acidentes, respectivamente. Os envenenamentos botrópicos caracterizam-se por intensas reações inflamatórias locais, podendo evoluir para grandes perdas teciduais, com sequelas debilitantes. Já o envenenamento crotálico, caracteriza-se por sintomas neurotóxicos, além de distúrbios hemostáticos e resposta inflamatória local praticamente inexistente. Os dois venenos são altamente miotóxicos. O presente trabalho visou caracterizar a resposta inflamatória na lesão muscular causada pelos venenos de *Bothrops jararacussu* e de *Crotalus durissus terrificus*. Nossos resultados mostraram que os dois venenos, em doses subletais, causam intensa lesão muscular com o aumento da creatinoquinase (CK) sérica e alterações morfológicas nas fibras musculares causando ruptura dessas fibras, além da presença de mionecrose e aumento do influxo leucocitário. O envenenamento no músculo gastrocnêmio por Cdt e Bjussu, elevou o influxo de leucócitos, a atividade da mieloperoxidase atingiu seu pico 24 horas após os envenenamentos, sendo a atividade mais exacerbada no grupo VBjussu, enquanto o acúmulo de células mononucleares ativadas foi crescente após o envenenamento por Bjussu até o período de 48 horas, no VCdt expressando atividade enzimática de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase que ocorreu de maneira fraca no período de 48 e 72 horas. Sobre a interação leucócito endotélio, o VCdt apresentou resposta inflamatória na musculatura esquelética elevando o *rolling* celular no período de 2 horas e a adesão celular no período de 24 horas, o VBjussu aumentou todos os parâmetros analisados. No tecido conjuntivo, o VCdt apresentou uma resposta inflamatória fraca no mesentério no período de 2 horas, sem elevar o *rolling* e adesão celular quando comparado ao VBjussu. Sugerindo que o VBjussu induz uma interação leucócito-endotélio, enquanto no VCdt essa interação é mais tardia, menos intensa e provavelmente devida a um efeito secundário, como o início do processo de regeneração da musculatura esquelética em resposta a fatores liberados do tecido lesado. Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus*, inflamação, lesão muscular.

**Abstract:** In Brazil, about 30,000 accidents occur annually, with the genus *Bothrops* and *Crotalus* responsible for 90% and 8% of these accidents, respectively. *Bothrops* envenomings are characterized by intense local inflammatory reactions, and massive tissue losses, with debilitating sequelae. Crotalic envenoming is characterized by neurotoxic symptoms, as well as hemostatic disturbances and virtually no local inflammatory response. The two envenomings are highly myotoxic. The present work aimed to characterize the inflammatory response in the muscular injury caused by the envenoming of *Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus terrificus*. Our results showed that the two venoms, in sublethal doses, cause intense muscular injury with the increase of serum creatine kinase (CK) and morphological alterations in the muscle fibers causing rupture of these fibers, besides the presence of myonecrosis and increase in leukocyte influx. Envenoming in the gastrocnemius muscle by Cdt and Bjuusu elevated the leukocyte influx, the myeloperoxidase activity reached its peak 24 hours after the envenoming, and the activity was more exacerbated in the VBjuusu group, while the accumulation of cells Activated mononuclear cells were increasing after Bjuusu envenoming up to 48 hours, in the VCdt expressing enzymatic activity of N-acetyl- $\beta$ -D-glycosamidase that occurred weakly in the period of 48 and 72 hours. On the leukocyte endothelium interaction, the VCdt presented inflammatory response in the skeletal musculature raising the cell rolling in the period of 2 hours and cell adhesion in the period of 24 hours, the VBjuusu increased all the parameters analyzed. In the connective tissue, the VCdt presented a weak inflammatory response in the mesentery in the period of 2 hours, without raising the rolling and cell adhesion when compared to VBjuusu. Suggesting that VBjuusu induces a leukocyte-endothelium interaction, while in the VCdt this interaction is more late, less intense and probably due to a side effect, such as the onset of the skeletal muscle regeneration process in response to factors released from injured tissue.

**Keywords:** *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus*, inflammation, muscle injury.

## Lista de abreviaturas

ANOVA- análise de variância

AP-1- Proteína ativadora 1

ATP- adenosina trifosfato

BBS- solução salina tamponada de bicarbonato

BthTX I- Bothropstoxina I

BthTX II- Bothropstoxina II

AMPc- adenosina monofosfato cíclica

CD11a- cluster de diferenciação a

CD11b- cluster de diferenciação b

CK- creatinoquinase

COX<sub>2</sub>- Ciclooxygenase-2

CTX- Crotoxina

ICAM - Molécula de adesão intercelular

IgG – Imunoglobulina G

LDH- Lactato desidrogenase

IL-1 - Interleucina 1

IFN- $\alpha$ - Interferon  $\alpha$

IFN- $\gamma$  - Interferon  $\gamma$

LFA1- Antígeno associado à função linfocitária

MAC1- Antígeno do macrófago 1

MPO- Mieloperoxidase



NAG-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase

NF-KB- factor nuclear kappa B

$\mu$ g- microgramas

$\mu$ l- microlitros

TNF- $\alpha$  Fator de necrose tumoral- $\alpha$

PLA<sub>2</sub>-fosfolipases A<sub>2</sub>

PECAM 1- molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PGE<sub>2</sub>- prostaglandina E<sub>2</sub>

VBa- Veneno de *Bothrops asper*

VCdt-Veneno de *Crotallus durissus terrificus*

VBj- Veneno de *Bothrops jararaca*

VBjussu-Veneno de *Bothrops jararacussu*

VCAM 1- molécula de adesão da célula vascular

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1</b> – Serpente <i>Bothrops jararacussu</i>	<b>05</b>
<b>Figura 2</b> - Serpente <i>Bothrops durissus terrificus</i>	<b>07</b>
<b>Figura 3</b> – Etapas do processo de migração leucocitária	<b>14</b>
<b>Figura 4</b> – Efeito miotóxico dos venenos	<b>22</b>
<b>Figura 5</b> – Efeito miotóxico do veneno no músculo gastrocnêmio	<b>23</b>
<b>Figura 6</b> – Efeito do envenenamento sobre a atividade de LDH	<b>24</b>
<b>Figura 7</b> – Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos 4 horas após a injeção com o veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> ou <i>Bothrops jararacussu</i>	<b>25</b>
<b>Figura 8</b> - Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos 24 horas após a injeção com o veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> ou <i>Bothrops jararacussu</i>	<b>27</b>
<b>Figura 9</b> - Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos 48 horas após a injeção com o veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> ou <i>Bothrops jararacussu</i>	<b>29</b>
<b>Figura 10</b> - Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos 72 horas após a injeção com o veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> ou <i>Bothrops jararacussu</i>	<b>31</b>
<b>Figura 11</b> – Efeito do envenenamento sobre o recrutamento de células polimorfonucleares	<b>32</b>
<b>Figura 12</b> - Efeito do envenenamento sobre o recrutamento de células mononucleares	<b>33</b>
<b>Figura 13</b> - Interação leucócito endotélio na microcirculação do músculo cremaster	<b>35</b>
<b>Figura 14</b> – Imagem da interação leucócito endotélio no músculo cremaster 2 horas após o envenenamento	<b>36</b>
<b>Figura 15</b> – Imagem da interação leucócito endotélio no músculo cremaster 24 horas após o envenenamento	<b>38</b>
<b>Figura 16</b> - Interação leucócito endotélio na microcirculação do mesentério 2 horas após o envenenamento	<b>39</b>
<b>Figura 17</b> – Imagem Interação leucócito endotélio na microcirculação do mesentério 2 horas após o envenenamento	<b>40</b>

## Índice

<b>1. INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>3</b>
1.2-Envenenamento Botrópico .....	3
1.3-Envenenamento Crotálico .....	6
1.4- Fosfolipases A <sub>2</sub> miotóxicas encontradas no veneno de serpentes: mecanismos de ação na lesão muscular e na inflamação.....	9
1.5-Processo inflamatório .....	11
1.6-Processo inflamatório e interação leucócito endotélio.....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1. Objetivos Gerais .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
4.1-Efeito miotóxico dos venenos sobre CK sérica.....	22
4.2-Quantificação bioquímica de indicadores de lesão tecidual .....	22
4.3.1- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida por VCdt ou VBjussu 4 horas após o envenenamento. ....	24
4.3.2- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida por VCdt ou VBjussu 24 horas após o envenenamento. ....	26
4.3.4- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida por VCdt ou VBjussu 72 horas após o envenenamento. ....	30
4.4-Quantificação bioquímica de componentes do infiltrado inflamatório. ....	32
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>6.RESUMO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>7.CONCLUSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os envenenamentos ofídicos representam uma relevante emergência médica que ocorre com grande frequência e sempre requerem cuidados urgentes. No mundo estima-se a ocorrência de 1.8 a 2.7 milhões de acidentes ofídicos, com estimativa de 81 mil a 138 mil óbitos em decorrência dos acidentes ofídicos (Ministério da Saúde, 2018). No ano de 2017 no Brasil foram notificados 28.601 casos de acidentes com serpentes (Portal Ministério da Saúde, 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2007), agricultores adultos e crianças, além de trabalhadores de comunidades rurais pobres são os mais vulneráveis a esses acidentes.

Na América do sul as serpentes do gênero *Bothrops* ocasionam cerca de 90% e as do gênero *Crotalus* são responsáveis por aproximadamente 8% dos acidentes ofídicos ocorridos no país (Araújo *et al*, 2003; Datasus, 2016). Os acidentes ofídicos são relevantes para saúde pública, devido a sua incidência, morbidade e mortalidade (Daher *et al.*, 2013). Em casos graves, os venenos botrópicos podem ocasionar efeitos locais levando a sequelas drásticas, como perda permanente de tecido, incapacidade ou mesmo amputação (Saturnino-Oliveira *et al.*, 2012).

A OMS (Organização Mundial da Saúde) acrescentou o envenenamento ofídico a sua lista prioritária de doenças tropicais negligenciadas em 2017, propondo em uma de suas diretivas de prioridade de pesquisas, o estudo da associação de fármacos ao tratamento de acidentes por toxinas animais (WHO, 2019)

### 1.2-Envenenamento Botrópico

O veneno botrópico possui três atividades principais: (1) a atividade proteolítica, relacionada à atividade pró-inflamatória; (2) a ação coagulante, decorrente da ação de toxinas ativadoras dos fatores X e II (protrombina) da cascata de coagulação e de enzimas trombina-símeles; e (3) a atividade hemorrágica, devido à ação de hemorraginas que provocam lesões na membrana basal dos capilares, podendo ocasionar sangramento sistêmico (França *et al*, 2003). Nos envenenamentos botrópicos ocorrem reações locais e

sistêmicas. Nas locais, ocorrem intensas manifestações inflamatórias como a presença de edema, dor, hemorragia e mionecrose, podendo resultar em perdas teciduais (Gutiérrez et al., 2009; Teixeira et al., 1994). A magnitude dos efeitos em humanos aborda uma série de alterações sistêmicas, distúrbios na coagulação sanguínea da vítima incluindo disfunção renal, coagulopatias e distúrbios hemodinâmicos (Rosenfeld, 1971; Boer-Lima et al., 2002).

Após a inoculação, o veneno botrópico promove ação citotóxica local, induzindo a liberação de substâncias farmacologicamente ativas do tecido lesado, como bradicinina e serotonina, com outros mediadores da resposta inflamatória. Em decorrência do edema pode ocorrer a compressão dos feixes nervosos acarretando um processo isquêmico (Gutierrez & Lomonte., 2003).

Plaquetas e fatores de coagulação estão envolvidos no comprometimento da hemostasia no acidente botrópico, o veneno possui capacidade de ativar fatores de coagulação sanguínea, causando o consumo de fibrinogênio e formação de fibrina intravascular, induzindo a incoagulabilidade sanguínea (França, 2003). Dentre os principais componentes dos venenos botrópicos destacam-se as toxinas classificadas como metaloproteínases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>.

As metaloproteínases são responsáveis pela hemorragia no local da picada e pelas reações inflamatórias. Essas toxinas são dependentes de zinco e foram agrupadas na família das SVMP (snake venom metalloproteases), (Bjarnason e Fox, 1995). De acordo com os seus domínios estruturais, as SVMPs foram divididas em 3 grupos: PI a PIII (Fox e Serrano, 2008).

As serinoproteases, encontradas no veneno botrópico são caracterizadas como enzimas tipo trombina, atuando sobre o fibrinogênio, agindo sobre os componentes da cascata de coagulação e sobre as células causando um desequilíbrio no sistema hemostático (Maruyama *et al.*, 1992; Serrano., 2013).

Outro componente presente no veneno botrópico são as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Estas toxinas podem apresentar atividade inflamatória e atividade miotóxica direta, induzindo um padrão semelhante de eventos degenerativos nas células musculares (Gutiérrez & Ownby., 2003).

Além disso, as desintegrinas derivadas do veneno são peptídeos de baixo peso molecular que se ligam a proteínas de adesão encontradas na superfície celular chamada integrina, responsáveis pela proliferação e ativação celular. São capazes de bloquear as integrinas impedindo de se ligarem a outras células, bloqueando o principal receptor de fibrinogênio responsável pela mediação da agregação plaquetária induzida por colágeno e por adenina difosfato (Chotenimitkhun e Rojnuckarin, 2008).

Outro fator que agrava a lesão local é a utilização de torniquete ou garrote e o retardo na administração do antiveneno. Um estudo de caso realizado com serpentes do gênero *Bothrops*, mostrou que de 3,139 casos de acidentes ofídicos ocorridos entre os anos de 1986 e 1989, cerca 1,199 desses pacientes realizaram torniquete de diferentes formas, intensidades e período, agravando assim o quadro de envenenamento e aumentando as chances de sequelas (Ribeiro e Jorge, 2005).

### 1.2.1- *Bothrops jararacussu*



**Figura 1.** Serpente *Bothrops jararacussu*.

(Fonte: <https://www.flickr.com/photos/77481994@N02/16568756396>)

A serpente *Bothrops jararacussu*, cujo nome significa “jararaca grande” no idioma nativo indígena, pode ser encontrada em regiões baixas e alagadiças, margens de rios e lagoas, pode alcançar dois metros e meio de comprimento.

O veneno de *B. jararacussu* possui uma potente atividade miotóxica, composto principalmente por fosfolipase A<sub>2</sub> (25.7%) e metaloproteases (26.2%) (Sousa et al., 2013). As miotoxinas presentes nesse veneno apresentam identidade imunológica com fosfolipases A<sub>2</sub> presentes no veneno crotálico, sendo que, dentre os venenos botrópicos, o veneno de *B. jararacussu* é mais

bem neutralizado pelo soro antibotrópico-crotálico (dos Santos *et al.* 1992, Milani Júnior *et al.* 1997).

Entre todas as serpentes brasileiras pertencentes ao gênero *Bothrops*, o veneno da *Bothrops jararacussu* é considerado o mais miotóxico, devido à presença de ao menos duas potentes miotoxinas, a bothropstoxina I (BthTx-I) e a bothropstoxina II (BthTx-II) (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1991). A lesão muscular ocorre de forma aguda, por meio da degeneração e necrose das fibras musculares esqueléticas e quando a lesão é causada pelo veneno bruto, pode haver uma regeneração tecidual deficiente, com o aparecimento de fibrose. (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Moura-Da-Silva *et al.*, 1991; Queiroz *et al.*, 1984)

O veneno de *Bothrops jararacussu*, apresenta algumas características no seu quadro clínico e laboratorial que se destacam sobre o gênero botrópico. Um estudo realizado por França e Málaque (2003) mostrou que de 29 pessoas analisadas após o envenenamento por VBJussu, 6,9% apresentaram gengivorragia, presença de bolha em 24.1%, abcesso em 17.2%, além de 10.3% de pacientes que foram a óbito.

Apesar de o óbito ser uma consequência muito temida, a amputação do membro ocorre com frequência, sendo esse evento bastante indesejado e debilitante para o paciente (Ribeiro e Jorge, 2005). Um estudo mostrou que em casos isolados o envenenamento por *Bothrops jararacussu* resultou na perda do membro, essa perda ocorreu devido a ulceração nos nervos, tendões e artérias do antebraço (Milani Júnior *et al.*, 1997).

### **1.3-Envenenamento Crotálico**

No Brasil, o gênero *Crotalus* compreende cerca de 5 subespécies: a *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus marajoensis* (Pinho & Pereira 2001).

A ação do veneno crotálico no organismo humano caracteriza-se por pouca atividade inflamatória no local da picada, porém em nível sistêmico apresenta ação miotóxica, paralisia respiratória, diminuição da pressão arterial e

a falência renal aguda, induzindo o quadro de destruição do músculo esquelético com vazamento do conteúdo muscular (rabdomiólise) generalizada e incoagulabilidade sanguínea (Azevedo-marques *et al*, 2003; Sano-Martins 2001). Estudos clínicos, realizados por Rosenfeld (1971), mostraram que a atividade neurotóxica do veneno é normalmente caracterizada pelo aparecimento do chamado “facies miastênico” ou “facies neurotóxico”, onde se observam ptose palpebral, diplopia, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos.

### 1.3.1- *Crotalus durissus terrificus*



**Figura 2.** Serpente *Crotalus durissus terrificus*. (Fonte: <http://ciatox.sc.gov.br/serpente-crotalus-durissus-terrificus>)

A *Crotalus durissus terrificus* é encontrada com maior frequência nos campos e matas da região sul, sudeste e centro-oeste e ainda em áreas de mata atlântica (Araújo *et al.*, 2003).

O veneno crotálico é composto principalmente pelas seguintes toxinas:

- (1) Crotoxina: Isolada e cristalizada a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por Slotta e Frenkel-Conrat (1938) representa maior fração do veneno sendo este o principal componente tóxico. Esta toxina é formada por duas subunidades, uma básica a fosfolipase A<sub>2</sub> e outra acida a crotapotina, que potencializa a letalidade da fosfolipase A<sub>2</sub>, além de diminuir a atividade enzimática. A Crotoxina atua diretamente sobre as células de músculos esqueléticos induzindo miotoxicidade sistêmica, evidenciada pela presença de mioglobínúria, mioglobinemia e por drástico aumento do nível sérico de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase (Azevedo-Marques *et al.*,



1985), sendo capaz de induzir necrose no músculo esquelético (Gopalakrishnakone e Hawgood, 1984; Mebs e OWNBYt, 1990)

- (2) Crotamina: Atua em músculos esqueléticos através da despolarização do potencial de membrana, induzindo a paralisia espasmódica (Clissa, 1997). Essa miotoxina age sobre as membranas das fibras musculares, sendo capaz de causar mionecrose no tecido muscular por um desequilíbrio nas bombas de sódio.
- (3) Convulxina: Neurotoxina responsável por apresentar em camundongos um quadro de perda de equilíbrio, alterações gastrintestinais, convulsões e alterações visuais, capaz de induzir agregação plaquetária por meio da síntese de tromboxano A<sub>2</sub> iniciando um processo de isquemia cerebral levando a convulsões, normalmente seguidas de morte (Prado-Franceschi e Vital Brazil, 1981)
- (4) Girotoxina: Trata-se de uma serinoprotease trombina-símile, com atividade esterásica e fibrinogenolítica. Além de agir sobre o sistema nervoso central, levando a lesão labiríntica.

O efeito miotóxico do veneno é decorrente da ação da crotalina e da crotamina, mas principalmente da crotalina.

No que se refere à crotalina, estudos o mostraram que além de induzir lesão sistêmica na musculatura esquelética, essa lesão ocorre de maneira seletiva em músculos ou regiões musculares compostas por fibras musculares oxidativas, liberando mioglobina, elevando enzimas marcadoras de lesão muscular como creatinoquinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase, sofrendo alterações de acordo com a concentração da toxina (Salvini *et al.*, 2001), complementando esses resultados, Cupo *et al* (1990) mostraram que essa toxina afeta as fibras por meio da circulação sanguínea, sendo as fibras musculares, tipo I e tipo IIA mais irrigadas e mais afetadas pela crotalina, sofrendo maiores danos, explicando dessa maneira o dano preferencial às fibras oxidativas do músculo gastrocnêmio.

#### **1.4- Fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas encontradas no veneno de serpentes: mecanismos de ação na lesão muscular e na inflamação**

As fosfolipases A<sub>2</sub> de veneno de serpente apresentam uma grande diversidade funcional, atuando de forma local ou sistêmica, além de sua atividade tóxica, algumas fosfolipases A<sub>2</sub> causam necrose das fibras musculares esqueléticas, devido a isso são consideradas PLA<sub>2</sub> miotóxicas (Teixeira et al., 2003), além dessa miotoxicidade essas enzimas são capazes de provocar eventos inflamatórios em modelos experimentais. Essas miotoxinas são proteínas básicas, com peso molecular de aproximadamente 15 kDA, com propriedades estruturais que permitem classifica-las como fosfolipases A<sub>2</sub> (Lomonte e Gutiérrez, 2011).

As fosfolipases A<sub>2</sub> são classificadas em dois tipos, Asp49 (cataliticamente ativa) e Lys49 (cataliticamente não ativa) consideradas miotóxicas, além de apresentar eventos inflamatórios distintos em modelos experimentais (Gutiérrez & Lomonte 1995).

A miotoxicidade induzida pelo veneno de serpente apresenta dois padrões clínicos diferentes: miotoxicidade sistêmica, sendo caracterizado por dano muscular difundido, aumento na atividade creatina quinase plasmática (CK) e mioglobínúria, normalmente com alterações renais e hipercalemia. Em contrapartida, muitos venenos viperídeos induzem miotoxicidade local. Essa mionecrose local está também relacionada a efeitos relacionados a outras toxinas, além das miotoxinas, podendo levar a um comprometimento da circulação e da inervação local, causando uma mionecrose secundária a uma isquemia, mas sem alterações sistêmicas (Milani Júnior et al., 1997; Otero et al., 2002).

As fosfolipases A<sub>2</sub> se ligam aos receptores da membrana plasmática, causando a ruptura da integridade desta membrana ocasionando a perda no controle da permeabilidade, resultando no influxo proeminente de Ca<sup>2+</sup> (Harris, 2003) que é responsável por vários processos degenerativos que rapidamente terminam em dano celular irreversível. A entrada de cálcio gera alterações celulares, como a hipercontração de miofilamentos seguida pela degradação das proteínas musculares, ruptura e alterações das membranas mitocondriais,

alterações metabólicas, ativação de enzimas proteolíticas dependentes de cálcio, ativação das fosfolipases A<sub>2</sub> endógenas e ativação de proteases endógena. (Gutiérrez e Ownby, 2003). O processo degenerativo termina com danos irreversíveis as células, desenvolvendo o início do processo inflamatório agudo associado á dor, edema e recrutamento celular, com a liberação de substâncias quimiotáticas e a chegada de células inflamatórias (principalmente neutrófilos e macrófagos) que removem os detritos necróticos e preparam o tecido para regeneração muscular (Gutiérrez et al., 1990; Gutiérrez e Ownby, 2003).

Dentre os venenos analisados, o VCdt é um complexo constituído por cerca de 60% de crotoxina, formada pelo complexo de fosfolipase A<sub>2</sub> dimérica, composta por cadeia básica de fosfolipase A<sub>2</sub>, crotoxina B e uma subunidade ácida não enzimática, crotoxina A ou crotapotina. Acredita-se que a crotapotina se comporta como um transportador para a subunidade B, reduzindo sua interação não específica, aumentando a ligação com seu alvo, levando a uma maior toxicidade de Ctx. A Crotoxina exerce atividade pré-sináptica, neurotoxicidade e miotoxicidade sistêmica, resultando na liberação de grandes quantidades de mioglobina nas fibras musculares danificadas (Rangel-Santos *et al.*, 2004).

Diferentemente do VCdt, o veneno de *Bothrops jararacussu* é composto por 25,7% de fosfolipase, sendo considerado o mais miotóxico do gênero *Bothrops*, devido á presença de duas potentes miotoxinas, a bothropstoxina I (BthTx-I) considerada cataliticamente não ativa, ou seja, Lys 49 e a bothropstoxina II (BthTx-II), uma fosfolipase Asp 49 (Gutiérrez *et al.*, 1991), essas fosfolipases induzem edema em modelo experimental de ratos e libera serotonina de mastócitos peritoneais em um modelo in vitro (Landucci et al., 1998).

As diferentes miotoxinas fosfolipásicas A<sub>2</sub> resultam em um padrão similar de alterações morfológicas, independentemente de sua atividade enzimática (Gutiérrez e Ownby, 2003).

## 1.5-Processo inflamatório

O processo inflamatório pode ocorrer de maneira aguda ou crônica. Na inflamação aguda a resposta é rápida, resultando em alterações no fluxo e calibre vasculares, aumento de permeabilidade e migração de células polimorfonucleares, por outro lado, a inflamação crônica ocorre de forma prolongada, caracterizada pela presença de infiltrado de células mononucleares, destruição tecidual e tentativa de cicatrização pela substituição do tecido lesionado por tecido conjuntivo. Há cinco sintomas clínicos clássicos da inflamação aguda: calor, eritema (rubor), edema (tumor), dor e perda de função (Kumar, Abbas, 2003).

A inflamação aguda é composta por 3 eventos principais: alterações no calibre vascular, aumento do fluxo sanguíneo; alterações na microcirculação permitindo que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação para produzir exsudato inflamatório seguido pela migração dos leucócitos da microcirculação e acúmulo no local da lesão (Kumar, Abbas, 2003).

Os mediadores inflamatórios são derivados de proteínas plasmáticas ou secretada por células. Os mediadores podem ser produzidos por macrófagos e mastócitos residentes em tecidos (Medzhitov, 2008), responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios, citocinas como, por exemplo, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas, esses mediadores são responsáveis pela produção do exsudato inflamatório local composto por proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos que predominam durante o período de 6 a 24 horas e depois são substituídos pelos monócitos depois de 24 a 48 horas) que são normalmente encontrados nos vasos sanguíneos e através das vênulas pós-capilares até o local da infecção (Bevilacqua et al., 1989).

No local do tecido lesionado, neutrófilos tornam-se ativados, isso pode ocorrer por contato com agentes patogênicos ou ações de citocinas. A forma de defesa dos neutrófilos ocorre por meio da liberação de conteúdo tóxico dos grânulos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase (Nathan, 2006). O processo inflamatório depende da migração de células do interior das vênulas para o local

da injúria, a microscopia intravital vem sendo amplamente utilizada para caracterizar esse mecanismo durante o processo inflamatório.

O envenenamento botrópico tem como característica um estado inflamatório generalizado, caracterizado por formação de edema e bolhas, hemorragia, lesão de vasos linfáticos e necrose tecidual, algumas dessas características podem ser atribuídas à degradação da matriz extracelular (MEC) (Herrera et al., 2016). O veneno possui ação direta nos componentes da matriz extracelular provocando uma inflamação tecidual, os componentes do veneno responsáveis por isso são as metaloproteinases e as fosfolipases (Rucavado et al., 1998).

Apesar do VCdt apresentar ação miotóxica, estudos mostraram o seu efeito anti-inflamatório em modelo experimental de inflamação induzida por carragenina, mostrando a inibição das interações leucócito-endotélio (Nunes et al. 2010). A crotoxina corresponde a aproximadamente 60% do VCdt e compreende um complexo heterodímero formado por uma fosfolipase A<sup>2</sup> básica (PLA<sup>2</sup>) e enzimaticamente ativa (CB) e um domínio ácido não enzimático chamado crotapotina (CA) (Rangel-Santos et al., 2004). O VCdt e a toxina isolada crotoxina são capazes de modificar a resposta inflamatória crônica induzida pelo BCG onde foi realizado um pré-ou pós-tratamento com crotoxina (da Silva; Sampaio; Gonçalves.,2013).

Como mencionamos anteriormente, a crotoxina é o componente responsável pela ação anti-inflamatória do VCdt, esse efeito envolve a ativação dos receptores de peptídeo formil e a geração endógena de lipoxina, modulando as atividades de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Lima et al., 2012; Nunes et al., 2010; Sampaio et al., 2001).

## 1.6-Processo inflamatório e interação leucócito endotélio.

A microscopia intravital vem sendo utilizada para caracterizar a dinâmica do processo inflamatório, possibilitando a observação de eventos como *rolling*, migração e adesão celular nas vênulas pós-capilares, sendo esse processo realizado *in vivo*.

Células sentinelas teciduais, como mastócitos, macrófagos e células dendríticas (CDs), desempenham um papel importante na detecção dos sinais de perigo e conseqüentemente na liberação de mediadores pró-inflamatórios capazes de ativar o recrutamento de leucócitos (Nourshargh e Alon, 2014). A inflamação aguda inicia-se pelo recrutamento de leucócitos, especialmente neutrófilos. O *rolling*, adesão e migração celular são mediados pela interação com as moléculas de adesão na superfície dos leucócitos e endotélio vascular, interleucinas e mediadores químicos afetam esses processos, modificando a expressão das moléculas de adesão, alterando a movimentação direcional desses leucócitos.

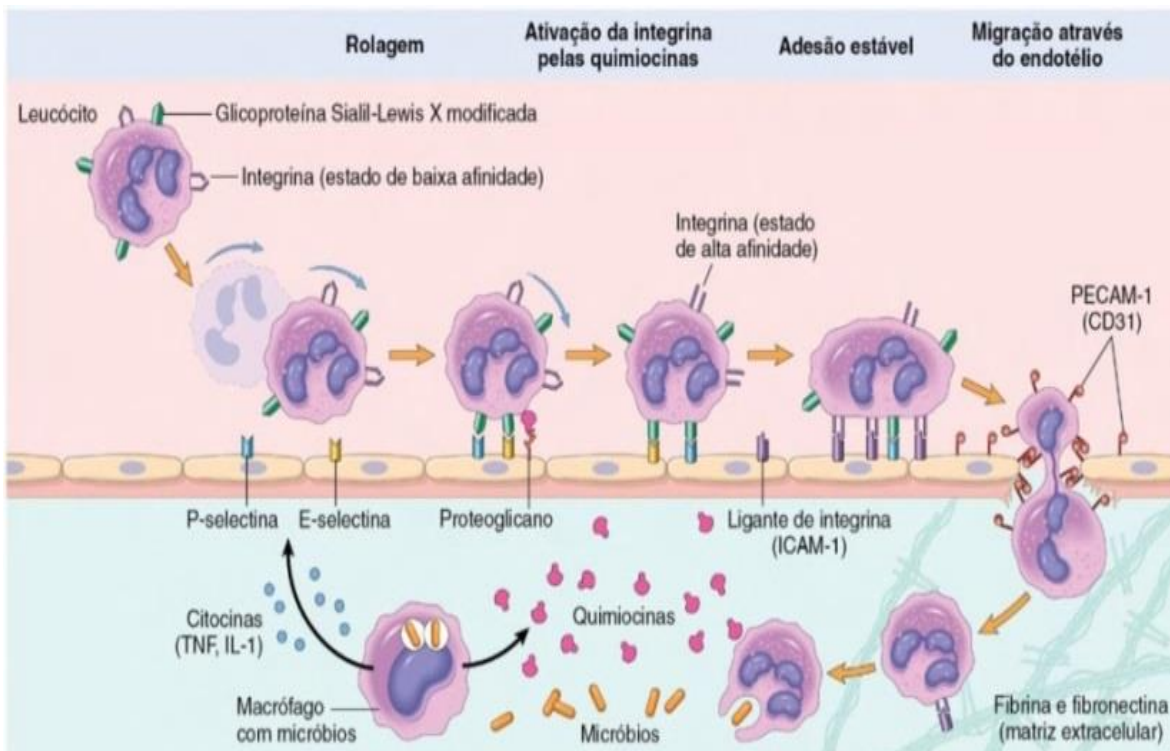
As selectinas são receptores expressos nos leucócitos e no endotélio contendo um domínio extracelular, ligando-se a açúcares; são expressas tanto por leucócitos quanto pelo endotélio e modulando principalmente, o *rolling* de leucócitos. Os três membros dessa família são denominadas de P-selectina (presente no endotélio e nas plaquetas), E-selectina (expressa nas células endoteliais) e L-selectina (presente na superfície dos leucócitos) (Newton e Dixit, 2012) essas selectinas se ligam a oligossacarídeos contendo sialil através do domínio de lecitina (Kumar *et al.*, 2005).

Após o *rolling* dos leucócitos devido à interação com as selectinas, estes se aderem ao endotélio, em uma interação mediada pelas integrinas. As integrinas que são proteínas heterodiméricas, compostas por duas subunidades ou cadeias denominadas alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), normalmente expressas nas membranas plasmáticas dos leucócitos em estado de baixa afinidade e apenas aderem a seus ligantes apropriados quando os leucócitos são ativados por quimiocinas, alterando as integrinas para o estado de alta afinidade (Kourtzelis *et al.*, 2017). Algumas citocinas como (fator de necrose tumoral alfa) TNF- $\alpha$  e a (interleucina 1 beta) IL-1 $\beta$  são capazes de ativar as células endoteliais, aumento

a expressão de ligantes para integrinas. De acordo com Walcheck et al. (1996) os leucócitos em *rolling* podem interagir através da ligação de L-selectina leucocitária à PSGL-1 (p-selectina glicoproteína ligante 1).

Os membros da família das integrinas que medeiam interações endoteliais de leucócitos são as integrinas  $\beta 2$  LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ; CD11a / CD18), Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ; CD11b / CD18) e a integrina  $\beta 1$  VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ; CD49d / CD29) (Kourtzelis et al., 2017). Ligantes como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1), se ligam a integrina LFA-1 (CD11a/CD18), está envolvida da adesão de neutrófilos ao endotélio, enquanto a ligação de VCAM-1 (molécula de adesão vascular 1), que se liga a integrina VLA-4 está envolvida na adesão de monócitos ao endotélio (Sriramarao e Broide, 1996; Zarbock et al., 2008).

Por fim ocorre a migração, por mediação das quimiocinas, com a participação da PECAM-1 (Molécula de aderência plaquetária), uma molécula de adesão celular expressa em leucócitos e células endoteliais, contribui para a migração dos leucócitos através das junções interendoteliais, após a passagem pelo endotélio os leucócitos secretam colagenases, degradando a membrana basal vascular, atravessando o vaso.



**Figura 3.** Etapas do processo de rolling, adesão e migração leucocitária dos vasos sanguíneos (Fonte: Robbins e Cotran, 2005. Livro: Bases patológicas das doenças; pag.55).

As primeiras células a migrarem para o foco inflamatório são os leucócitos polimorfonucleares, particularmente os neutrófilos, os leucócitos migram nos tecidos em direção ao local da lesão por um processo chamado de quimiotaxia (Kumar *et al.*,2005), durante o processo inflamatório os neutrófilos se tornam ativados liberando a mieloperoxidase (MPO), essas peroxidases são enzimas que responsáveis por catalisar reações de oxidação envolvendo peróxido de hidrogênio, atuando com a NADPH oxidase de membrana dos neutrófilos, além de ter envolvimento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Arnhold, 2004), aumentando a sua longevidade por um período mais extenso, para garantir a sua presença no local da inflamação (Kolaczowska e Kubes, 2013).

Após o período inicial da inflamação aguda, monócitos migram para o local da lesão, onde se diferenciam em células dendríticas e macrófagos. Macrófagos são células residentes no tecido do sistema imune inato. Depois de iniciada a diapedese, os macrófagos tornam-se as células predominantes, normalmente 24 horas após o início da lesão (Kumar *et al.*, 2005). A secreção de isoenzimas N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) é normalmente utilizada como biomarcadora precoce da disfunção renal e como indicador do acúmulo de macrófagos ativados.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

Assim, tendo em vista as marcantes diferenças de atividades dos venenos de *B. jararacussu* e *C. durissus terrificus*, sendo o VBjussu inflamatório e miotóxico enquanto o VCdt apresenta atividades miotóxica e ação anti-inflamatória em alguns modelos experimentais, o objetivo desse trabalho foi comparar e caracterizar a resposta inflamatória local após o envenenamento por Bjussu e Cdt

#### **Para tanto, os seguintes parâmetros foram investigados:**

- 1- Quantificação bioquímica de indicadores de lesão tecidual tais como, creatinoquinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH).
- 2- Avaliar o efeito do envenenamento sobre o músculo gastrocnêmio, nos períodos de 4, 24, 48 e 72 horas após o envenenamento analisando as alterações morfológicas e lesão na musculatura esquelética.
- 3- Quantificação bioquímica de componentes celulares do infiltrado inflamatório tais como, mieloperoxidase (MPO) e *N-Acetil-β-D-Glucosaminidase* (NAG) no músculo gastrocnêmio.
- 4- Avaliar por meio da microscopia intravital a dinâmica do processo inflamatório e a interação leucócito endotélio, 2 e 24 após o envenenamento no músculo cremaster ou no mesentério.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

**3.1- Animais:** Foram utilizados camundongos swiss machos de diferentes pesos, pesando entre 25 g e 30g para realização da microscopia intravital e entre 18 g e 22g para os demais experimentos, os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan (N=5 animais por grupo experimental). Os animais foram mantidos no Biotério do laboratório, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – Protocolo n° 1614071216)

**3.2- Veneno:** No presente trabalho utilizamos pools liofilizados, resultantes da extração de vários exemplares adultos de serpentes *Bothrops jararacussu* (VBjssu) ou *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. As soluções de veneno foram preparadas com salina (NaCl 0.15 M) estéril no momento do uso.

**3.3- Envenenamento experimental no músculo gastrocnêmio:** Os camundongos foram submetidos à tricotomia da área correspondente ao músculo gastrocnêmio direito e assepsia do local com álcool iodado 2%. Em seguida, foi realizada a inoculação intramuscular de doses subletais do veneno de *Bothrops jararacussu* (40µg/40µL, i.m), essa dose foi determinada por estudos anteriores (Zeni et al., 2008) e testes preliminares foram realizados para avaliar a atividade do veneno de *Bothrops jararacussu*, a dose do veneno de *Crotalus terrificus durissus* (6µg/40 µL, i.m), foi determinada por meio de diferentes doses avaliando a evolução do envenenamento e a sobrevivência dos animais. O veneno foi injetado na área correspondente ao terço central do músculo gastrocnêmio direito. Animais controle receberam o mesmo volume de salina estéril (40µL) As coletas dos tecidos foram realizadas 4, 24, 48 ou 72 horas, após o envenenamento.

**3.4- Quantificações de CK sérica e residual, Desidrogenase láctica (LDH), mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil-β-D-Glucosaminidase (NAG):** Após a realização da eutanásia, ocorreu a extração dos tecidos de forma cirúrgica, coletando os músculos gastrocnêmios das duas patas posteriores de todos os

animais. As amostras de músculos foram pesadas e homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato 10mM pH 7,4 com de EDTA (tampão salina EDTA-fosfato de sódio-HCl- na proporção de 1:10) para dosagem de CK e LDH residuais, além dos níveis de mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG). Os músculos gastrocnêmios foram homogeneizados em 1ml de tampão salina fosfato (PBS), pH 7.4, utilizando um homogeneizador (Polytron PT- 10-35) por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos, coletando o sobrenadante para posterior quantificação. A dosagem de proteínas do homogenato de músculo foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

**3.4.1-Quantificação de mieloperoxidase (MPO):** Descrito por Bailey, (1988) com adaptações, para cada 200  $\mu$ l da amostra do sobrenadante no homogenato de músculos, foram adicionados 200  $\mu$ l de Brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) com a concentração de 0,5 % depois as suspensões foram sonificadas por 20 segundos, congeladas com gelo seco e descongeladas 4 vezes em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos na velocidade de 10.000 g, a 4°C. A atividade de MPO foi avaliada por meio da mistura de 25  $\mu$ l do sobrenadante a partir do processamento da amostra de tecido na microplaca de 96 poços (Steriler), foi acrescentado 25  $\mu$ l de 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina 1,6 (TMB sigma) preparada em dimetilsulfoxido (DMSO,Merck) 1,6 Mm Incubada por 5 minutos a 37°C depois foi adicionada 25  $\mu$ l 0,003% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mais 5 minutos de incubação e por fim foi adicionada 100  $\mu$ l da solução bloqueio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) com a leitura colorimétrica a 450 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos por DO/mg de proteína do homogenato de músculo.

**3.4.2-Quantificação de N-Acetil- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG):** Descrito por Bailey (1988) com adaptações, para cada 100  $\mu$ l de sobrenadante coletado, foi adicionado 100  $\mu$ l solução de NaCl (0.9%) contendo Triton X-100 a 0.1% e centrifugados a 10.000 x g, por 10 minutos a 4°C. A quantificação dos níveis da enzima lisossomal NAG foi medida por meio da mistura de 25  $\mu$ l de amostra, com 25  $\mu$ l de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -d-glucosaminida 2.24 mM (sigma), preparado em tampão fosfato 0,1 M Ph 4,5 adicionados na placa de 96 poços, com um período de incubação de 10 minutos, o bloqueio foi feito por meio da adição de

100 µl de tampão glicina 0.2 M e Ph 10,6 e a hidrólise do substrato foi determinada medindo a cor a 405 nm e a atividade expressa como mudança na DO/ mg de proteína do homogenato de músculo.

**3.4.3-Quantificação de Creatinoquinase residual (CK):** A dosagem da enzima creatinoquinase ocorreu através do kit diagnóstico (Lab-test CK-NAC). A lesão muscular foi detectada pela dosagem de CK no músculo gastrocnêmico. O valor de CK foi expresso em unidades/ litro (U/L), cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 µm de NADH por minuto. Para análise do CK residual foi feita uma relação entre a atividade de CK no músculo injetado com PBS (40 µl)- considerada 100% (grupo controle) comparada com o músculo envenenado do músculo contralateral também em porcentagem. Desta relação obteve-se o percentual de CK residual presente no músculo.

**3.4.4-Quantificação de CK sérica:** A dosagem foi feita através do kit diagnóstico (LabTest CK-NAC).A instalação da lesão muscular foi verificada pela dosagem de CK sérica.Os camundongos foram injetados no músculo gastrocnêmio (GA) com 40 µg/40 µl de veneno de *Bothrops jararacussu* ou 6µg/µl do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e após 3 horas foi efetuado a coleta de sangue por punção retro orbital. O valor de CK sérico está expresso em unidades/litro (U/L) sendo que cada unidade é definida como quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 µmol de NADH por minuto a 25°C.

**3.4.5-Quantificação lactato desidrogenase (LDH):** A quantificação da enzima lactato desidrogenase residual, foi feita por meio da adição do homogenato diluído com 1 ml de tampão fosfato do músculo na placa de 96 poços (5 µl) em seguida foi adicionado 200 µl por poço da solução de uso composta por β-NADH 170 µM previamente aquecida a 37°C. A cinética de leitura ocorreu utilizando filtro 339 nm e a leitura feita no espectrofotômetro durante o período de 0, 1, 2, 3, 4 minutos. Para o cálculo final foram utilizadas as leituras de 3 minutos e 1 minuto. O valor de LDH residual foi expresso em unidades/ litro (U/L), cada unidade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 µm de NADH por minuto. O valor encontrado foi normalizado pelo peso do

respectivo músculo. Para a análise do LDH residual foi feita uma relação entre a atividade de LDH na pata injetada com PBS (40 µl)- considerada 100%- com a pata do músculo envenenado em cada animal. Desta relação obteve-se o percentual de LDH residual expresso no resultado.

**3.5- Análise histológica:** Após a dissecação os músculos gastrocnêmios foram coletados lavados em solução salina 0,9% e transferidos para cassetes permanecendo por 24 horas em fixador composto de paraformaldeído 4% e em tampão Millonig 0,1M (pH 7,2-7,4). A análise histológica foi realizada por meio da inclusão do músculo em parafina. Cortes de 5 µm corados por H&E foram analisados sob microscópio de luz. Nos tempos de 4 a 72h. As imagens foram capturadas em fotomicroscópio (Leica Microsystems DM).

**3.6.1-Microscopia intravital no músculo cremaster:** A Interação Leucócito-Endotélio foi avaliada por ensaios de microscopia intravital. O veneno de *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* ou solução salina 0,9% (1µg/100 µl) foi injetado no subcutâneo da bolsa escrotal e o leito vascular do músculo cremaster foi preparado 2 ou 24 horas após. Camundongos foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg). O cremaster foi exteriorizado e montado sobre uma placa com temperatura controlada (37°C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular foi visualizado (Baez, 1973). A preparação foi analisada em um microscópio (Olympus BX51WI) com uma objetiva 20x e acoplado a uma câmera para captação de imagens (Hamamatsu, Orca R2). As imagens foram transmitidas para um software de análise de imagens. A preparação permaneceu mantida úmida e aquecida por irrigação com solução PBS (phosphate buffered saline, 0.15 M, pH 7.4, 37°C). Os leucócitos foram avaliados em estado *rolling*, aderentes e migrados. Os leucócitos *rolling* foram contados durante um período de 3 min, 10 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo dos 100 µm do vaso. Os leucócitos emigrados foram avaliados pela contagem das células presentes em uma distância de até 50 µm de cada lado do mesmo segmento vascular de 100 µm.

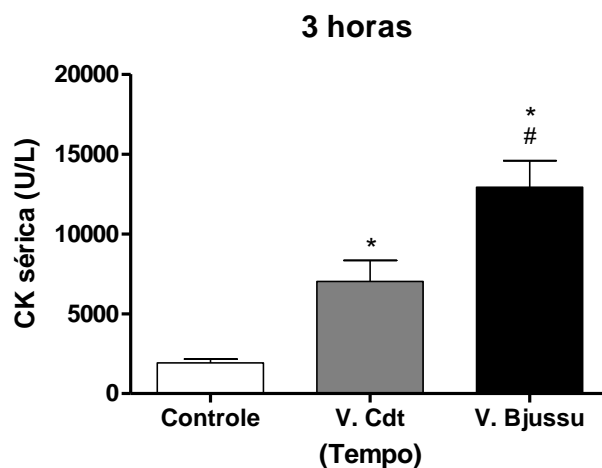
**3.6.2-Microscopia intravital no mesentério:** A Interação Leucócito-Endotélio foi avaliada no tecido conjuntivo. O veneno de *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* (5µg/ 500 µl) ou solução salina (0,9%) foi injetado na cavidade abdominal e o mesentério foi exposto 2 horas após a injeção. Os camundongos foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e aproximadamente 10 minutos antes da realização da laparotomia mediana, receberam 100 µl de rodamina 6G, um marcador fluorescente de leucócitos (Sigma, 1mg/ml) pelo sinus retro-orbital, sendo essa região previamente anestesiada. O mesentério foi exteriorizado com temperatura controlada (37°C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular foi visualizado (Herr et al., 2015). A preparação foi analisada em um microscópio (Olympus BX51WI) com uma objetiva 20x com o filtro TxRed e acoplado a uma câmera para captação de imagens (Hamamatsu, Orca R2). As imagens foram transmitidas para um software de análise de imagens. A preparação permaneceu mantida úmida e aquecida por irrigação com solução PBS (phosphate buffered saline, 0.15 M, pH 7.4, 37°C). Os leucócitos foram avaliados em estado *rolling* e aderência, na região do mesentério, não foi possível a visualização de leucócitos migrados. Os leucócitos *rolling* foram contados durante um período de 1 min, 10 min após a exposição da microcirculação. Os leucócitos aderidos foram contados ao longo dos 100-150 µm do vaso. A preparação foi analisada em um microscópio (Zeiss Axioskop) com uma objetiva 10x e acoplado a uma câmera para captação de imagens (JVC TK-C600) e as imagens transmitidas a um computador provido de um programa de análise de imagens (Kontron, KS300).

**3.7- Análise Estatística:** Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e analisados estatisticamente o teste de análise de variância de uma via (ANOVA), quando apropriado utilizou-se o pós-teste de Bonferroni para comparação dos grupos. Foram considerados significantes os resultados com  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1-Efeito miotóxico dos venenos sobre CK sérica

Os níveis elevados da enzima creatinoquinase sinalizam a instalação de uma lesão muscular. Como pode ser observada, a atividade enzimática de CK sérica foi expressa em ambos os venenos. Os nossos resultados também mostraram que o VBjussu expressou maior atividade enzimática na corrente sanguínea em comparação ao VCdt (Figura 4).



**Figura 4. Mionecrose induzida pelo envenenamento por *Bothrops jararacussu* ou *Crotalus durissus terrificus*.** O dano muscular foi avaliado medindo-se os níveis de Creatinoquinase (CK) no soro 3 horas após a injeção intramuscular do veneno de *Bothrops jararacussu* (40µg/40µl) ou *Crotalus durissus terrificus* (6µg/40µl) no músculo gastrocnêmio direito de camundongos, o grupo controle recebeu solução salina no músculo contralateral. Os dados são expressos como média ± e.p.m. P<0,05.\*P em relação ao grupo controle e #P em relação ao grupo VCdt. Os resultados correspondem a média± SEM de 5 animais.

### 4.2-Quantificação bioquímica de indicadores de lesão tecidual

#### 4.2.1- Efeito miotóxico do veneno no músculo gastrocnêmio

Os valores de creatinoquinase (CK) residual indicam a instalação da lesão muscular local devido à quantificação de CK residual, restante no músculo após o envenenamento em comparação ao músculo contralateral. Os resultados

mostraram que essa enzima foi encontra-se em maior quantidade 72 horas após o envenenamento por VBjussu (Figura 5).

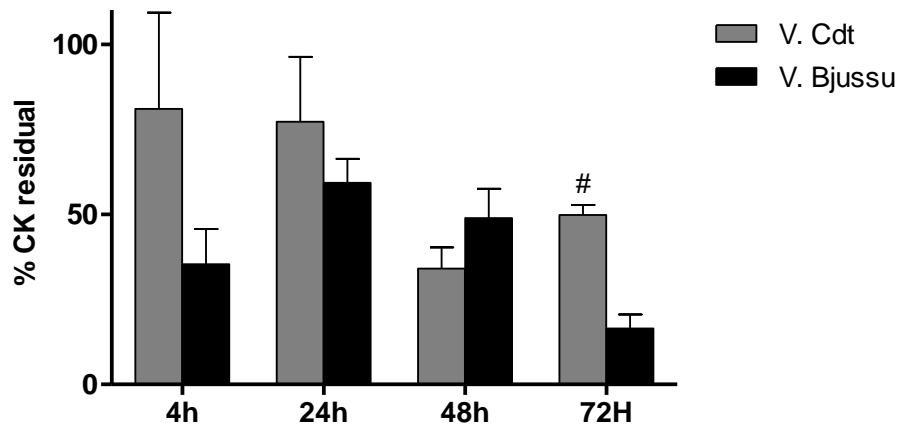
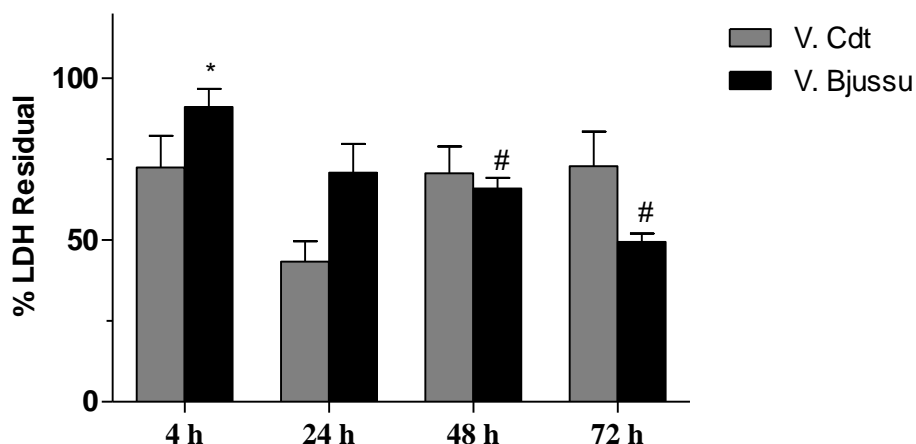


Figura 5- Mionecrose induzida pelo envenenamento por *Bothrops jararacussu* ou *Crotalus durissus terrificus*. O dano muscular foi avaliado medindo-se os níveis de Creatinoquinase (CK) no músculo gastrocnêmico 4, 24, 48 e 72 horas após a injeção intramuscular do veneno de *Bothrops jararacussu* (40µg/40µl) ou *Crotalus durissus terrificus* (6µg/40µl), o grupo controle recebeu solução salina no músculo contralateral. Os dados são expressos como média ± e.p.m. P<0,05.\*P em relação ao grupo controle e #P em relação ao grupo VBjussu. Os resultados correspondem à média± SEM de 5 animais.

#### 4.2.2-Efeito do envenenamento sobre a atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) no músculo gastrocnêmico

A figura 6 representa a quantificação da enzima lactato desidrogenase residual no músculo gastrocnêmio, sendo essa enzima indicadora de lesão tecidual, os nossos resultados mostram que 48 e 72 horas após o envenenamento, o grupo VCdt manteve uma maior quantidade de LDH no músculo gastrocnêmio em comparação ao VBjussu.

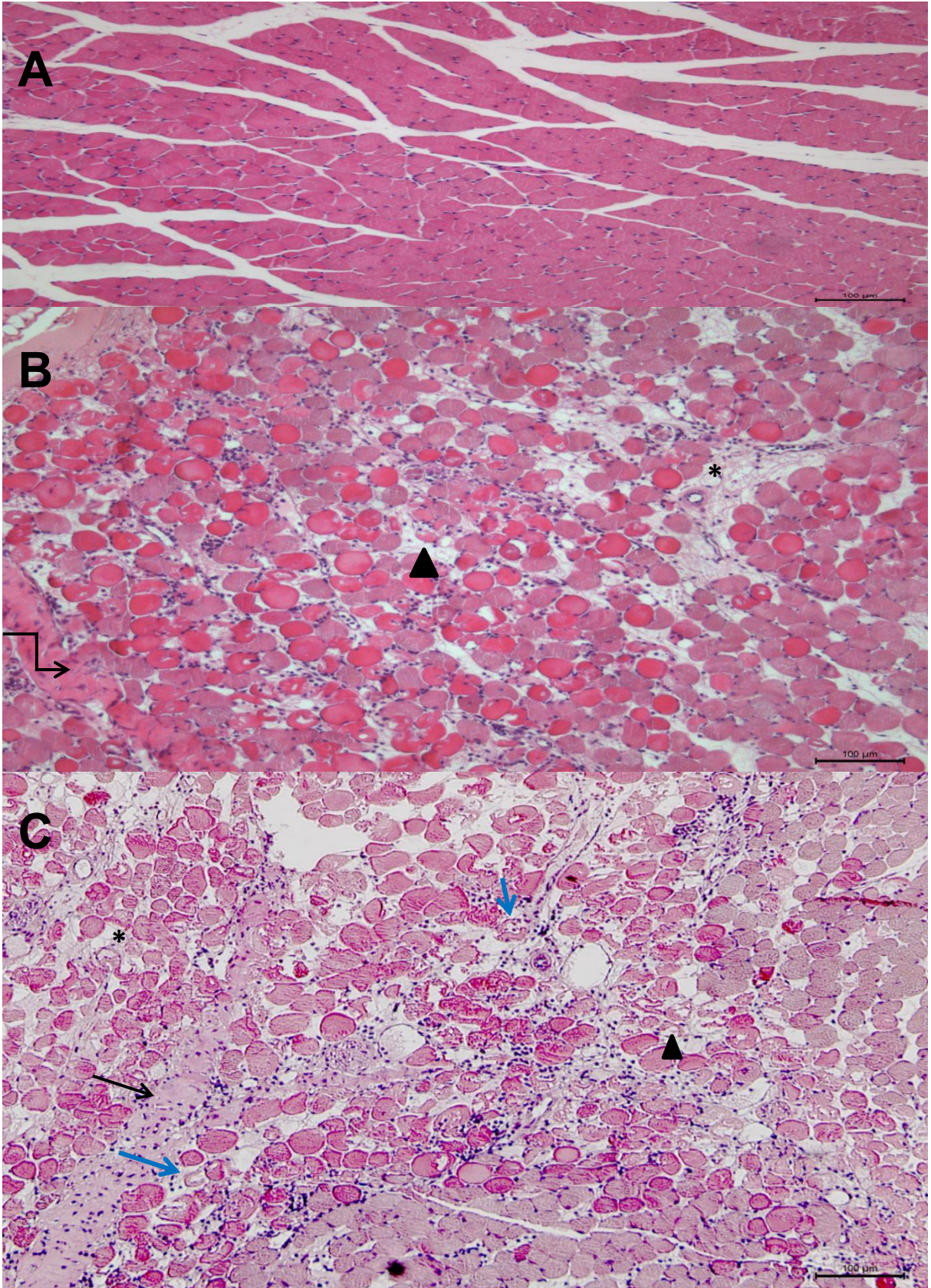




**Figura 6.** Efeito do envenenamento sobre a atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) no músculo gastrocnêmio de camundongos, induzido pelos venenos de *Bothrops jararacussu* (40µg) ou *Crotalus durissus terrificus* (6µg) durante o período de 4, 24, 48 e 72 horas, o grupo controle recebeu solução salina no músculo contralateral. Os dados são expressos como média ± e.p.m.  $P < 0,05$ . \*P em relação ao grupo controle e #P em relação ao diferente VCdt . Os resultados correspondem à média ± SEM de 5 animais.

#### **4.3.1- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida por VCdt ou VBjussu 4 horas após o envenenamento.**

Os cortes histológicos do músculo gastrocnêmico confirmam que o músculo foi severamente danificado. As imagens apresentadas na figura 7 mostram os efeitos dos venenos 4 horas após a injeção no músculo gastrocnêmio, notamos no grupo controle (figura 7A) as fibras intactas, sem a presença de células inflamatórias enquanto no VCdt (figura 7B) observa-se desorganização e ruptura dos feixes musculares e uma leve presença de infiltrado inflamatório. Sobre o VBjussu (figura 7C) observamos um aumento no espaçamento e ruptura das fibras musculares, perda dos feixes das fibras musculares causando inchaço dessas fibras, presença de edema, infiltrado inflamatório moderado e lesão delta.

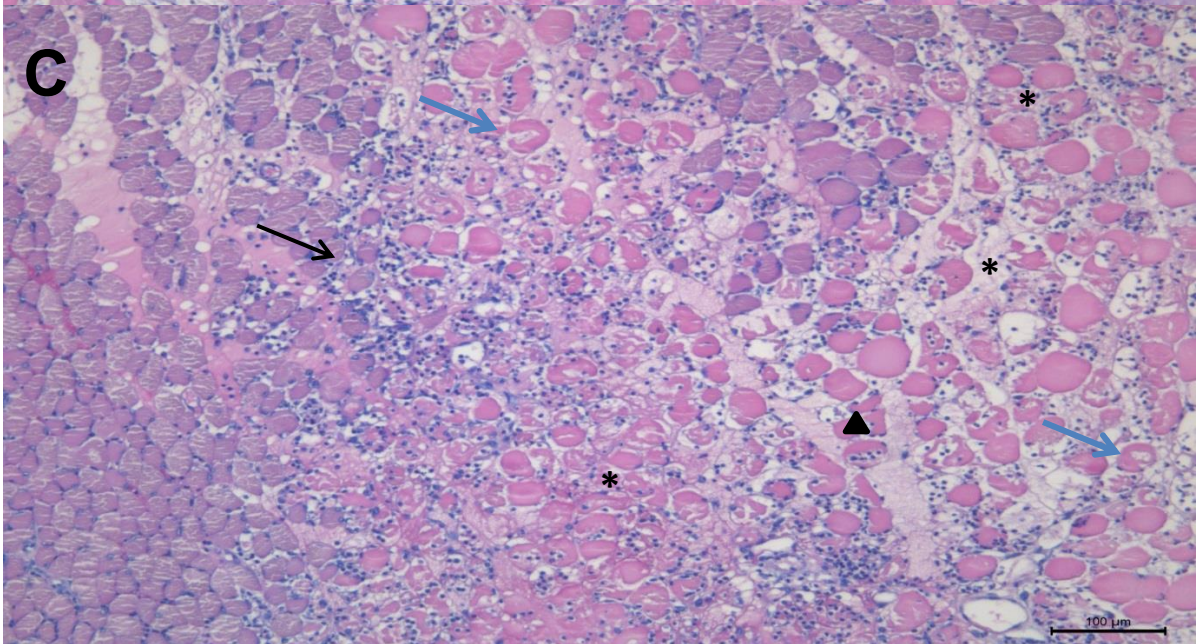
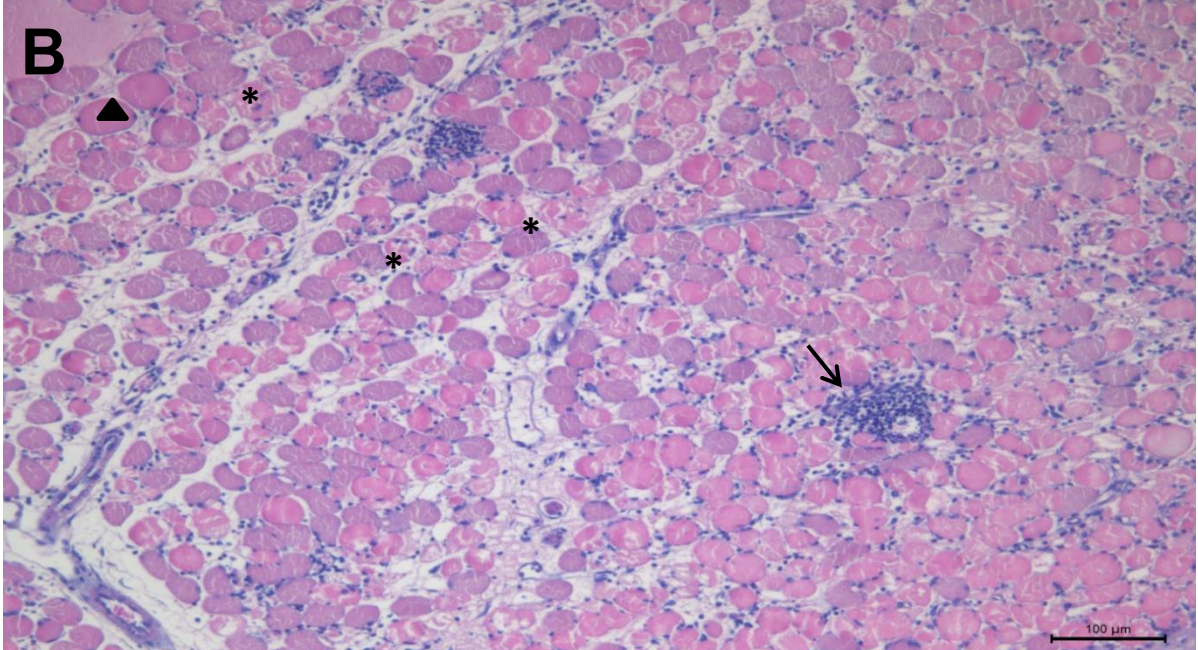
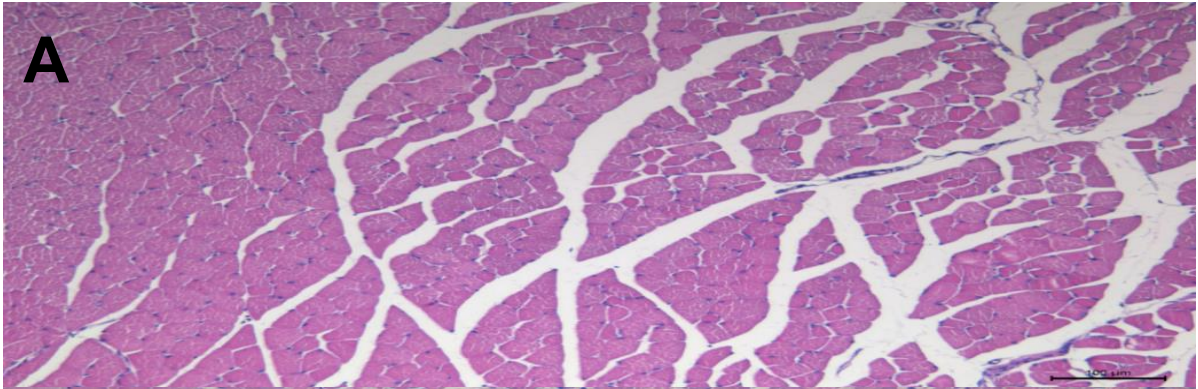


**Figura 7- Morfologia da lesão no músculo gastrocnêmio. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos 4 horas após a injeção intramuscular de veneno de *Bothrops jararacussu* ou *Crotalus durissus terrificus*.** Os grupos envenenados foram comparados com o grupo que recebeu solução salina (controle) no músculo contralateral, para mostrar o processo inflamatório e seus respectivos eventos. As imagens referem-se aos grupos controle (A), VCdt (B) e VBjussu (C) com aumento de 10x. Escala de 100 µm caracterizada por mionecrose (asterisco), infiltrado inflamatório (seta), ruptura das fibras musculares (triângulo) e presença de lesão delta (seta azul).

#### **4.3.2- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida por VCdt ou VBjussu 24 horas após o envenenamento.**

Nas figuras 8B e 8C observa-se um infiltrado inflamatório elevado em ambos os grupos, maior destruição das fibras musculares, intensa mionecrose. Maior espaçamento entre os perimísios e alteração no tamanho das fibras musculares. As imagens apresentadas na figura 8C nota-se a presença de edema, inchaço das fibras musculares e lesão delta, enquanto na figura B fica evidente alterações com distorções nas fibras musculares, presença de mionecrose.



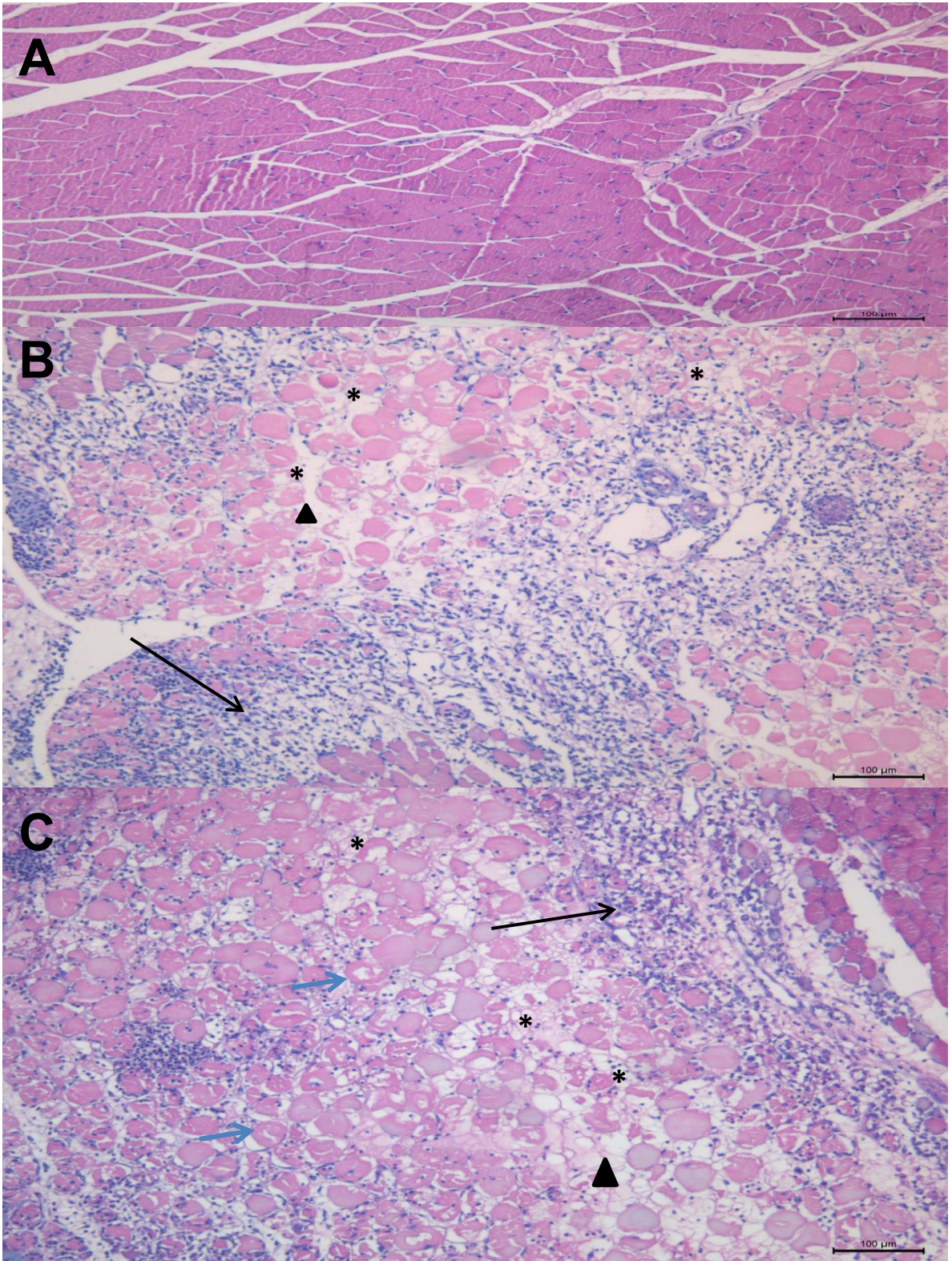


**Figura 8. Morfologia da lesão no músculo gastrocnêmico. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos 24 horas após a injeção intramuscular de veneno de *Bothrops jararacussu* ou *Crotalus durissus terrificus*.** Os grupos envenenados foram comparados com o grupo que recebeu solução salina (controle) no músculo contralateral, para mostrar o processo inflamatório e seus respectivos eventos. As imagens referem-se aos grupos controle (A), VCdt (B) e VBjussu (C) com aumento de 10x. Escala de 100 µm caracterizada por mionecrose (asterisco), infiltrado inflamatório (seta), ruptura das fibras musculares (triângulo) e presença de lesão delta (seta azul).

#### **4.3.3- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida por VCdt ou VBjussu 48 horas após o envenenamento**

Na figura 9, a imagem retrata as alterações que ocorreram no músculo esquelético 48 horas após o envenenamento. Observa-se um infiltrado celular demasiado composto por células mononucleares em ambos os venenos e abundante inchaço e distorção das fibras musculares.



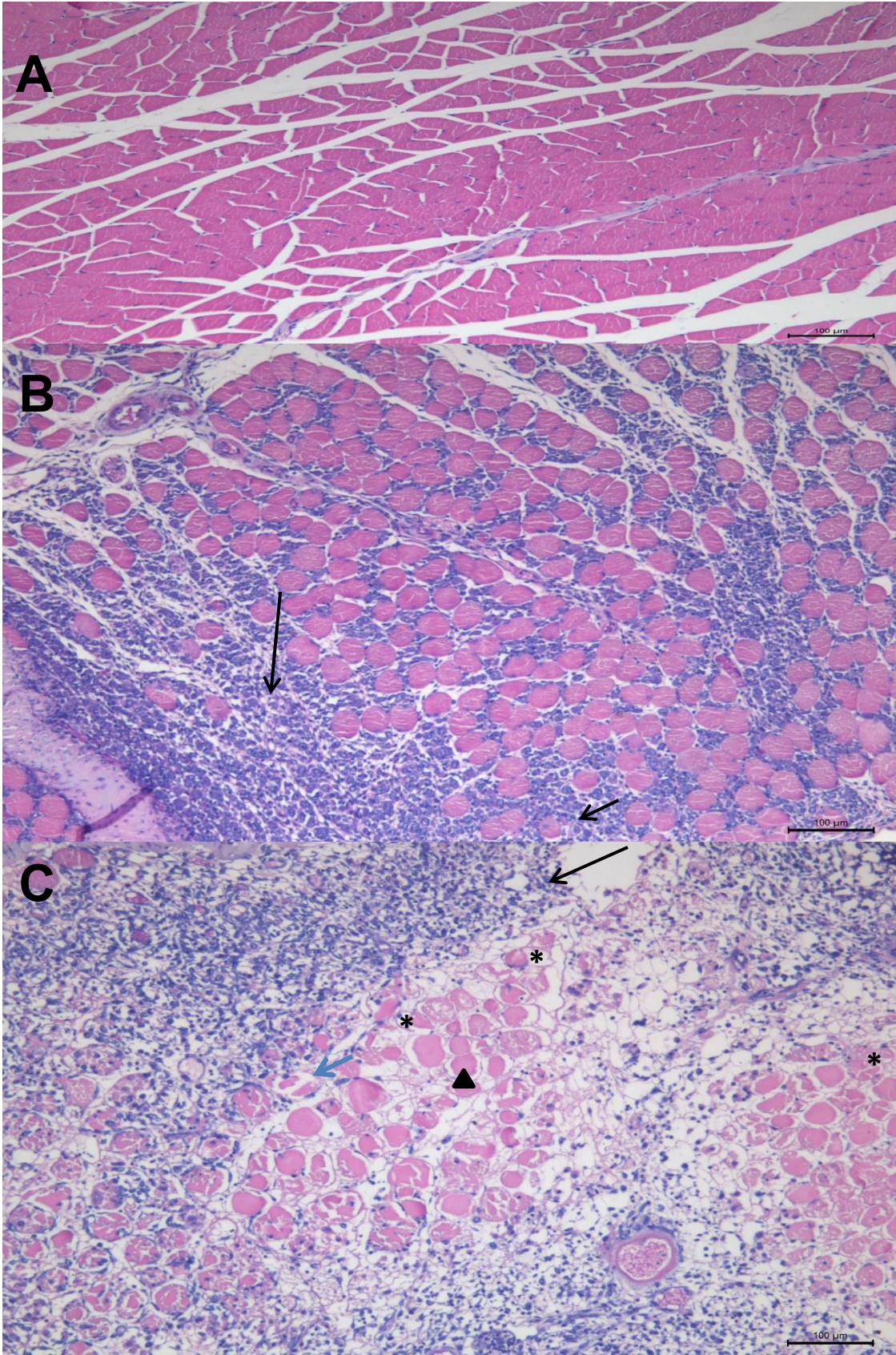


**Figura 9- Morfologia da lesão no músculo gastrocnêmico. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos 48 horas após a injeção intramuscular de veneno de *Bothrops jararacussu* ou *Crotalus durissus terrificus*.** Os grupos envenenados foram comparados com o grupo que recebeu solução salina (controle) no músculo contralateral, para mostrar o processo inflamatório e seus respectivos eventos. As imagens referem-se aos grupos controle (A), VCdt (B) e VBjussu (C) com aumento de 10x. Escala de 100 µm caracterizada por mionecrose (asterisco), infiltrado inflamatório (seta), ruptura das fibras musculares (triângulo) e presença de lesão delta (seta azul).

#### **4.3.4- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida por VCdt ou VBjussu 72 horas após o envenenamento.**

Na figura 10 observa-se infiltrado inflamatório exacerbado principalmente no grupo VBjussu (10C) composto por células polimorfonucleares, forte mionecrose, destruição tecidual e edema elevado. Na imagem 10B notamos o infiltrado inflamatório entre as fibras musculares.







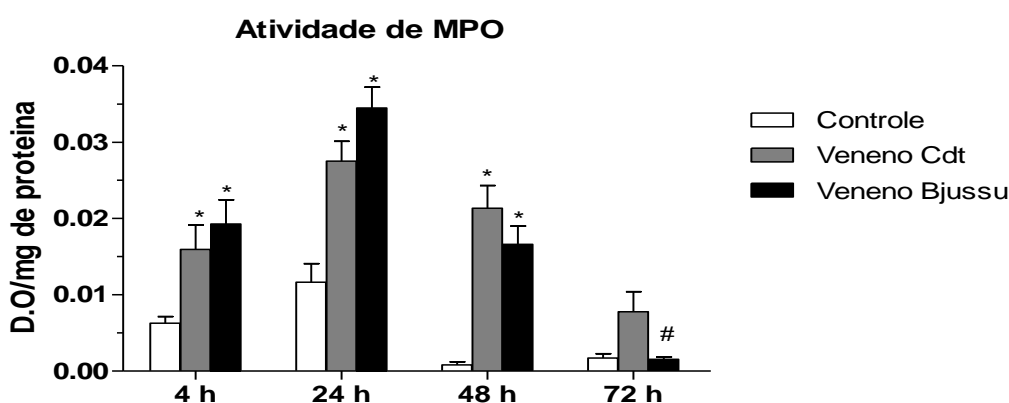
**Figura 10- Morfologia da lesão no músculo gastrocnêmico. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos 72 horas após a injeção intramuscular de veneno de *Bothrops jararacussu* ou *Crotalus durissus terrificus*.** Os grupos envenenados foram comparados com o grupo que recebeu solução salina (controle) no músculo contralateral, para mostrar o processo inflamatório e seus respectivos eventos. As imagens referem-se aos grupos controle (A), VCdt (B) e VBjussu (C) com aumento de 10x. Escala de 100 µm caracterizada por mionecrose (asterisco), infiltrado inflamatório (seta), ruptura das fibras musculares (triângulo).

#### 4.4-Quantificação bioquímica de componentes do infiltrado inflamatório.

##### 4.4.1-Efeito dos venenos sobre o recrutamento de células polimorfonucleares no músculo gastrocnêmio.

A figura 11 representa a atividade enzimática de MPO, sendo essa diretamente proporcional ao número de células polimorfonucleares (PMNs) ativadas, principalmente, neutrófilos presentes em tecidos inflamados (Pulli et al., 2013). A quantificação ocorre de maneira indireta através da atividade enzimática de MPO (mieloperoxidase) após a injeção intramuscular de veneno (Cdt ou Bjussu) ou solução salina (na pata contralateral) no gastrocnêmio.

O aumento da atividade enzimática de MPO foi mais elevada que o grupo controle 4 horas após o envenenamento em ambos os venenos (VBjussu e VCd), atingindo seu pico máximo no período de 24 horas. Por outro lado, 72 horas após o envenenamento o VCdt apresentou maior atividade enzimática de MPO quando comparado com o VBjussu.



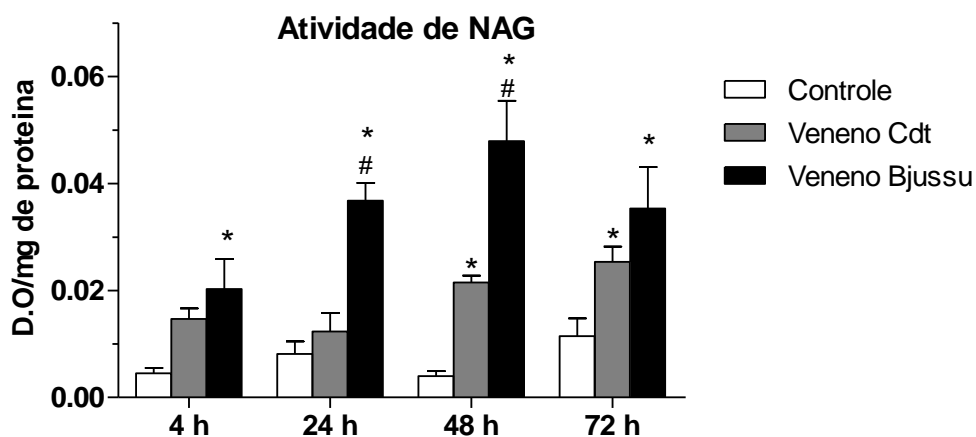
**Figura 11- Efeito do envenenamento sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no músculo gastrocnêmio.** Os grupos consistiram de animais do grupo controle, grupo sham que receberam

salina na pata contralateral e grupo envenenado que consiste na injeção do veneno de *Bothrops jararacussu* (40µg) ou *Crotalus durissus terrificus* (6µg) de forma intramuscular no gastrocnêmio e a coleta realizada após o período de 4, 24, 48 ou 72 horas. Os dados são expressos como média ± e.p.m. P<0,05.\*P em relação ao grupo controle e #P em relação ao grupo VCdt. Os resultados correspondem à média± SEM de 5 animais.

#### 4.4.2- Efeito dos venenos sobre o recrutamento de células mononucleares no músculo gastrocnêmio.

A figura 12 representa os dados obtidos da quantificação de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) sendo essa diretamente proporcional ao acúmulo de macrófagos ativados encontrados no tecido inflamado. A quantificação foi realizada através da quantificação da enzima NAG após a injeção intramuscular dos venenos (Cdt ou Bjussu) no gastrocnêmio e solução salina na pata contralateral.

O envenenamento por Bjussu resultou no aumento de NAG nos períodos 4, 24, 48 horas após o envenenamento. Atingindo seu pico máximo de atividade enzimática no período de 48 horas, enquanto o VCdt apresentou atividade de NAG apenas nos períodos finais de 48 e 72 horas, essa atividade foi menos expressa em comparação ao grupo VBjussu 48 horas após o envenenamento.



**Figura 12 - Efeito do envenenamento sobre a atividade da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) no músculo gastrocnêmio.** Os grupos consistiram de animais do grupo controle, grupo sham que receberam salina na pata contralateral e grupo envenenado que consiste na injeção do veneno de *Bothrops jararacussu* (40µg) ou *Crotalus durissus terrificus* (6µg) de forma intramuscular no gastrocnêmio e a coleta realizada após o período de 4, 24, 48 ou 72 horas. Os dados são expressos como média ± E.P.M. P<0,05.\*P em relação ao grupo controle e #P em relação ao diferente grupo VCdt. Os resultados correspondem à média± SEM de 5 animais.

#### **4.5-Efeito do envenenamento sobre a interação leucócito-endotélio em ensaios de microscopia intravital.**

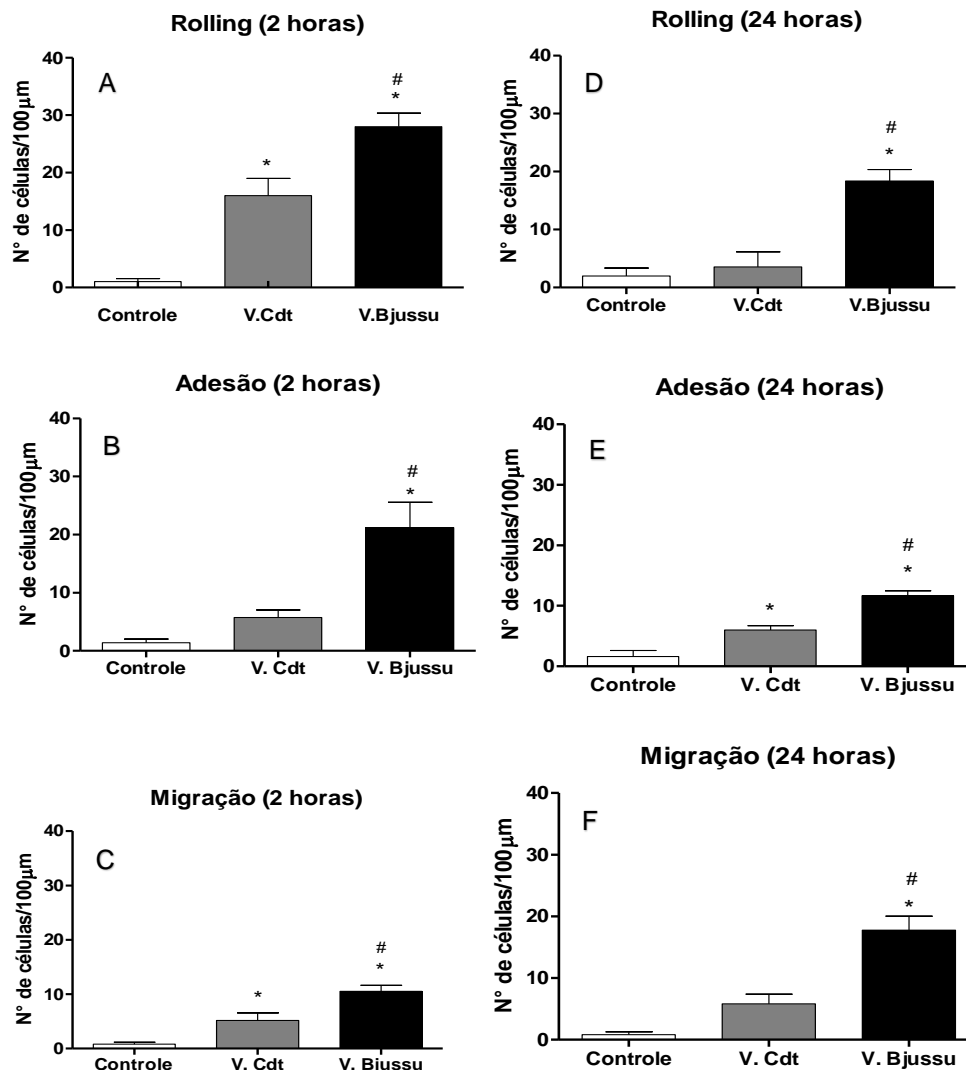
##### **4.5.1- Interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares na microcirculação do músculo cremaster.**

A microscopia intravital tem como objetivo mostrar a dinâmica da inflamação por meio da interação leucócito endotélio, principalmente na musculatura esquelética, lembrando que os dois venenos utilizados no presente estudo são miotóxicos.

Os dados obtidos indicam que no período de 2 e 24 horas, o envenenamento foi capaz de aumentar o *rolling* celular em ambos os grupos envenenados, entretanto, a quantidade de leucócitos em *rolling* foi maior no grupo VBjussu (Figura 13A e D).

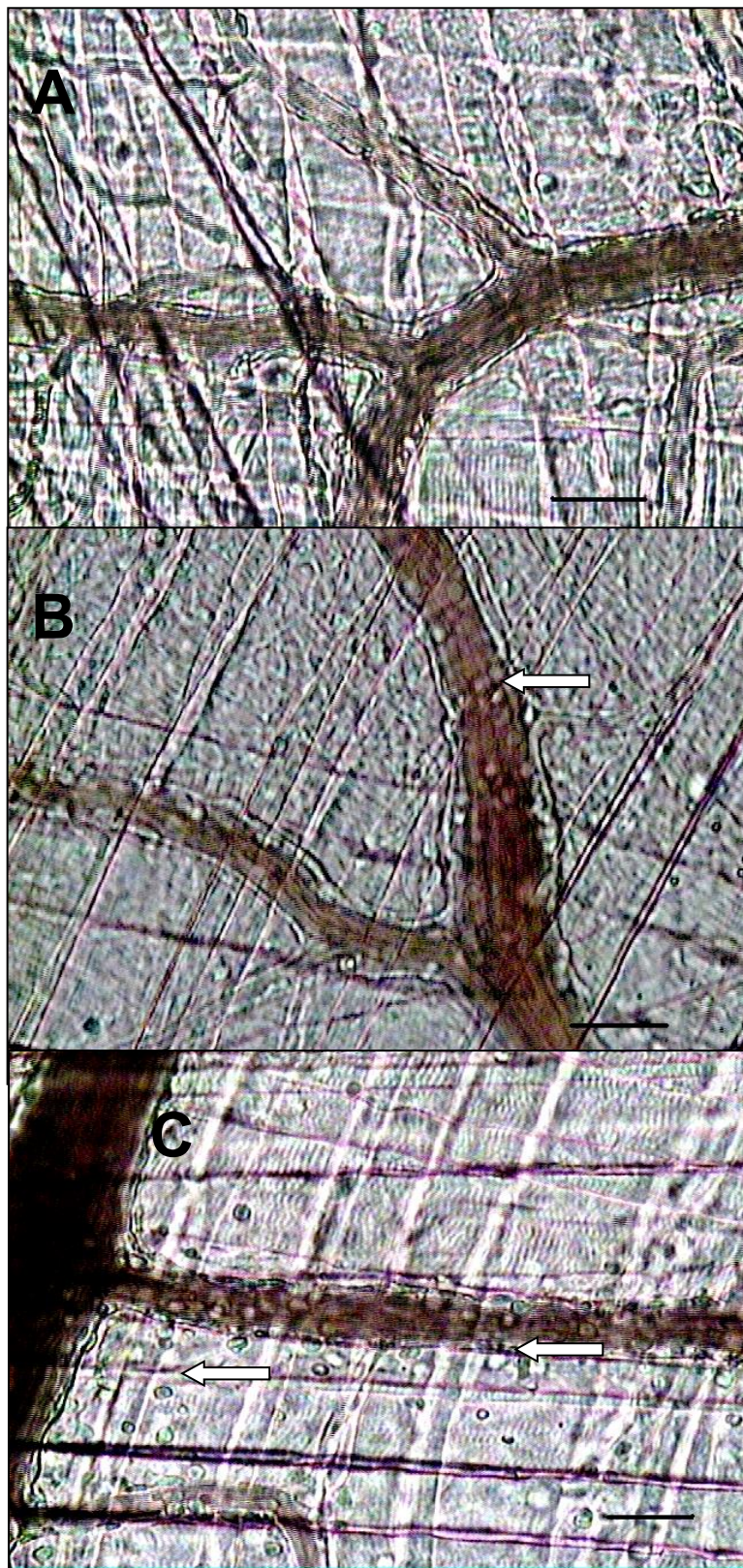
Sobre a quantidade de células aderidas, nota-se que o VBjussu apresentou um aumento em ambos os tempos (Figura 13B e E), principalmente no período de 2 horas, enquanto o VCdt apenas 24 horas após o envenenamento, sendo esse aumento inferior ao VBjussu.

Por fim, observa-se que a migração celular aumentou 2 e 24 horas após o envenenamento por VBjussu e notamos um delicado aumento 2 horas após o VCdt (Figura 13C e F).



**Figura 13 - Interação leucócito-endotélio em vênulas pós-capilares na microcirculação do músculo cremaster de camundongos, induzido pelos venenos de *Bothrops jararacussu* (40µg) ou *Crotalus durissus terrificus* (6µg) durante o período de 2 horas e 24 horas.** Os grupos analisados receberam injeção de VBjussu ou VCdt no subcutâneo da bolsa escrotal ou solução salina no caso do grupo controle. Os dados são expressos como média ± e.p.m.  $P < 0,05$ . \*P em relação ao grupo controle e #P em relação ao diferente grupo do VCdt. Os resultados correspondem à média ± SEM de 5 animais.

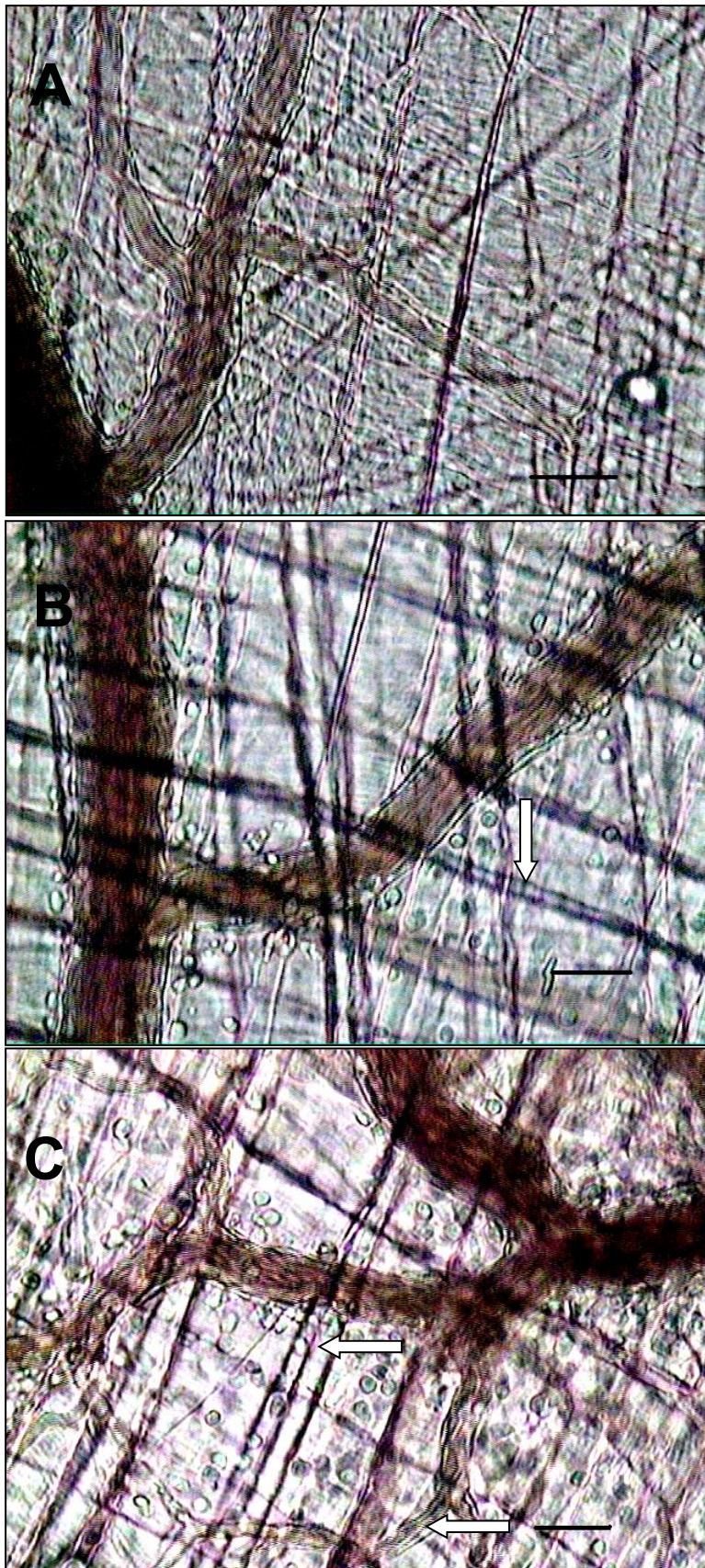
A Figura 14 mostra os eventos analisados anteriormente, a figura 14A representa o grupo controle, a figura 14B mostra a adesão celular (indicada pela seta) após a injeção de VCdt no músculo cremaster e a figura 14C mostra a migração celular 2 horas após o envenenamento por VBjussu.



**Figura 14-** Imagem da interação leucócito-endotélio no músculo cremaster de camundongos, induzido pelos venenos de *Bothrops jararacussu* (40 $\mu$ g) ou *Crotalus durissus terrificus* (6 $\mu$ g) após o período de 2 horas. Os grupos analisados receberam injeção de (A) solução salina, (B) VCdt ou (C) VBjussu no subcutâneo da bolsa escrotal de camundongos. As setas da figura C indicam leucócitos migrados para o espaço extravascular e as setas da figura B mostra a interação dos leucócitos com a superfície interna do endotélio. Os resultados correspondem á média $\pm$  SEM de 5 animais.

A figura 15 mostra a interação leucócito endotélio 24 horas após a injeção no músculo cremaster. Podemos observar o grupo controle (figura 15A), uma quantidade pequena de células migradas (figura 15B) e uma quantidade maior de células migradas (indicada nas setas) e esse aumento ocorreu principalmente após a aplicação do VBjussu (figura 15C).

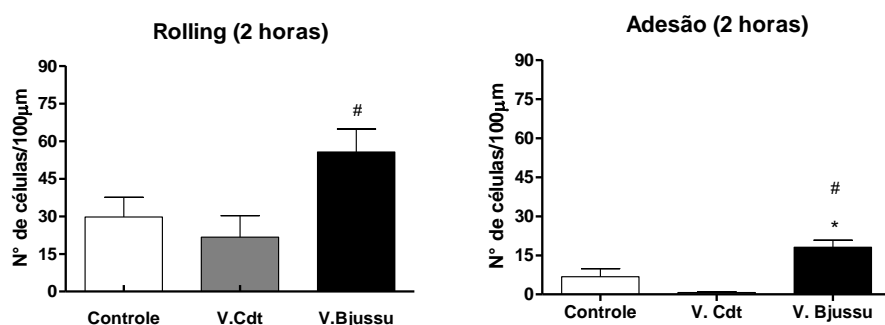




**Figura 15-** Imagem da interação leucócito-endotélio no músculo cremaster de camundongos, induzido pelos venenos de *Bothrops jararacussu* (40 $\mu$ g) ou *Crotalus durissus terrificus* (6 $\mu$ g) durante o período de 24 horas. Os grupos analisados receberam injeção de (A) solução salina, (B) VCdt ou (C) VBjussu no subcutâneo da bolsa escrotal de camundongos. A seta da figura B e C indicam leucócitos migrados para o espaço extravascular. Os resultados correspondem à média $\pm$  SEM de 5 animais.

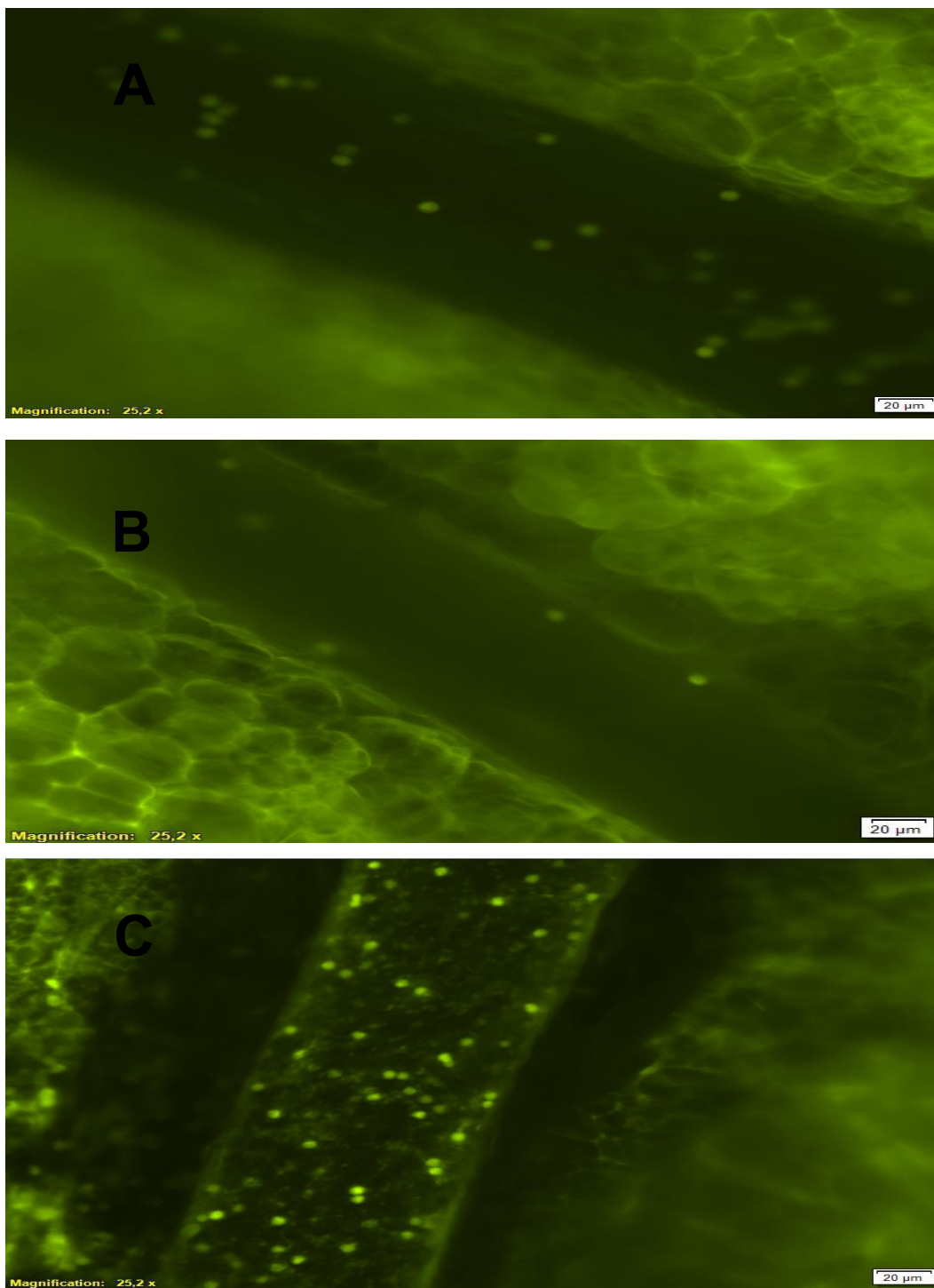
#### 4.5.2- Efeito do envenenamento sobre a interação leucócito-endotélio em ensaios de microscopia intravital no mesentério.

A microcirculação no mesentério mostra como os venenos interagem com o tecido conjuntivo. Nossos resultados indicam que 2 horas, após a injeção de VCdt não ocorreu um aumento de *rolling* e adesão celular em comparação ao VBjussu (Figura 16 e 17).



**Figura 16- Interação leucócito-endotélio na microcirculação do mesentério, induzido pelos venenos de *Bothrops jararacussu* (1 $\mu$ g) ou *Crotalus durissus terrificus* (1 $\mu$ g) após o período de 2 horas.** Os grupos analisados receberam injeção de V. Bjussu ou V. Cdt no peritônio ou solução salina no caso do grupo controle. Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m.  $P < 0,05$ . \*P em relação ao grupo controle e #P em relação ao grupo VCdt. Os resultados correspondem á média  $\pm$  SEM de 5 animais.





**Figura 17- Imagem da Interação leucócito-endotélio na microcirculação do mesentério, induzido pelos venenos de *Bothrops jararacussu* (1μg) ou *Crotalus durissus terrificus* (1μg) após o período de 2 horas. Os grupos analisados receberam injeção de (A) solução salina, (B) VCdt ou (C) VBjussu no peritônio de camundongos.**

## 5- DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos a atividade inflamatória de 2 venenos da família Viperidae, sendo ambos miotóxicos atuando de maneira local e/ou sistêmica.

Para avaliar o dano local causado por VCdt e VBjussu, utilizou-se uma dose subletal por via intramuscular. A creatina quinase (CK) é uma enzima importante do metabolismo energético, especialmente no tecido muscular (Koch et al., 2014). A injeção intramuscular do veneno, induziu a liberação de CK na corrente sanguínea 3 horas após o envenenamento, sendo essa mais expressa no VBjussu. Estudos anteriores mostraram que a injeção de VBjussu eleva os níveis de CK sérico mostrando que esse veneno é mionecrótico, sendo a maior parte dessa atividade atribuída a toxinas miotóxicas classificadas como PLA<sub>2</sub> (Dias et al., 2014) enquanto sobre a quantidade de CK residual presente no músculo, ocorreu redução 4 horas após a injeção de VBjussu. A ação miotóxica pode atuar de duas formas, pela presença de miotoxinas do veneno ou/e devido à isquemia ocasionada pelo comprometimento da microcirculação do tecido muscular (Gutiérrez et al., 2018; María Gutiérrez et al., 2009).

O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, apresenta forte atividade miotóxica, um estudo realizado por D'Império Lima et al., (1991) mostrou que a atividade de CK na corrente sanguínea aumentou quando o VCdt foi injetado no abdômen e que o aumento de CK está relacionada com a mortalidade desses animais. O componente responsável pela miotoxicidade sistêmica do VCdt é a crotoxina, sendo esse componente majoritário, porém diversos estudos mostraram que a crotoxina também possui ações imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumorais e analgésicas (Sampaio et al., 2010).

Dando continuidade a essa linha de investigação, realizamos a dosagem de lactato desidrogenase. Essa enzima marca viabilidade celular funcionando como um marcador indireto de hemólise e injúria tecidual, sendo liberada durante o dano tecidual, o LDH pode ser encontrada nas mitocôndrias das fibras musculares intactas.

O VBjussu manteve a atividade de LDH residual no músculo 4 horas após a injeção intramuscular no gastrocnêmio, entretanto, ocorreu uma perda de LDH residual até o período de 72 horas, Gonçalves *et al.*, (2008) mostrou que o envenenamento por *Bothrops jararaca* eleva a atividade LDH plasmático até o período de 4 horas após o envenenamento. Mostrando dessa maneira que os componentes dos venenos atuam diretamente sobre a hemólise celular no local da lesão. Senise *et al* (2015) revelando que o envenenamento por *Bothrops jararaca* atua na geração de trombina intravascular, estimulando a coagulopatia e hemólise intravascular em modelo experimental utilizando ratos.

Acerca do VCdt, estudos experimentais realizados por Salvini *et al* (2001) mostram que o VCdt eleva tanto a atividade enzimática sérica de CK quanto LDH, nossos resultados mostraram uma tendência no aumento dessa enzima de forma residual 24 horas após o envenenamento por VCdt.

Analisando as alterações morfológicas ocasionadas após o envenenamento. O veneno da espécie *Bothrops jararacussu*, utilizado no presente estudo apresenta ação local, com intensa mionecrose, ruptura das fibras musculares e infiltrado inflamatório (principalmente infiltração de células polimorfonucleares) e degeneração. O VBjussu induz lesões diretas e de forma progressiva aos capilares levando a degradação da microcirculação local, com fraca recuperação do músculo lesionado (Neto e Marques, 2005).

Enquanto o VCdt apresentou um infiltrado inflamatório moderado, mionecrose nas fibras musculares e aumento do espaço entre as fibras musculares, o efeito miotóxico do VCdt se deve a presença da fosfolipase A<sub>2</sub> principalmente a Crotoxina, essa fosfolipase atua de maneira local e sistêmica (que se manifesta como rabdomiólise), esta diferença pode estar relacionada a diferenças na especificidade de ligação a alvos celulares (Lomonte e Gutiérrez, 2011). A crotoxina atua principalmente em músculos ou em regiões musculares compostas predominantemente por fibras tipos I e IIA, como o músculo gastrocnêmio vermelho (51% tipo I e 35% tipo IIA), induzindo uma lesão muscular sistêmica e seletiva (Salvini et al., 2001a).

Para analisar o perfil celular em diversos tempos, quantificamos a atividade enzimática no infiltrado inflamatório dos músculos pós envenenamento seu respectivo grupo controle, sabemos que os neutrófilos são células de grande importância para o sistema de defesa, considerado como a primeira linha de defesa contra a infecção e estão intimamente envolvidos com o início da resposta inflamatória (Yang *et al* 2017), além de produzir radicais livres, como superóxido e peróxido de hidrogênio os neutrófilos são responsáveis por secretar a enzima mieloperoxidase (MPO), sendo essa enzima utilizada no presente estudo como marcador indireto de atividade neutrófilica (Pulli *et al.*, 2013).

Nossos resultados mostraram que o envenenamento foi capaz de aumentar a atividade enzimática de MPO alcançando sua atividade máxima com 24 horas, e o decréscimo até 72 horas pós-envenenamento. Nos períodos finais a atividade de MPO foi maior no grupo VCdt em comparação ao VBjussu.

Um estudo realizado por Elifio-Esposito (2007) revelou que na composição do veneno de Bjussu existe uma lectina capaz de interagir com glicoligantes na superfície dos neutrófilos, resultando na migração de neutrófilos (modelo *in vivo*) e promovendo uma auto regulação das moléculas de adesão (como a integrina 1 $\beta$ ).

Após o envenenamento por Cdt, notamos que a atividade de MPO foi mais elevada que o VBjussu no período de 72 horas. Lima *et al* (2007) mostrou que VCdt *in vivo* e em *in vitro*, reduz a fagocitose dos neutrófilos em modelo de peritonite induzido pela carragenina, reforçando a possibilidade dos neutrófilos permanecerem ativados, sendo a Crotoxina (CTX), componente majoritário do VCdt responsável pela inibição da atividade fagocítica de neutrófilos (Lima *et al.*,2012), alterando a função celular devido à inibição da fosforilação da tirosina, polimerização de actina nos fagossomas e por fim, fagocitose.

Uma vez determinado o efeito do envenenamento por Cdt e Bjussu sobre a atividade de MPO, investigamos a atividade enzimática de células mononucleares ativadas por meio da quantificação de N-acetil- $\beta$ -D-

glicosaminidase (NAG). Um fator que pode alterar a atividade das células mononucleares são as lectinas de veneno, sendo essas capazes de interagir com carboidratos presentes na superfície dos macrófagos (Duffield et al., 2012; Marçola e Rodrigues, 2015).

O VBjussu elevou a quantidade dos macrófagos no tecido muscular até o período de 48 horas. As lectinas de veneno são capazes de interagir com carboidratos presentes na superfície dos macrófagos, aumentando a atividade das células mononucleares (Duffield et al., 2012; Marçola e Rodrigues, 2015). De acordo com Dias-Netipanyj *et al* (2016) o VBjussu pode alterar a ativação de células mononucleares, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo indiretamente para a modulação celular Th1.

Os efeitos pró-inflamatórios dos venenos botrópicos são atribuídos a duas classes principais de toxinas, as metaloproteases (SVMPs) e principalmente a fosfolipases A<sub>2</sub>, as fosfolipase A<sub>2</sub> miotóxicas encontradas no veneno do gênero *Bothrops* (Gutiérrez e Lomonte, 1995) causam lesão muscular direta na membrana da célula muscular, por mecanismo indireto de degeneração vascular, dano celular e reação inflamatória aumentando a liberação de mediadores por células imunes, como os macrófagos (Gutiérrez e Ownby, 1995; Costa *et al.*, 2002; Markland e Swenson, 2013).

O envenenamento por Cdt elevou a atividade de NAG, de maneira tardia nos períodos de 48 e 72 horas. Um estudo mostrou que além de efeito inibitório sobre a atividade de espalhamento e atividade fagocítica dos macrófagos de forma prolongada (Sampaio *et al.*, 2001) e o componente responsável por esse efeito inibitório é a Ctx, atuando sobre resposta imune humoral além de induzir alterações na distribuição de leucócitos, caracterizada pela inibição de linfócitos e monócitos (Cardoso et al., 2001).

Para estudar a dinâmica do processo inflamatório provocado pelo envenenamento, utilizamos a microscopia intravital. O estímulo inflamatório induzido pelo envenenamento elevou o *rolling*, adesão e migração celular.

Assim, como descrito por Zamuner *et al* (2005), em condições experimentais utilizando o veneno de *Bothrops asper*, a ICAM-1 pode funcionar como ligante para o LFA-1 contribuindo para interações neutrófilo-

endotélio, esse veneno ativa o endotélio atuando sobre a PECAM-1 aumentando a adesão e migração celular. O VBjussu elevou principalmente a adesão celular no período de 2 horas e a migração celular 24 horas após o envenenamento (figura 16 e 17), possivelmente ativando moléculas expressas no endotélio.

Em relação ao VCdt, identificou-se um processo inflamatório mais fraco em comparação ao VBjussu, com aumento do rolling e migração (apenas no período de 2 horas), adesão celular. Nunes e colaboradores (2007) mostrou que a VCdt induz um efeito anti-inflamatório prolongado em um modelo experimental, reduzindo a migração de celular. Esse mesmo grupo identificou que a Ctx pode interferir na expressão das moléculas de adesão após o envenenamento sobre a musculatura esquelética, inibindo a interação leucócito endotélio e a migração celular (Nunes et al., 2009).

Observando a microcirculação no tecido conjuntivo, estudos anteriores mostraram que duas horas após a administração de Ctx ou fosfolipase A<sub>2</sub>, ocorreu a redução do *rolling* celular e a quantidade de células aderidas foi equivalente ao grupo controle (Zambelli et al., 2008). O VCdt reduziu o *rolling* e adesão celular no mesentério, sua resposta foi extremamente fraca quando comparado ao grupo VBjussu, 2 horas após o envenenamento na cavidade abdominal. É interessante notar que o VBjussu, apresentou uma resposta altamente inflamatória no tecido conjuntivo.

Uma manifestação comum, resultante do envenenamento ofídico é a necrose do músculo esquelético. Em resposta ao dano causado pelo envenenamento o músculo libera moléculas que atuam como “sinais de perigo”, conhecidas como DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) servindo como ligantes endógenos capazes de interagir com receptores Toll-like (TLRs) essas moléculas contribuem para a ação inflamatória por meio da ativação do sistema imune inato, após sua ligação aos receptores em vários tipos celulares (Sarhan et al., 2018).

Diferentes venenos podem emitir DAMPs, estudos experimentais visando comparar o veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus durissus terrificus*, mostraram que o veneno botrópico induz a liberação dos dois tipos de

moléculas mitocondriais (mt DNA) encontrada na matriz e citocromo c (Cit c) no espaço inter-membrana de maneira mais rápida que o VCdt. Por outro lado, veneno crotálico liberou citocromo c de maneira tardia (Zornetta et al., 2012). Esse estudo sugere que a liberação de DAMPs mitocondriais contribui para os eventos inflamatórios locais e sistêmicos.

Alguns DAMPs são capazes de elevar de maneira indireta a permeabilidade vascular, estimulando células inflamatórias a produzir citocinas que atuam na microvasculatura e também atuando diretamente com as células endoteliais (Rucavado et al., 2016).

Nesse sentido, é importante comentar as diferentes respostas obtidas, o VBjussu com uma resposta mais rápida e demasiada, maior influxo de neutrófilos, macrófagos e lesão muscular. Em contraste, o VCdt, ocasiona miotoxicidade sistêmica, induzida por este veneno e as alterações observadas, tais como, aumento do influxo de neutrófilos, alterações morfológicas e morte celular ocorrem devido à resposta do sistema imune por meio da liberação de sinais de perigo gerados pelo músculo lesado, essa questão precisa de um estudo mais aprofundado.

Esses resultados revelam a importância de saber como funciona o processo inflamatório de cada veneno, como ocorrem os eventos precoces e tardios no tecido logo após o envenenamento, para futuramente associar os diferentes tipos de envenenamentos com tratamentos mais específicos, amenizando assim possíveis sequelas.

## **6.RESUMO DOS RESULTADOS**

- O VBjussu e o VCdt apresentam efeito miotóxico, aumentando os níveis de marcadores de lesão, como CK e LDH no local do envenenamento, mas essa atividade foi mais elevada no VBjussu.

-Os cortes histológicos, mostraram alterações das fibras musculares, presença de edema, infiltrado inflamatório e necrose tecidual, em ambos os venenos. Além da presença de lesões delta após o envenenamento por *Bothrops jararacussu*.

-Aumento da atividade enzimática de MPO 4 e 24 horas após o envenenamento em ambos os venenos (VBjussu e VCdt), sendo essa atividade mais elevada no VBjussu. No período de 72 horas o VCdt apresentou maior atividade enzimática de MPO em comparação ao VBjussu.

-O envenenamento por VBjussu elevou o NAG no músculo gastrocnêmio 4, 24 e 48 horas após o envenenamento, enquanto o VCdt apresentou um aumento 48 e 72 horas após o envenenamento.

-A interação leucócito endotélio no músculo cremaster, mostrou que o VBjussu eleva o rolling, adesão e migração celular no período de 2 e 24 após o envenenamento, no VCdt esse aumento aconteceu 2 horas depois, sobre o rolling e migração celular, no período de 24 horas apenas a adesão celular foi elevada.

-No tecido conjuntivo, o VBjussu apresentou aumento no rolling e adesão celular 2 horas após o envenenamento no mesentério, por outro o VCdt não apresentou resposta após o envenenamento

## **7.CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos indicam que o VBjssu induz uma interação leucócito-endotélio que se manifesta rapidamente devido a componentes do veneno com atuação direta sobre o tecido muscular, enquanto no VCdt essa interação é mais tardia e menos intensa, não apresentando atividade inflamatória no tecido conjuntivo.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, F.A.A., Santalúcia, M., Cabral, R.C. *Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos*. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad, Jr., V. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier, São Paulo, pp. 6–12, 2003.

Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Acidente crotálico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Hadda V Jr.. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*; 2003. pp. 91–107.

Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Acidente crotálico. In: Cardoso JLC, França OSF, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V (orgs.). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, p. 91-98, 2003.

Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochem.*, vol. 69, 2004, p. 4–9.

Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in brazil. *Toxicon* 1985;23:631–6.

Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 1973.

Bailey PJ. Sponge Implants as Models. *Methods Enzymol* 1988..

Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* (80- ) 1989.

Bjarnason JB, Fox JW. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. *Methods Enzymol* 1995;248:345–68.

Boer-Lima PA, Rocha Gontijo JA, Da Cruz-Höfling MA. Bothrops moojeni

snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *Am J Trop Med Hyg* 2002.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976.

Cardoso DF, Lopes-Ferreira M, Faquim-Mauro EL, Macedo MS, Farsky SHP. Role of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators Inflamm* 2001.

Chotenimitkhun R, Rojnuckarin P. Clinical Toxicology Systemic antivenom and skin necrosis after green pit viper bites Systemic antivenom and skin necrosis after green pit viper bites Snake Antivenom and Skin Necrosis. *Clin Toxicol* 2008;46:122–5.

Costa EP, Clissa PB, Teixeira CFP, Moura-Da-Silva AM. Importance of Metalloproteinases and Macrophages in Viper Snake Envenomation-Induced Local Inflammation. vol. 26. 2002.

Cupo P, Azevedo-Marques MM, Hering SE. Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990.

D'Império Lima MR, Cristina dos Santos M, Tambourgi DV, Marques T, Dias da Silva W, Kipnis T. Susceptibility of different strains of mice to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom: Correlation between lethal effect and creatine kinase release. *Toxicon* 1991.

Daher EF, Albuquerque PLMM, N. Jacinto C, Lima JB, Veras M do SB, Silva Junior GB. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013.

Dias-Netipanyj MF, Boldrini-Leite LM, Trindade ES, Moreno-Amaral AN, Elifio-Esposito S. B<sub>2</sub>cul, a snake venom lectin, modulates monocyte-derived

macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro 2016.

Dias L, Rennó AL, Silva DA da, Hyslop S, Rodrigues MAP, Sousa NC, et al. Rat atrial responses to *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) snake venom. *Toxicology* 2014;323:109–24.

Duffield JS, Luper M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis 2012.

Elifio-Esposito SL, Hess P, Moreno A, Lopes-Ferreira M, Ricart Cao, Souza M V., et al. A C-type lectin from *Bothrops Jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2007.

Fox JW, Serrano SMT. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J* 2008.

Gonçalves DAP, Silva ÉVCM, Graça FA, Lira EC, Zanon NM, Mendes GE, et al. In Vivo Effects of *Bothrops jararaca* Venom on Metabolic Profile and on Muscle Protein Metabolism in Rats. 2008.

Gopalakrishnakone P, Hawgood BJ. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon* 1984.

Gutiérrez JM, Núñez J, Díaz C, Cintra AC, Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR. Skeletal Muscle Degeneration and Regeneration after Injection of Bothropstoxin-II, a Phospholipase A, Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops jararacussu*. 1991.

Gutiérrez J, Arce V, Brenes F, Chaves F. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol* 1990.

Gutiérrez J, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995;33:1405–24.

Gutiérrez JM, Escalante T, Hernández R, Gastaldello S, Saravia-Otten P,

Rucavado A. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? *Toxins* (Basel) 2018.

Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009.

Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003;42:915–31.

Harris JB. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 2003;42:933–45.

Herr N, Mauler M, Bode C, Duerschmied D. Intravital Microscopy of Leukocyte-endothelial and Platelet-leukocyte Interactions in Mesenterial Veins in Mice. *J Vis Exp* 2015.

Herrera C, Macêdo JKA, Feoli A, Escalante T, Rucavado A, Gutiérrez JM, et al. Muscle Tissue Damage Induced by the Venom of *Bothrops asper*: Identification of Early and Late Pathological Events through Proteomic Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004599.

Homsi-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988.

Koch AJ, Pereira R, Machado M. The creatine kinase response to resistance exercise. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2014;14:68–77.

Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;13:159–75.

Kourtzelis I, Mitroulis I, von Renesse J, Hajishengallis G, Chavakis T. From leukocyte recruitment to resolution of inflammation: the cardinal role of integrins. *J Leukoc Biol* 2017.

Landucci ECT, Castro RC, Pereira MF, Cintra ACO, Giglio JR, Marangoni S,

et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol* 1998.

Lomonte B, Gutiérrez JM. Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim Slov* 2011.

Marçola M, Rodrigues CE. Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. *Stem Cells Int* 2015;2015:832649.

María Gutiérrez J, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009;54:958–75.

María Gutiérrez J, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity [s.d.].

Markland FS, Swenson S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 2013;62:3–18.

Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H, Nakajima N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon* 1992;30:853–64.

Mebis D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. vol. 48. 1990.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428–35.

Milani Júnior R, Jorge MT, de Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JL, et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *QJM* 1997;90:323–34.

Ministério da Saúde. Brasil copatrocinou resolução para o problema dos acidentes ofídicos no mundo 2018.

Moura-Da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM, Mota I. Neutralization of

myotoxic activity of bothrops venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. vol. 29. 1991.

Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006.

Neto HS, Marques MJ. Microvessel damage by *B. jararacussu* snake venom: Pathogenesis and influence on muscle regeneration. *Toxicon* 2005.

Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a006049.

Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 2014;41:694–707.

Nunes F, Zychar B, Della-Casa M, Sampaio S, Gonçalves L, Cirillo M. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon* 2009;55:1100–6.

Nunes FPB, Sampaio SC, Santoro ML, Sousa-e-Silva MCC. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon* 2007;49:1090–8.

Nunes FPB, Zychar BC, Della-Casa MS, Sampaio SC, Gonçalves LRC, Cirillo MC. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon* 2010;55:1100–6.

Organization WH. Snake bites. Snakebite envenoming 2019. <https://www.who.int/snakebites/control/en/>.

Otero R, Gutiérrez J, Beatriz Mesa M, Duque E, Rodríguez O, Luis Arango J, et al. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 2002.

Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo. *Rev Assoc Med Bras* 2001;47:24–9.

Portal Ministério da Saúde. Casos de acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2017\* 2017. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/junho/25/1-Casos-Ofidismo-2000-2017.pdf>.

Prado-Franceschi J, Vital Brazil O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 1981;19:875–87.

Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KLC, Wojtkiewicz G, et al. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLoS One* 2013.

Queiroz LS, Neto HS, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984;22:339–46.

Rangel-Santos A, Dos-Santos E., Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso D., Mota I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 2004;43:801–10.

Ribeiro LA, Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South América. *Venom. Anim. Their Venoms*, 1971.

Rucavado A, Nicolau CA, Escalante T, Kim J, Herrera C, Gutiérrez JM, et al. Viperid envenomationwound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. *Toxins (Basel)* 2016.

Rucavado A, Nunez J, Gutierrez JM. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int J Exp Pathol* 1998.

Salvini TF, Amaral AC, Miyabara EH, Turri JAO, Danella PM, Selistre de Araújo HS. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon* 2001a.

Salvini TF, Amaral AC, Miyabara EH, Turri JAO, Danella PM, Selistre de Araújo HS. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon* 2001b.

Sampaio SC, Hyslop S, Fontes MRM, Prado-Franceschi J, Zambelli VO, Magro AJ, et al. Crotoxin: Novel activities for a classic  $\beta$ -neurotoxin. *Toxicon* 2010.

Sano-Martins IS. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *QJM* 2001.

Sarhan M, Land WG, Tonnus W, Hugo CP, Linkermann A. Origin and Consequences of Necroinflammation. *Physiol Rev* 2018.

Saturnino-Oliveira J, Tomaz MA, Fonseca TF, Gaban GA, Monteiro-Machado M, Strauch MA, et al. Pulsed ultrasound therapy accelerates the recovery of skeletal muscle damage induced by *Bothrops jararacussu* venom. *Brazilian J Med Biol Res* 2012.

Senise L V., Yamashita KM, Santoro ML. Bothrops jararaca envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. *Exp Biol Med* 2015.

da Silva NG, Sampaio SC, Gonçalves LRC. Inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic edema induced by injection of bacillus Calmette-Guérin into the footpad of mice. *Toxicon* 2013;63:98–103.

Sousa LF, Nicolau CA, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2442.

Sriramarao P, Broide DH. Differential regulation of eosinophil adhesion under conditions of flow in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1996.

Teixeira CFP, Cury Y, Oga S, Jancar S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: Role of eicosanoids and platelet activating factor



(PAF). *Toxicon* 1994.

Teixeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon* 2003.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editores. *Robbins e Cotran - Patologia: Bases patológicas das Doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editores. *Robbins e Cotran - Patologia: Bases patológicas das Doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 55-57.

Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J Clin Invest* 1996;98:1081–7.

Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J, Zhao Y. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections [s.d.].

Zambelli VO, Sampaio SC, Sudo-Hayashi LS, Greco K, Britto LRG, Alves AS, et al. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon* 2008;51:1357–67.

Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Gutiérrez JM, Pereira Teixeira C de F. Inflammation induced by Bothrops asper venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon* 2005;46:806–13.

Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcRγ to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med* 2008.

Zeni ALB, Becker A, Krug M, Albuquerque CAC. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of Bothrops jararacussu venom in mice. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2008.

Zornetta I, Caccin P, Fernandez J, Lomonte B, Gutierrez JM, Montecucco C. Envenomations by Bothrops and Crotalus Snakes Induce the Release of

Mitochondrial Alarmins. PLoS Negl Trop Dis 2012;6:e1526.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização da resposta inflamatória nas lesões musculares causadas pelos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*: Efeito do estresse oxidativo e possível melhora terapêutica com o uso de dexametasona", protocolada sob o CEUA nº 1614071216, sob a responsabilidade de **Luís Roberto de Camargo Gonçalves** e equipe; *Maria Beatriz Bernardes Amorim* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 22/03/2017.

We certify that the proposal "Characterization of the inflammatory response in muscle injury caused by the venom of snakes *Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus terrificus*: Effect of oxidative stress and possible therapeutic improvement with the use of dexamethasone", utilizing 592 Heterogenics mice (592 males), protocol number CEUA 1614071216, under the responsibility of **Luís Roberto de Camargo Gonçalves** and team; *Maria Beatriz Bernardes Amorim* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 03/22/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2017** a **02/2019**

Área: **Fisiopatologia**

Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	50 a 60 dias	N:	520
Linhagem:	Swiss			Peso:	18 a 22 g		
Origem:	Biotério Central						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	60 a 70 dias	N:	72
Linhagem:	Swiss			Peso:	25 a 30 g		

Resumo: Ainda hoje ocorrem anualmente cerca de 28.000 acidentes ofídicos no Brasil. Dos acidentes por serpentes peçonhentas, cerca de 90% são causados por serpentes do gênero *Bothrops* e 8% são causados por serpentes do gênero *Crotalus*. Destes acidentes, cerca de 0,4 % evoluem para óbitos e 2% resultam em sequelas. Os envenenamentos botrópicos caracterizam-se por sintomas sistêmicos, como distúrbios hemostáticos, e intensas reações locais, como edema, hemorragia e necroses que podem evoluir para grandes perdas teciduais, com sequelas debilitantes. Já o envenenamento crotálico, caracteriza-se por sintomas neurotóxicos, como a ptose palpebral, diplopia, fascies neurotóxicas, além de distúrbios hemostáticos. Os envenenamentos crotálicos diferem dos botrópicos, por não apresentarem sinais e sintomas locais de envenenamento. Apesar dessas diferenças, tanto os venenos botrópicos quanto o crotálico são miotóxicos. Os botrópicos podem causar uma miotoxicidade local, direta pela ação de miotoxinas, ou indireta, por ação de outras toxinas nos vasos da microcirculação das fibras musculares esqueléticas. O veneno crotálico, por sua vez, causa uma ação miotóxica sistêmica, por uma ação direta da sua toxina majoritária, a crotoxina. Os venenos botrópicos, bem como suas miotoxinas, apresentam uma forte atividade flogística, enquanto que o veneno crotálico, particularmente a crotoxina, apresenta uma atividade anti-inflamatória, principalmente quando utilizado em doses não tóxicas em modelos de inflamação aguda ou crônica. Sabe-se que o antiveneno, único recurso terapêutico para o tratamento de casos de envenenamento ofídico, reverte os sintomas sistêmicos desse envenenamento, porém não reverte lesões locais já desencadeadas ou estabelecidas. Nesse sentido, estudos sobre a fisiopatologia dos envenenamentos e sobre a associação de fármacos ao tratamento de acidentes por toxinas são importantes visando uma melhoria terapêutica, particularmente no que se refere às reações locais dos envenenamentos botrópicos. Nesse sentido, o presente projeto visa caracterizar a resposta inflamatória na lesão muscular causada pelos venenos de *Bothrops jararacussu* e de *Crotalus durissus terrificus*, verificando uma participação de radicais livres resultantes de processos isquêmicos e uma possível melhora do processo regenerativo pela associação de dexametasona ao antiveneno no tratamento da lesão muscular induzida pelo veneno de *B. jararacussu*.

Local do experimento: Laboratório de Fisiopatologia □ Instituto Butantan