



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

REBECA HORN VASCONCELOS

ALTERAÇÕES DERMATOMORFOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS
INOCULADOS COM O VENENO TOTAL DA SERPENTE *Philodryas nattereri*
(Dipsadidae)

FORTALEZA - CEARÁ

2015

REBECA HORN VASCONCELOS

ALTERAÇÕES DERMATOMORFOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS INOCULADOS
COM O VENENO TOTAL DA SERPENTE *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros e Aves.

Orientadora: Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

FORTALEZA - CEARÁ

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Vasconcelos, Rebeca Horn.
Alterações dermatomorfológicas de camundongos inoculados com o veneno total da serpente *Philodryas nattereri* (Dipsadidae) [recurso eletrônico] / Rebeca Horn Vasconcelos. – 2015.
1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 68 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2015.

Área de concentração: Sanidade Animal.
Orientação: Prof.^a Ph.D. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista.
Coorientação: Prof.^a Dra. Célia Maria de Souza Sampaio.

1. Peçonha. 2. Pele. 3. Histopatologia. 4. Serpente. 5. *Philodryas nattereri*. I. Título.

REBECA HORN VASCONCELOS

ALTERAÇÕES DERMATOMORFOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS
INOCULADOS COM O VENENO TOTAL DA SERPENTE *Philodryas
nattereri* (Dipsadidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da
Faculdade de Veterinária da Universidade
Estadual do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

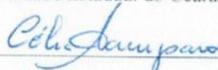
Aprovada em: 02/07/15

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

(Universidade Estadual do Ceará)- Orientadora



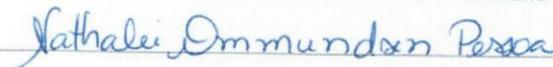
Profª. Dra. Célia Maria de Souza Sampaio

(Universidade Estadual do Ceará)- Co-Orientadora



Profª. Dra. Diva Maria Borges- Nojosa

(Universidade Federal do Ceará)- Examinadora



Profª. Dra. Nathalie Ommundsen Pessoa

(Fateci)- Examinadora

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu, **Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista**, professora deste programa de Pós-Graduação, autorizo a publicação da dissertação de Mestrado da aluna Rebeca Horn Vasconcelos, intitulado “Alterações Dermatomorfológica de camundongos inoculados com o veneno total da serpente *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)”, bem como do artigo oriundo de tal trabalho.

Fortaleza, 31 de julho de 2015.



Profa. PhD. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

Orientadora PPGCV/ FAVET/ UECE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Senhor, a qual eu dependo exclusivamente. Toda HONRA seja dada a ELE.

Aos meus pais Adriano Jorge Pequeno Vasconcelos e Lucile Cortez Horn, que sempre batalharam para me dar a melhor educação. Obrigada pelo amor incondicional.

Ao meu filho Jonas, que tanto me ensinou a amar incondicionalmente e é a minha fonte de energia para batalhar todo santo dia.

À minha boadrasta Suyanne Caminha Saboia e padrasto José Trindade, por serem tão presentes em minha vida, me acolhendo e me amando.

À minha irmã Raquel Horn Vasconcelos de Oliveira que sempre se mostrou uma companheira, compartilhando de todos os momentos da minha vida, do nosso nascimento ao dom de ser mãe.

Ao meu cunhado Joselito de Oliveira Neto, que mais do que cunhado, se tornou um irmão pra mim. Devo grande parte desse mestrado à sua pessoa!

Aos meus irmãos Rafael e Ruben por todos os momentos alegres, da infância à juventude.

Ao meu noivo amado Junior, que nunca deixou de me apoiar, estando presente nos momentos bons e difíceis, sendo o melhor companheiro que alguém poderia ter e me dando de presente o seu filho Gabriel, tão lindo e amado por mim, além dos seus pais, um casal maravilhoso que já considero minha família.

Às minhas amigas (Andrea, Karla, Flaviane, Jamila, Karen, Nara, Sheila e Isadora) que tanto me fizeram sorrir, nos momentos tão delicados dessa caminhada.

À Universidade Estadual do Ceará, que propiciou minha formação acadêmica e me proporcionou experiências engrandecedoras e momentos memoráveis ao lado de pessoas incríveis.

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP), pela bolsa de mestrado concedida, bem como às outras agencias de fomento CNPq e CAPES, por contribuírem com minhas pesquisas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias por terem compartilhado seus conhecimentos dentro e fora das salas de aula, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Aos demais funcionários do PPGCV, em especial à querida Adriana, pela paciência e orientação quanto ao funcionamento do programa.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem ao convite em participar e somarem à realização deste sonho.

À professora Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista, minha gratidão é sem tamanho, por ter aberto a porta da sua casa, acreditando em mim, me aceitando em seu laboratório e orientando no decorrer do curso; essa vitória é da senhora!

Ao professor Ms. Daniel de Araujo Viana pelos conselhos e orientações num momento de muita aflição no decorrer desses dois anos.

Aos alunos Karen Denise Marambira e Francisco Antonio Felix Xavier Junior do Laboratório de Histologia dos efeitos causados pelos venenos de serpentes e plantas – HISTOVESP / Universidade Estadual do Ceará (UECE), por acompanharem os experimentos de uma forma tão dedicada que muito me tocou.

À aluna de doutorado em Ciências Veterinárias, Glayciane Bezerra de Moraes, pelas dicas e momentos dedicados ao meu mestrado, obrigada Nina!!!

Aos alunos de doutorado em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, João Alison de Moraes Silveira e Natacha Teresa Queiroz Alves, pelos ensinamentos durante os experimentos, incentivos e apoio. Vocês são pessoas incríveis!

À professora Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos Santos da Universidade Estadual do Ceará - (UECE), por ter participado do processo de qualificação do meu projeto e pelo carinho que me deu.

À professora Dra. Marinetes Dantas de Aquino Nery por se disponibilizar em me ajudar nos trabalhos para a conquista deste título.

À professora Dra. Helena Serra Azul Monteiro da Universidade Federal do Ceará – UFC, por ter cedido seu laboratório e ter firmado sua parceria.

À professora Dra. Célia Maria de Souza Sampaio por ter-me co-orientado, estando sempre disponível todas as vezes que a procurei.

À professora Dra. Diva Maria Borges Nojosa e à médica veterinária Roberta Rocha do Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) do departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, por terem cedido gentilmente o veneno total.

RESUMO

Venenos de serpentes são compostos por substâncias ativas complexas, sendo a maioria delas de natureza proteica, causando diversos efeitos no ser humano e em animais domésticos, podendo levar ao óbito. A serpente popularmente conhecida como Corre-campo é nativa na região do Nordeste, sendo encontrada em todo o estado do Ceará e é denominada *Philodryas nattereri*. Esse estudo teve por objetivo conhecer as alterações morfofisiológicas de pele de camundongos após inoculação com o veneno total desta serpente. Os animais foram distribuídos em três grupos, sendo que dois receberam concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL, inoculados via subcutânea, e um terceiro grupo recebeu 40 µg/mL do veneno via intradérmica. Os resultados macroscópicos mostraram a presença de uma crosta na região inoculada, bem como a presença de hemorragia, tal atividade foi confirmada por achado histopatológico. Microscopicamente, todos os grupos experimentais apresentaram infiltrado inflamatório linfoblástico e de polimorfonucleares, hemorragia, edema, e presença de fibrose. O veneno da serpente *Philodryas nattereri* alterou a arquitetura normal do tegumento. Nossos resultados corroboraram em demonstrar tais alterações, uma vez que esta substância tóxica de origem animal, presente na nossa biodiversidade nordestina apresenta poucos dados na literatura, sendo desta forma, uma importante ferramenta para estudos das alterações morfofisiológicas de pele.

Palavras-chave: Peçonha. Pele. Histopatologia.

ABSTRACT

Snake venoms are composed of complex active substances, most of them of protein nature, causing various effects on humans and domestic animals and can lead to death. The snake popularly known as Run-field is native to the Northeast region, found throughout the state of Ceará and is called *Philodryas nattereri*. This study aimed to know the morphological and physiological changes in the skin of mice after inoculation with the whole venom of this snake. The animals were divided into three groups, two of which received concentrations of 20 µg / mL and 40 µg / mL, inoculated subcutaneously, and a third group received 40 µg / mL poison intradermally. The macroscopic results showed the presence of a crust in the inoculated area, and the presence of bleeding, this activity was confirmed by histopathological analysis. Microscopically, all experimental groups had lymphoblastic and polymorphonuclear inflammatory infiltration, hemorrhage, edema, and fibrosis. The venom of the snake *Philodryas nattereri* altered the normal integument architecture. Our results corroborate to demonstrate such changes, since this toxic substance of animal origin present in our Northeast biodiversity presents few literature data, thereby being an important tool for the study of morphological and physiological changes in the skin.

Keywords: Poison. Skin. Histopathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de dentições de serpentes.....	17
Figura 2 -	Fotos de crânios de serpentes de diferentes dentições.....	17
Figura 3 -	<i>Philodryas nattereri</i> (“cobra-tabuleiro”).....	21
Figura 4 -	Distribuição geográfica da serpente no Brasil.....	22
Figura 5 -	Esquema da Glândula de Duvernoy de <i>Philodryas</i> (GD); e da glândula supralabial (GSL).....	23
Figura 6-	Fotomicrografia de pele grossa, evidenciando todas as camadas da pele e glândulas sudoríparas.....	30
Figura 7-	Fotomicrografia de pele fina no aumento total de 400x, aparato em H.E.....	32
Figura 8 -	Esquema da inoculação via subcutânea (ISC).....	34
Figura 9 -	Esquema da injeção intra-dérmica(ID).....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. ofersii</i>	<i>Philodryas ofersii</i>
<i>P. patagoniensis</i>	<i>Philodryas patagoniensis</i>
HVB	Hospital Vital Brasil
<i>P. nattereri</i>	<i>Philodryas nattereri</i>
GD	Glandula de Duvernoy
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<i>B. jararaca</i>	<i>Bothrops jararaca</i>
PLA2	Fosfolipase A2
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
DMN	Dose Mínima Necrosante
RMN	Espectometria de Ressonância Nuclear
ISC	Injeção Subcutânea
ID	Injeção Intra-dérmica
DMH	Dose Mínima Hemorrágica
DME	Dose Mínima de Edema

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	As serpentes da fauna brasileira.....	16
2.2	Acidentes ofídicos por Colubrídeos.....	18
2.3	Gênero <i>Philodryas</i>	20
2.3.1	<i>Espécie Philodryas nattereri</i>	21
2.4	Veneno de serpentes.....	23
2.4.1	<i>Veneno do gênero Philodryas</i>	24
2.5	A pele.....	29
2.5.1	<i>Epiderme</i>	30
2.5.2	<i>Derme</i>	32
2.5.3	<i>Hipoderme</i>	33
2.6	Vias de administração.....	33
3.	JUSTIFICATIVA.....	35
4.	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	36
5.	OBJETIVOS.....	37
5.1	GERAL.....	37
5.2	ESPECÍFICOS.....	37
6.	CAPÍTULO 1.....	38
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8.	PERSPECTIVAS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A incidência mundial de acidentes ofídicos e sua gravidade são desconhecidas. Porém, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aconteçam 2.500.000 casos de envenenamentos por serpentes peçonhentas ao ano, o que resulta em, aproximadamente, 125.000 mortes e inúmeros casos resultam em sequelas graves (ALBUQUERQUE et al, 2013).

No Brasil, o país com o maior número de casos de acidentes ofídicos que ocorre na América do Sul, cerca de 20.000 casos são notificados por ano, com uma taxa de letalidade de 0,45% (LEITE et al, 2013). No estado do Ceará em 2012 foram notificados 445 casos envolvendo picadas de serpentes peçonhentas, sendo considerado, ainda, um número elevado (BRASIL, 2012).

O Brasil possui uma das mais ricas faunas de serpentes do Planeta, e, de acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia, atualmente são conhecidas 426 espécies, pertencentes atualmente às famílias: Aniliidae (01 espécie), Anomalepididae (07), Boidae (13), Colubridae (38), Dipsadidae (267), Elapidae (39), Leptotyphlopidae (16), Tropidophiidae (3), Typhlopidae (6) e Viperidae (36). Dessas, 19,4% (75 espécies) são consideradas peçonhentas e são responsáveis por cerca de 20 mil acidentes ofídicos anualmente no País (NERY, 2012).

Segundo Melgarejo (2003), as serpentes da família *Colubridae*, gênero *Philodryas* são consideradas não peçonhentas. No entanto, alguns casos de envenenamento humano têm sido relatados na literatura (ARAÚJO, 1997). Estes relatos são restritos principalmente à *Philodryas olfersii* (*P. olfersii*), que é potencialmente perigosa para os vertebrados (ROCHA, 2007). A baixa incidência de acidentes causados por *Philodryas* é devido à anatomia dos dentes inoculadores e a localização na região posterior do maxilar (dentição opistóglifa), o que dificulta injetar o veneno. Embora normalmente serpentes do gênero *Philodryas* não apresentem comportamento agressivo (VITT, 1980), em 1992 foram relatados 132 casos com *P. olfersii*, *P. patagoniensis* (*P. patagoniensis*) e *Philodryas aestivus* no Hospital Vital Brasil (HVB), Instituto Butantan, SP (ARAÚJO, 1997).

O veneno produzido por estes animais são compostos por substâncias ativas que possuem a função de defesa e captura de presas para sua alimentação. Tais substâncias são formadas por toxinas. Existe uma grande variedade de estruturas tóxicas decorrente da evolução das espécies (MELGAREJO, 2003). Assim, cada espécie de serpente possui seu veneno com a sua composição química característica, levando a uma variação dos efeitos do

mesmo no organismo humano. Dessa forma, a caracterização dos efeitos específicos das frações de venenos ofídicos é de profunda importância para o entendimento das alterações patológicas decorrentes do envenenamento, bem como de processos bioquímicos e fisiológicos. Além disto, um estudo mais detalhado destes compostos tóxicos, principalmente das frações pode ser bastante promissor no desenvolvimento de novos fármacos (GARCIA & LEWIS, 2003).

A pele é o primeiro órgão que entra em contato com o veneno, uma vez que todo e qualquer acidente ofídico ocorre pela inoculação da peçonha na mesma. Tem a função de proteção contra os raios ultravioleta através da melanina, protege contra a perda de água e contra o atrito; colabora na termorregulação do corpo; além de participar do processo de excreção de várias substâncias. É constituída por duas porções, a mais externa chamada de epiderme e, mais internamente, a derme.

A epiderme composta por queratinócitos e melanócitos, tem origem da ectoderme e é formada por cinco camadas. São elas: mais externamente a camada córnea, seguida da camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e a mais interna, camada basal. A derme, de origem mesodérmica, é composta por uma associação de fibroblastos, fibrócitos, vasos linfáticos, sanguíneos e nervos, além de anexos cutâneos (tais como glândulas sudoríparas e sebáceas, pêlos e músculo eretor do pêlo) formando, assim, as camadas papilar e reticular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A despeito da grande diversidade de serpentes opistóglifas brasileiras é escasso o conhecimento das propriedades bioquímicas e farmacológicas de seus venenos (ROCHA, 2007). Considerando a importância dos acidentes ofídicos causados pelas serpentes do gênero *Philodryas*, o objetivo deste trabalho é estudar os efeitos biológicos do veneno total da *Philodryas nattereri* (*P. nattereri*) Steindachner, 1870. Com o intuito de avaliar a hipótese de alterações morfológicas na pele causadas pela inoculação do veneno desta espécie, pressupõe-se que ocorrerão modificações relevantes para a integridade da saúde animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS SERPENTES DA FAUNA BRASILEIRA

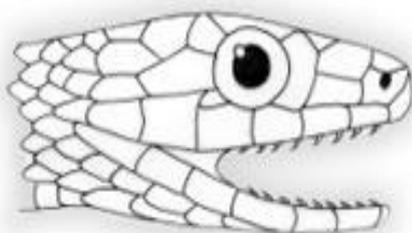
Pertencentes ao reino Animalia, as serpentes estão presentes praticamente em todo o mundo, constituindo o maior número de répteis vivos (HICKMAM et.al., 2004; ROBERTS; LARSON, 2004; OLIVEIRA NETO, 2015). São animais vertebrados, carnívoros e ectotérmicos e pertencem ao grupo dos répteis (INSTITUTO BUTANTAN, 2015) e cerca de 2.300 espécies de serpentes já foram descritas na literatura (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002).

No Brasil, diversos são os estudos acerca das famílias *Viperidae* (36 espécies) e *Elapidae* (39 espécies), pois são consideradas peçonhentas, ou seja, que possuem glândula produtora de veneno e aparelho inoculador, sendo responsáveis por cerca de 20 mil acidentes ofídicos anualmente no País (NERY, 2012).

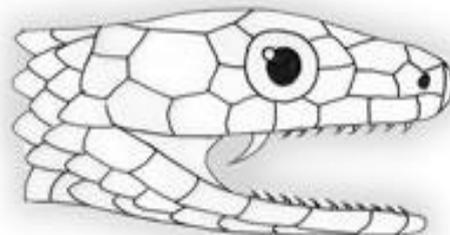
A família *Colubridae* Opperl, 1811, recentemente dividida em *Colubridae* e *Dipsadidae* Bonaparte, 1838, são consideradas a mais diversificada, pois compreende cerca de 65% das espécies de serpentes conhecidas no mundo (ZAHER, et al. 2009). Abrange espécies com dentições áglifas e opistóglifas, sendo estas últimas capazes de ocasionar acidentes com humanos, uma vez que possuem glândulas de Duvernoy (GD), responsáveis pela produção de secreção tóxica ou veneno; no entanto, são convencionalmente consideradas não peçonhentas.

Existem quatro tipos de dentição em serpentes que possibilitam a diferenciação das espécies peçonhentas e não peçonhentas, conforme os tipos de dentes e a localização das presas: áglifas, opistóglifas, proteróglifas e solenóglifas (MALGAREJO, 2003) (Figura 1 e 2).

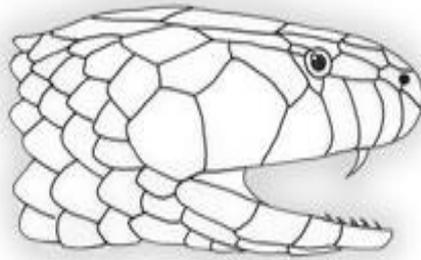
Figura 1 - Tipos de dentições das serpentes



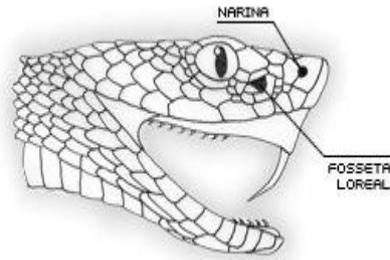
AGLIFA



OPISTÓGLIFA



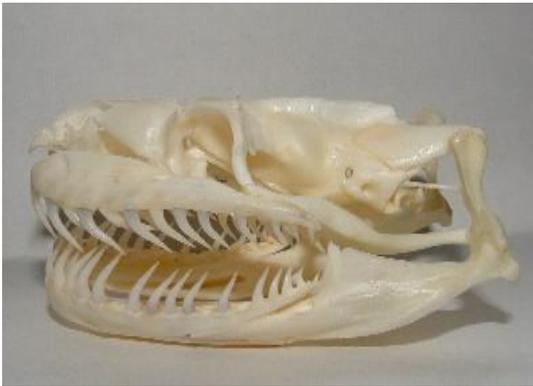
PROTERÓGLIFA



SOLENÓGLIFA

Fonte: Adaptado de <https://blogdonurof.wordpress.com/2010/09/03/sobre-o-tipo-de-denticao-das-serpentes/>

Figura 2 - Foto de crânios de serpentes de diferentes dentições



ÁGLIFA



OPISTÓGLIFA



PROTERÓGLIFA



SOLENÓGLIFA

Fonte: Internet. Adaptado de http://pt.wikipedia.org/wiki/Tipos_de_denti%C3%A7%C3%A3o_em_serpentes#

A ausência de dente especializado em inocular veneno caracteriza as áglifas. Seus dentes servem somente para rasgar tecidos e orientar a entrada da presa para o estômago. Encontrada principalmente nos animais da família *Boidae*. A dentição opistóglifa é característica nas serpentes da família *Colubridae*. Além dos dentículos, apresenta um par de dentes inoculadores localizados na região posterior do maxilar superior, que tem a finalidade de perfurar profundamente o tecido da presa e injetar o veneno produzido pela GD. A família *Elapidae* é caracterizada por possuir dentição proteróglifa, onde seu dente inoculador localiza-se na parte anterior da mandíbula. O mecanismo de mordida é simples, uma vez que a serpente morde e libera a peçonha pelo canal semi-aberto do dente. Serpentes com dentição solenóglifas são aquelas pertencentes a família *Viperidae*, que se caracteriza pela presença de duas presas especializadas, móveis e capazes de projetar uma mordida de abertura de 90 graus para frente.

2.2 ACIDENTES OFÍDICOS POR COLUBRÍDEOS

Os acidentes ofídicos constituem um dos maiores problemas de Saúde Pública na América Latina (CAMPBELL; LAMAR 1989, GUTIÉRREZ; LOMONTE 2003; WARRELL 2004), sendo atualmente classificados como doença negligenciada pela OMS (World Health Organization, 2014). Ocorrem cerca de 25 mil casos de acidentes ofídicos ao ano, sendo a maioria deles registrados como causados por serpentes da família *Viperidae* (SINAN, 2013).

Considera-se que os acidentes mais graves ocorrem em países pobres, geralmente de regiões tropicais e subtropicais. Ainda assim, nesses países há a possibilidade da notificação ser subestimada, sendo muitas vezes tratados com métodos ultrapassados e procedimentos não efetivos (ALBUQUERQUE et al., 2004). No Brasil, existem programas para contabilizar e acompanhar os casos de envenenamento, porém, sabe-se que a quantidade de casos é muito superior à quantidade registrada, devido, entre outros fatores, às dificuldades de acesso aos serviços de saúde, principalmente no campo (LEMOS et al., 2009).

Dentre os países latinos, o Brasil ocupa a 1ª colocação em números de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), justificada pela sua grande extensão territorial, sua elevada biodiversidade e pelo acompanhamento de programas nacionais. Foram registrados 103.422 acidentes ofídicos, com 464 óbitos entre os anos de 2010 a 2013 (SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2013), sendo segundo o Sinan, no ano de 2012, 19.946 casos de acidentes ofídicos em humanos no Brasil, sendo a família *Viperidae* envolvida em 82,7% dos casos, e a família *Elapidae*, em 0,9% (BRASIL, 2012).

Segundo Santos–Costa et al., (2001) levantamentos têm demonstrado que cerca de 20 a 40% dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por serpentes colubrídeas (SANTOS-COSTA et al., 2001; SALOMÃO et al., 2003), sendo os principais gêneros envolvidos *Helicops*, *Oxyrhopus*, *Thamnodynastes* e *Philodryas* (PUORTO; FRANÇA 2003).

Embora a literatura seja escassa em relação aos acidentes causados por serpentes opistóglifas, vários relatos ressaltam a importância de suas toxinas. Casos descrevendo a gravidade dos acidentes causados pelas *Philodryas olfersii* Lichtenstein, 1823 e *Philodryas patagoniensis* Girard, 1857 em humanos têm sido descritos (NISHIOKA; SILVEIRA 1994, ARAÚJO; SANTOS 1997, ROCHA et al., 2003), assim como a ocorrência de óbito (SALOMÃO; DI BERNARDO 1995).

O perfil epidemiológico dos acidentes causados por serpentes não peçonhentas foi traçado a partir de estudos, verificando-se que o número de relatos sobre picadas causadas por serpentes não peçonhentas aumentou consideravelmente, tornando-se um problema de saúde pública (BIGELLI et al., 2012). Segundo o autor, entre todos os acidentes registrados no país, 40% são causados por serpentes não peçonhentas.

Salomão et al. (2003) apresentam informações dos registros anuais do HVB e da Coleção, no período de 1959 a 1999, e encontram que a frequência dos acidentes por serpentes não peçonhentas varia de 23,5 a 40,5%, o que representa 1.923 acidentes por colubrídeos em um total de 6.445 acidentes ofídicos.

Segundo Oliveira et al., (2006) em estudo prospectivo realizado no período de julho e dezembro de 2007, com abordagem quantitativa de casos de acidentes com serpentes não peçonhentas, atendidos nos Centros de Assistência Toxicológica da Paraíba, 165 casos foram atendidos por acidentes ofídicos, sendo 51 (30,9%) causados por serpentes não peçonhentas. O gênero *Philodryas* foi o mais prevalente com 26 casos (50,9%), as espécies identificadas foram *Philodryas olfersii* (9,8%), *Philodryas nattererie* *Oxyrhopus trigeminus* em 2 casos (3,9%).

Levantamentos realizados em diversas outras partes do Brasil por SILVEIRA; NISHIOKA, (1992), CARVALHO; NOGUEIRA, (1998) e SANTOS-COSTA et al., (2001) relataram dados de que os acidentes por serpentes não peçonhentas correspondem a 19% em Uberlândia-MG, 56% em Cuiabá-MT e 38% em Porto-Alegre-RS, o que demonstra que esses acidentes têm sido subdimensionados e os dados publicados no Manual de Prevenção e Diagnóstico de Acidentes por Animais Peçonhentos do Ministério da Saúde provavelmente não refletem a situação real do número destes acidentes. Em cerca de 20% desses acidentes

por Colubrídeos, a serpente identificada como responsável pertencia ao gênero *Philodryas* (SALOMÃO *et al.*, 2003).

2.3 GÊNERO *Philodryas*

O gênero *Philodryas* Wagler, 1830 é composto por 22 espécies da subfamília Xenodontinae (Tribo Philodryadini) (UETZ; HOSEK, 2015), distribuídas amplamente na América do Sul tropical e temperada (FERRAREZZI, 1994; BISBY *et al.*, 2006).

No Brasil, estas espécies são encontradas em áreas das regiões Nordeste e Centro-Oeste e em toda a região Sudeste e Sul, estendendo-se até a Patagônia (HARTMANN; MARQUES, 2006).

2.3.1 Espécie *Philodryas nattereri*

Classificação

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Reptilia

Ordem: Squamata

Subordem: Serpentes

Família: Dipsadidae

Gênero: *Philodryas*

Espécie: *Philodryas nattereri*
Steindachner 1870

A serpente *Philodryas nattereri* Steindachner, 1870 (Figura 3) conhecida popularmente por “cobra de cipó, corre-campo ou cobra-tabuleiro” pertence à família Dipsadidae. Apresenta coloração verde-oliva com a porção final do corpo de cor castanho. Possui em média 1,20 cm a 1,60 cm de comprimento, olhos grandes com pupila redonda, muito veloz e com atividade diária muito intensa. Comparada a outras espécies, é considerada uma serpente de pequeno porte (VITT, 1994).

Figura 3 - *Philodryas nattereri* (“Cobra-tabuleiro”)



Fonte: Foto: P.C.M.D. de Mesquita

Encontra-se distribuída em regiões áridas e semiáridas da América do Sul, sendo mais comum na região Nordeste do Brasil (Ceará e Rio Grande do Norte) (Figura 4). Informações sobre a reprodução desta espécie são raras e consistem basicamente de tamanho das ninhadas e em algumas fêmeas presença de ovos no ovidutos, dimorfismo sexual e ciclo reprodutivo feminino. As fêmeas são maiores do que os machos. Provavelmente os machos produzem esperma continuamente ao longo do ano e as fêmeas ficam férteis durante nove meses, de fevereiro a outubro (MESQUITA, 2010).

Figura 4 -Distribuição geográfica da serpente no Brasil



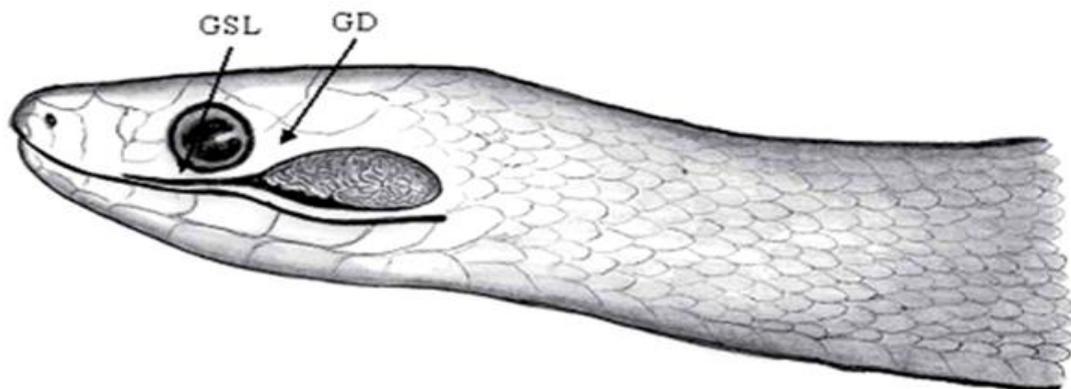
Fonte: Adaptado de:<http://www.google.com.br/imagens/mapas.NUROF-UFC>

A serpente *P. nattereri* apresenta glândulas tubulares complexas denominadas Glândulas de Duvernoy (GD) (TAUB, 1966) (Figura 5). São glândulas localizadas na região temporal, supralabial, atrás dos olhos, compostas principalmente de células serosas dispostas

em lóbulos que se abrem em um ducto lobular. Esta estrutura mostra ampla gama de variações, com transições desde a ausência da glândula até a presença de somente células serosas em glândulas totalmente diferenciadas (TAUB, 1966). Acredita-se que deva ter evoluído a partir da glândula supra-labial. É homóloga às verdadeiras glândulas de peçonha das proteróglifas e solenóglifas (KARDONG, 2002). Na *P. nattereri* está localizada na região pós-orbital inferior, aderida à musculatura de coloração rósea. Essa glândula apresenta forma ovulada, com superfície granular e coloração esbranquiçada, com a consistência firme à compressão (NERY, 2012). Morfologicamente, é considerada mista ou seromucosa, por ser composta por células mucosas e serosas, resultando em modificações estruturais que visam à secreção de veneno, uma substância rica em um complexo carboidrato-proteína. (AKAT et.al., 2011).

Uma importante característica da glândula é o modo pelo qual é armazenada a secreção produzida. Em grande parte é guardada no citoplasma das células secretoras. A liberação da secreção produzida pelas *Philodryas olfersii* ocorre somente após uma série de prostrações maxilares (SERAPICOS, 2006). Estudando a GD de *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, Serapicos (2006) viu que seus túbulos secretores apresentaram resultado positivo quanto à presença de proteínas, o que garante uma toxicidade maior à referida glândula.

Figura 5 – Esquema da Glândula de Duvernoy de *Philodryas* (GD); e da glândula supralabial (GSL)



Fonte: Serapicos, E.O.

2.4 VENENO DE SERPENTES

Estudos com venenos de serpentes têm possibilitado a elucidação de diversos processos bioquímicos e fisiológicos manifestados durante o envenenamento, bem como

contribuído sobremaneira na modelagem molecular de novos princípios ativos de drogas para os mais variados fins (MÉNEZ, 1998; GUTIÉRREZ, 2002).

A peçonha das serpentes é composta por várias substâncias, cuja proporção e características variam entre famílias, gêneros e entre as mesmas espécies. A composição da peçonha pode variar ainda em função da idade e do sexo do animal, hábitos alimentares, da distribuição geográfica, do caráter individual entre serpentes e sazonalidade. Exemplo disso ocorre nas fêmeas de *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*), que produzem cinco vezes mais peçonha do que os machos (FURTADO; TRAVAGLIA-CARDOSO; ROCHA *et al.*, 2006).

O veneno das serpentes contém componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que cerca de 90% são proteínas enzimáticas ou não enzimáticas, carboidratos, lipídios, amins biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (GUTIERREZ, 2002). Enquanto isso os componentes inorgânicos mais comuns são Ca^{++} , Cu^+ , Fe^{++} , K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Na^+ , P^+ , Co^{++} , e Zn^{++} sendo que alguns exercem função de mantenedores de estabilidade estrutural de certas proteínas, como as metaloproteinases, que são fatores hemorrágicos e outros funcionam como catalisadores em funções enzimáticas específica (NERY, 2012).

É importante ressaltar, também, que a intensidade dos sintomas após envenenamento está relacionada com a quantidade de peçonha inoculada, que por sua vez, depende do tamanho, da idade da serpente, como também do tempo em que foi alimentada.

Atualmente há um grande número de toxinas purificadas e caracterizadas a partir de venenos de serpentes, sobretudo de diversas espécies de *Bothrops* (THEAKSTON; KAMIGUTI, 2002). Dentre essas, o complexo enzimático das fosfolipases A2 (PLA2) e enzimas proteolíticas que interferem em processos hemostáticos têm sido intensamente investigados (KINI, 1997; ANDRIÃO-ESCRASO *et al.*, 1997; SMOLKA *et al.*, 1998).

2.4.1 VENENO DO GÊNERO *Philodryas*

Em contraste com a vasta literatura existente sobre as peçonhas de serpentes proteróglifas e solenóglifas, observa-se pouca investigação quanto à peçonha de serpentes opistóglifas. Portanto, a composição das secreções orais tóxicas de colubrídeos é pouco conhecida, apesar da grande diversidade de espécies de serpentes onde essas glândulas são descritas (ZINGALI *et al.*, 2011).

Várias enzimas têm sido detectadas em venenos de colubrídeos, as quais têm diversos mecanismos de ação convergindo em um papel biológico fundamental, uma vez que estas possivelmente atuam como secreções de digestão, contribuindo para a lubrificação e

também para a apreensão e morte de suas presas (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; HILL; MACKESSY, 2000). Algumas destas enzimas, típicas dos venenos de viperídeos e elapídeos, podem ou não estar presentes nos venenos de colubrídeos.

De acordo com os poucos resultados encontrados sobre a considerável potência do veneno, sugere-se que animais no grupo dos colubrídeos podem conter compostos com algumas semelhanças com o veneno de outras serpentes que possuem suas presas na região cranial. Os venenos das espécies *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, que foram estudados, parecem não ter um número de propriedades enzimáticas que são características da maioria de serpentes proteróglifas e solenóglifas (WEINSTEIN; KARDONG, 1994).

Minton e Wenstein (1987) demonstraram que os venenos de serpentes colubrídeas possuem ações tão complexas quanto os venenos de serpentes proteróglifas, diferindo apenas na quantidade de proteínas, sendo a dos colubrídeos menor.

Duas propriedades comuns às serpentes de ambas as famílias são as atividades hemorrágicas e de proteases caseinolíticas, e essas atividades são amplamente distribuídas entre colubrídeos (KORNALIK et al, 1978.; HIESTAND; HIESTAND, 1979; VEST, 1981b; SAKAI et al., 1983; VEST, 1988; ASSAKURA et al, 1992, 1994.; GLENN et al, 1992.; WEINSTEIN; SMITH, 1993). A ação hemorrágica do veneno de *Philodryas* pôde ser neutralizada pelo soro antibotrópico em estudos experimentais, sugerindo a presença de antígenos comuns aos venenos de colubrídeos e de algumas espécies de *Bothrops* (BRASIL, 1998; ASSAKURA et. Al., 1992; ROCHA, 2005). Porém, a soroterapia pode ser ineficaz ou até desencadear reações anafiláticas em acidentes ocorridos com outras espécies de colubrídeos (SILVEIRA & NISHIOKA, 1992; BUCARETCHI et.al., 1994; NISHIOKA & SILVEIRA, 1994).

Uma propriedade importante da peçonha da *Philodryas olfersii* é a formação de edema, sendo sua capacidade de formação três vezes maior do que no veneno de *Bothrops moojeni*, que possui uma grande atividade edematogênica. Não foi detectada atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2), mesmo em grandes concentrações de veneno. Não há presença de enzima pró-coagulantes ou do tipo trombina, já que não ocorreu coagulação nas substâncias testadas (ASSAKURA et al, 1994).

As manifestações mais comuns de envenenamento por *P. olfersii* são: dor local, edema, eritema, equimose e linfadenopatia regional com coagulação normal. Paralisia, insuficiência respiratória, hemorragia e morte também foram observadas. A gravidade do envenenamento parece ser maior em mordidas por *P. olfersii* do que pelas outras espécies do gênero, embora o baixo número de casos notificados não permita tirar uma conclusão a este

respeito. Do ponto de vista clínico, a reação local após envenenamento é semelhante ao observado em picadas por espécies do gênero *Bothrops* sp. (NICKERSON & HENDERSON, 1976; SILVA; BUONONATO, 1983, 1984) e pode resultar em soro tratamento inapropriado com seus riscos associados (NISHIOKA; SILVEIRA, 1994).

Peichoto *et. al.*, (2006) testaram o veneno da *P. patagoniensis* objetivando verificar sua capacidade de induzir alterações hematológicas e histopatológicas em ratos após ser administrado por vias intramuscular, subcutânea e intravenosa. Fragmentos de órgãos (cerebelo, cérebro, pulmão, fígado, rim e coração) foram coletados para exames histopatológicos. Observações histopatológicas mostraram hemorragia multifocal em cortes de cerebelo, de cérebro e de pulmão, severo acúmulo de capilar peritubular em cortes de rim e degeneração hidrópica em cortes de fígado, quando o veneno foi administrado intravenosamente. Quando administrado por via subcutânea os resultados foram similares ao anterior, com exceção da hemorragia cerebelar. Já por via intramuscular não foi observado hemorragia nem cerebral ou cerebelar. Os resultados sugerem que o veneno da *P. patagoniensis* induz moderadas mudanças histopatológicas em órgãos vitais de ratos. Essas mudanças começam em estádios iniciais do envenenamento e podem estar associadas com uma anormalidade comportamental ou funcional desses órgãos durante o envenenamento. Além disso, esses danos podem levar a sequelas permanentes (PEICHOTO, *et al.* 2006).

De acordo com Peichoto *et al.*, (2006) altos níveis plasmáticos da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram evidenciados, quando o veneno da *P. patagoniensis* foi administrado intravenosamente e subcutaneamente.

A atividade necrosante decorrente dos envenenamentos de serpentes viperídeas origina-se da ação de enzimas proteolíticas causando a destruição dos tecidos moles próximos ao local da picada (ROSENFELD 1971). Entre os envenenamentos causados por colubrídeos não tem sido descrita a atividade necrosante. Entretanto, Peichoto *et al.* (2004) determinaram esta atividade em veneno de *P. patagoniensis* o qual apresentou atividade Dose Mínima Necrosante (DMN) igual a 180,5 mg/rato. Os resultados apresentados por Rocha & Furtado (2007), mostraram que os venenos de *P. olfersii* (DMN = 79,1µg/ rato ± 3,9) e *P. patagoniensis* (DMN = 63,5 µg/rato ± 4,6) são capazes de causar pronunciada dermonecrose, sendo o veneno de *P. patagoniensis* o mais ativo.

O veneno da *P. nattereri* parece ser bastante ativo tanto quanto o da *P. olfersii* (SAZIMA; HADAD, 1992). No entanto, nos casos já relatados em experimentos executados *in vitro* e *in vivo*, os sinais locais e os sintomas causados por *P. olfersii* e *P. patagoniensis* exibem alguns efeitos semelhantes aos citados com a serpente *P. nattereri*, que mostram efeitos locais,

como dermonecrose, mionecrose e atividade edematogênica, além de alta atividade hemorrágica, que causam danos ao endotélio vascular pela perfuração da membrana basal das paredes dos vasos, atividade proteolítica, fibrinogenolítica e proeminente processo inflamatório. Peichoto et al. 2005, demonstra também, algumas alterações na homeostase, como a atividade de enzimas que hidrolisam componentes plasmáticos. Estas atividades em conjunto com aquelas que agem sobre a parede dos vasos sanguíneos levam a uma atividade hemorrágica, e podem resultar em sequelas permanentes ou até causar a morte de vítimas mordidas por estas serpentes (PEICHOTO *et al.*, 2005).

Dentre as alterações locais encontradas em envenenamentos por serpentes *P. nattereri* são comuns às mesmas desse gênero – dor, edema, hemorragia local e dermonecrose, podendo ocorrer também a degranulação de mastócitos, lesões musculares decorrentes da ação direta ou indireta de toxinas presentes na peçonha, além de alterações microcirculatórias, promovendo o início da resposta inflamatória e consequente infiltrado leucocitário para o local da inflamação (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2003).

Nery *et.al* (2014), com o objetivo de avaliar os efeitos renais do veneno da *P. nattereri* em um sistema de perfusão e caracterizar suas as possíveis alterações histológicas, utilizou diferentes concentrações do veneno(1 e 3 µg/mL) em rins isolados de ratos. Fisiologicamente, o órgão apresentou alterações, tais como uma diminuição da pressão de perfusão, na resistência vascular renal, fluxo urinário e na taxa de filtração glomerular, bem como uma diminuição do transporte de sódio e cloreto. Tais resultados concordam com aqueles encontrados na literatura acerca de *Bothrops marajoensis* (EVANGELISTA *et.al.*, 2010), *Bothrops insularis* (BRAGA *et.al.*, 2006), *Bothrops jararaca* (MONTEIRO; FONTELES, 1999) e *Bothrops jararacussu* (HAVT *et.al.*, 2010). Histologicamente, foi observada na concentração menor, de 1µg/mL, uma dilatação tubular principalmente no túbulo contorsido distal, alça de Henle, acúmulo de material proteináceo e sangue dentro dos túbulos; vasos e intertúbulos normais. Na de 3µg/mL, considerada a maior, visualizou-se uma evidente degeneração dos túbulos, presença de material proteináceo dentro dos túbulos e nos espaços de Bowman; glomérulos com alterações discretas e túbulos com alteração moderadas; porém não foi observado alteração nos vasos. Assim, o autor conclui que o veneno causou uma toxicidade no rim isolado, pois foi capaz de alterar parâmetros funcionais renais, além de ter promovido as alterações morfológicas.

Na literatura encontra-se relato acerca da relevante atividade edematogênica do veneno de *P. nattereri* em pata de ratos. A evolução do edema demonstrou ser uma ação rápida, sendo este bem pronunciado nas duas primeiras horas após a inoculação, atingindo seu

efeito máximo nesse tempo, quando a concentração foi de 10µg/mL. A regressão foi de forma gradativa até 24 horas. Na concentração de 3µg/mL, o edema apresentou comportamento semelhante ao grupo que recebeu a concentração maior (NERY, 2012).

A atividade miotóxica do veneno da *P. nattereri* foi observada por Nery *et. al.* (2014) em músculos de camundongos inoculados com doses de 50µg nos tempos de 2h, 4h, 24h e 48h. Demonstraram alterações como hemorragia em focos, edema, integridade da parte da fibra muscular e balonizada em menor número, presença de exsudato inflamatório e mionecrose nas duas primeiras horas. Após 4 horas de inoculação, permaneceu a hemorragia em focos; fibra muscular foi destruída focalmente e há presença de moderado exsudato inflamatório, que permanece até às 8 horas. Nas 24 e 48 horas, as fibras musculares apresentaram poucas alterações, com observação de regeneração do mesmo, além de exsudato inflamatório se apresentar discreto.

As frações podem ser protéicas (complexadas ou não). Dentre as diversas proteínas que compõem os venenos de serpentes, estão as fosfolipases A2, enzimas largamente distribuídas na natureza e extensivamente estudadas (DENNIS, 1994, MARCHI-SALVADOR, 2008). As PLA2 são as proteínas multifuncionais capazes de participar de diversos processos fisiológicos, tais como: remodelamento de membranas e digestão de fosfolipídios, dentro outros. Além disso, são enzimas mediadoras de vários processos inflamatórios (MARCHI-SALVADOR, 2008). Podem ser encontradas tanto em meio intracelular (citossol) apresentando alta massa molecular (85kDa), quanto em meio extracelular, como em muitos fluidos biológicos, particularmente em secreções pancreáticas, exudados inflamatórios e em venenos de répteis (serpentes e lagartos), insetos e artrópodes (ROSENBERG, 1990; ARNI; WARD, 1996; OWNBY 1999 e MARCHI-SALVADOR, 2008) e apresentam baixa massa molecular (12 a 15 kDa). Fosfolipases A2 de venenos de serpentes apresentam em sua estrutura primária de 120 a 123 aminoácidos que seguem o modelo de numeração da PLA2 de pâncreas bovino (RENETSEDER *et al.*, 1985).

De acordo com Nery (2012), o teor de proteína da peçonha da *P.nattereri* foi de 863,9µg/ mg de veneno, correspondendo a 86,3% do teor total de veneno desta espécie. Desta forma, subentende que seja menos protéico do que o da *B. jararaca*, o qual o teor protéico total corresponde a 100%. Este resultado se apresentou semelhante, quando comparado ao de outras espécies, tais como *P. olfersii* (923 µg/ mg), *P. patagoniensis* (814µg/ mg) e *Bothrops jararaca* (799µg/ mg). Nery (2012) realizou, ainda, a electroforese em gel de SDS-poliacrilamida e viu que o veneno da *P.nattereri* mostrou várias bandas de proteínas, variando

entre 45 kDa e 100 kDa; enquanto que a peçonha de *B. jararaca* tem bandas de proteína na gama de 45-210 kDa.

A espectrometria de ressonância nuclear (RMN) é considerada a técnica mais importante para uma investigação a nível molecular. Permite obter uma informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria, uma vez que existem relações muito próximas entre os dados obtidos por ¹H-RMN e o arranjo dos prótons na molécula em investigação (CORREIA *et al.*, 2001), propondo, em algumas vezes, a estrutura de uma molécula desconhecida. De acordo com Nery (2012), o espectro ¹H RMN de *P. nattereri* mostrou que o veneno há presença de péptidos, aminoácidos simples (fenólicos, compostos aromáticos e alifáticos) e derivados de aminoácidos representando os principais componentes do mesmo.

Um maior conhecimento acerca da composição do veneno se faz necessário, pois pode possibilitar uma compreensão maior acerca do poder de atuação do mesmo, uma vez que sua atividade farmacológica possa estar relacionada a mudanças estruturais das proteínas que o compõe.

O reconhecimento da importância do dano tecidual local e sistêmico por envenenamentos com serpentes do género *Philodryas* motiva um crescente número de estudos sobre sua patogênese, o que pode resultar em novas modalidades na terapêutica desses acidentes, assim como o conhecimento de mecanismos de injúria de células e tecidos que podem ser comuns a outras condições patológicas, além de proporcionar esforços para isolar toxinas específicas responsáveis por tal atividade (LOPES, 2008).

2.5 A PELE

A pele é o maior órgão de um organismo, atingindo 16% do peso corporal. Recobre toda a superfície do corpo e desempenha diversas funções, tais como: proteção contra lesões; colabora na termorregulação; função protetora contra a radiação ultravioleta; participa do processo de produção da vitamina D, dentre outras funções. Uma das mais importantes, devido à sua grande extensão e abundante inervação sensorial, é receber estímulos do meio ambiente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Por ser o meio de contato como meio interno do organismo, o tegumento serve como uma camada, protegendo os órgãos internos contra lesões e ou atritos superficiais. Possui terminações nervosas, que levam as informações sobre o meio ambiente para o sistema nervoso central. Localizado na parte profunda da epiderme, apoiadas na membrana basal e presas aos queratinócitos por meio de desossomos; as células de Merkel são mecano-

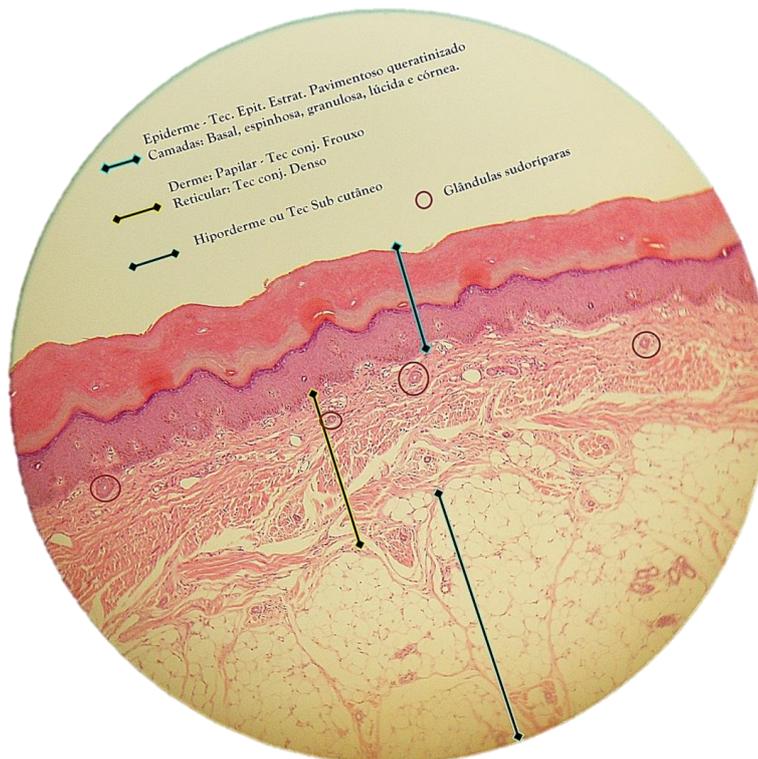
receptores, para a sensibilidade táctil. Existe uma estrutura em forma de disco, em contato com a base destas células, onde se inserem fibras nervosas aferentes, que conduzem impulsos para o sistema nervoso central (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Por meio de seus vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e tecido adiposo, a pele participa da termorregulação corporal. É ela quem produz e armazena a melanina, um pigmento responsável pela proteção contra os raios ultravioleta. Os melanócitos, presentes na junção da derme com a epiderme ou entre os queratinócitos da camada basal da epiderme, são as células responsáveis pela síntese de melanina. Tal síntese ocorre com a participação da enzima tirosinase. Devido a sua ação, o aminoácido tirosina é transformado em dopa, que por sua vez, produz a dopa-quinona que, após várias transformações, converte-se em melanina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Por sua vez, os raios solares agem sobre precursores sintetizados no organismo, fazendo com que a pele produza vitamina D (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A sua morfologia é dividida em três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 6).

Figura 6- Fotomicrografia de pele grossa, evidenciando todas as camadas da pele e glândulas sudoríparas



Fonte: Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

2.5.1 Epiderme

De acordo com Junqueira e Carneiro (2013), a epiderme tem origem mesodérmica, constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. É composto basicamente por diferentes células epiteliais, onde os queratinócitos são os mais abundantes, cerca de 90% e quem formam a queratina. Os outros tipos de células são os melanócitos, constituindo cerca de 5% das células presentes na epiderme responsáveis pela produção de melanina; as células de Langerhans e as de Merkel, constituindo juntas os outros 5% responsáveis pela proteção e função sensorial, respectivamente.

A espessura e a estrutura da epiderme podem variar de acordo com o local no organismo. Ela é mais espessa e complexa na palma da mão e na planta dos pés. Nestes lugares, é constituída por cinco camadas que se distribuem, da derme papilar para a superfície epidérmica, da seguinte forma (Figura 7):

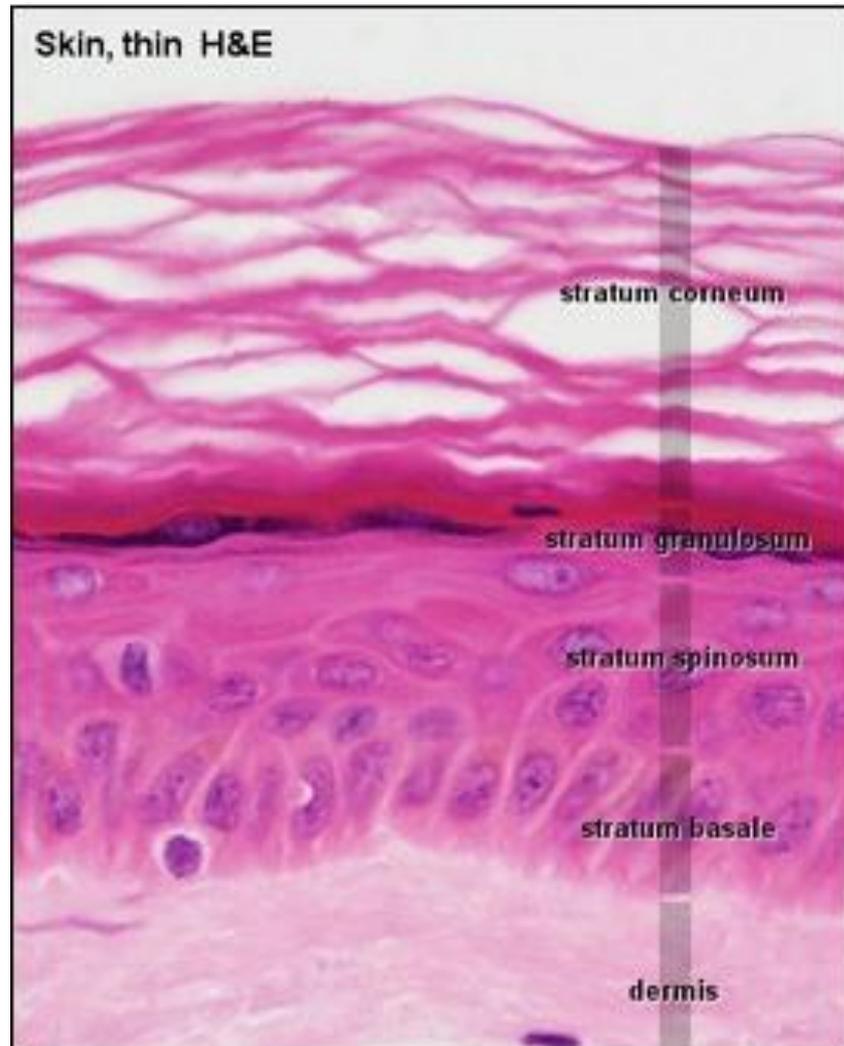
1. **Camada Basal:** as células são prismáticas ou cubóides e basófilas; separando a epiderme da derme. Também pode ser chamada de germinativa. Responsável juntamente com a próxima camada (a espinhosa), pela renovação constante da epiderme, pois apresenta intensa atividade mitótica.
2. **Camada Espinhosa:** as células são cubóides ou ligeiramente achatadas. Possui os tonofilamentos, que são feixes de filamentos de queratina presentes nas curtas expansões entre os citoplasmas. Tais expansões citoplasmáticas se aproximam e se mantem unidas com as células vizinhas através de desmossomos, o que dá a cada célula um aspecto espinhoso. Os filamentos de queratina, bem como os desmossomos, têm papel importante na manutenção da coesão entre as células de epiderme e na resistência ao atrito.
3. **Camada Granulosa:** Nesta camada encontram-se os grânulos de queratohialina no citoplasma das células que se encontram em fileiras e possuem formato poligonais achatadas e possuem núcleo central. Outra característica desta camada é a presença dos grânulos lamelares que são células que contem discos lamelares formados por bicamadas lipídicas e são envoltos por membrana. Eles se fundem com a membrana plasmática e expulsam seu conteúdo para o espaço intercelular da camada granulosa, onde o material lipídico se deposita, indo contribuir para formar uma barreira contra a

penetração de substâncias e tornar a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo.

4. **Camada Lúcida:** Constituída por uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas e translúcidas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas dos lisossomos e desapareceram. Há inúmeros filamentos de queratina no citoplasma, nos quais são compactados e envolvidos por material elétron-denso. Ainda apresenta desmossomos entre as células.
5. **Camada Córnea:** As células são achatadas, mortas e sem núcleos. Há presença de muita queratina no citoplasma destas. Os queratinócitos possuem variação de peso molecular à medida que se diferenciam. As células da membrana basal apresentam queratina de baixo peso molecular, enquanto que os queratinócitos mais diferenciados sintetizam queratinas de maior peso molecular. Nesta camada, os queratinócitos já estão transformados em placas sem vida e descamam continuamente.

Na pele mais fina, a epiderme é mais simples, faltando as camadas granulosa e lúcida, e apresentando uma camada córnea muito reduzida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 7- Fotomicrografia de pele fina no aumento total de 400x, aparato em H.E



Fonte: Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

2.5.2 Derme

É constituída de tecido conjuntivo e faz a união da pele ao tecido subcutâneo ou hipoderme. Possui saliências na superfície externa irregular, chamadas de papilas dérmicas. Estas aumentam a área de contato da derme com a epiderme, reforçando a união entre essas duas camadas. Além de vasos sanguíneos e linfáticos e de nervos, também são encontrados: folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas; que são estruturas derivadas da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A derme é constituída por duas camadas, onde seus limites são poucos distintos: a papilar e a reticular.

- 1. Camada Papilar:** é a mais superficial e delgada. É constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas. Presença de fibrilas especiais de colágeno, que se inserem por um lado na membrana basal e pelo outro penetram profundamente na derme. São essas fibrilas que contribuem para prender a derme à epiderme.
- 2. Camada Reticular:** é a mais profunda e espessa. É constituída por tecido conjuntivo denso não modelado. Assim como a papilar, contem muitas fibras do sistema colágeno e elástico, responsável pela elasticidade da pele.

2.5.3 Hipoderme

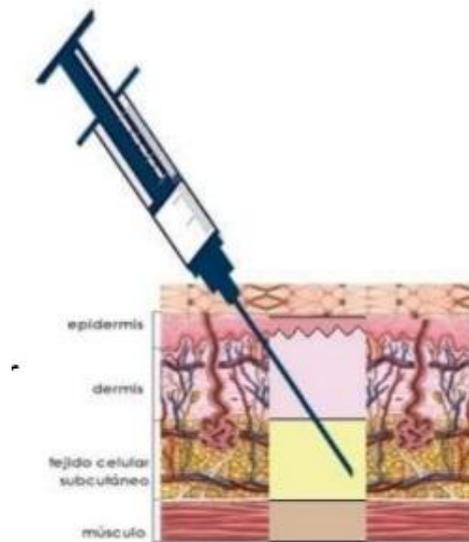
Formado por tecido conjuntivo frouxo, que une a derme aos órgãos subjacentes. É nela que se encontra o panículo adiposo, que é uma camada desenvolvida constituída de tecido adiposo unilocular. O panículo adiposo modela o corpo e é uma reserva de energia que proporciona proteção contra o frio (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

2.6 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

A via de administração é o caminho pelo qual um medicamento é levado ao organismo para exercer o seu efeito. Existem dois tipos: administração enteral e parental.

A parental é a forma de se administrar uma droga ou medicamento no ser vivo evitando o contato direto com o trato gastrointestinal. Dentre as suas diversas formas de administração, a via cutânea é aquela que consiste na administração de medicamentos através da pele, podendo ser: via intradérmica ou subcutânea. A injeção subcutânea (ISC) se dá através da inoculação nos tecidos adiposos, debaixo da pele, onde o produto inoculado move-se mais rapidamente para a corrente sanguínea do que por via oral (Figura 6). A ISC permite uma administração medicamentosa mais lenta e gradual que a injeção intramuscular, visto que a sua absorção é feita principalmente através dos capilares, provocando também um ligeiro traumatismo dos tecidos. Tem como vantagem a facilidade de produzir sensibilização e, ainda, dor e necrose, quando utilizadas substancias irritantes (SPINOSA *et al.*, 1999).

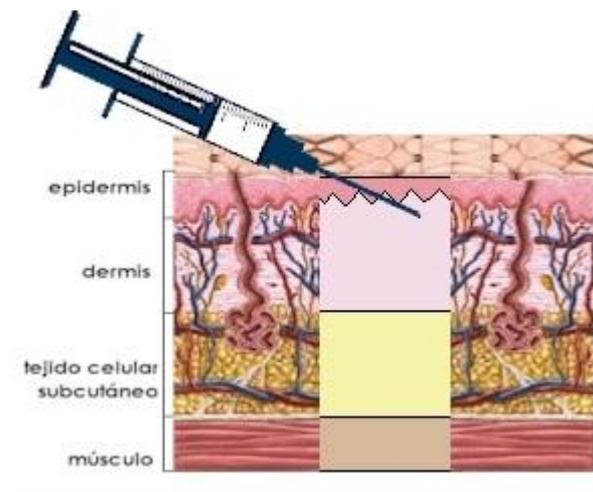
Figura 8 – Esquema da inoculação via subcutânea (ISC)



Fonte: Internet. <http://slideplayer.com.br/slide/398338/>

A Injeção Intra-Dérmica (ID) é usada principalmente para fins de diagnóstico, tais como a prova de tuberculina e os testes de alergia. A inoculação do produto se dá dentro das camadas mais externas da pele (Figura 7). Por haver baixa absorção sistêmica dos agentes injectados, este tipo de injeção é usado principalmente para produzir um efeito local (LIMA,2008).

Figura 9 – Esquema da injeção intra-dérmica(ID).



Fonte: Internet. <http://slideplayer.com.br/slide/398338/>

3 JUSTIFICATIVA

Assim como os venenos de serpentes das famílias Viperidae e Elapidae, os venenos de colubrídeos também são uma rica fonte de novos compostos e ferramentas científicas. Logo, constituem um vasto campo para a pesquisa e isolamento de substâncias com potencial farmacológico ou outras aplicações em diversas áreas da medicina humana e animal.

Portanto, diante do número significativo de acidentes ofídicos, da similaridade deste veneno estudado com de outras serpentes locais e regionais e, sobretudo da escassez de publicação científica a cerca de venenos de algumas serpentes, notadamente as da nossa região nordeste, este estudo se justifica pela possibilidade de elucidar a ação morfofisiológica do veneno da serpente *Philodryas nattereri*. Não apenas para conhecer seus efeitos biológicos, mas também para que medidas terapêuticas possam ser tomadas com mais especificidade no tratamento de envenenamentos, e a possibilidade da utilização como ferramenta morfofisiofarmacológica de um constituinte isolado deste veneno.

Essa dissertação se enquadra na linha de pesquisa em sanidade animal visando a um estudo morfológico com ênfase nas alterações que acometem a arquitetura histológica tegumentar, promovidas pelo veneno desta serpente em estudo, a fim de determinar as suas alterações histológicas e propiciar o melhor soro antiofídico a vítima após o acidente ofídico.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O veneno da serpente *Philodryas nattereri* provoca alterações morfológicas em pele de camundongos. Pressupõe-se que tais modificações são relevantes para a integridade da saúde do animal e para compreender o mecanismo de ação do mesmo, bem como dos seus constituintes.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

- a) Verificar os efeitos morfofisiológicos do veneno total da *Philodryas nattereri* em pele camundongos.

5.2 ESPECÍFICOS

- a) Observar as alterações macroscópicas de pele de camundongos inoculadas pelo veneno total de *P. nattereri*;
- b) Verificar as alterações histológicas provocadas pelo veneno total *P. nattereri* na pele de camundongos;
- c) Contribuir para o avanço nos estudos toxinológicos, notadamente no que se refere a seus efeitos biológicos com fins terapêuticos e/ou industriais.

6 CAPÍTULO 1

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE PELES DE CAMUNDONGOS INOCULADOS
COM O VENENO TOTAL DA SERPENTE *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)**

**MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN MICE SKINS INOCULATED WITH THE
TOTAL SNAKE VENOM OF *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)**

**LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN LA PIEL DEL RATONES
CAUSADAS POR EL VENENO DE LA SERPIENTE *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)**

Periódico: Veterinária e Zootecnia (Submetido em 05 de junho de 2015).

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE PELES DE CAMUNDONGOS INOCULADOS
COM O VENENO TOTAL DA SERPENTE *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)**

**MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN MICE SKINS INOCULATED WITH THE
TOTAL SNAKE VENOM OF *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)**

**LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN LA PIEL DEL RATONES
CAUSADAS POR EL VENENO DE LA SERPIENTE *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)**

Rebeca Horn VASCONCELOS¹, João Alison de Moraes SILVEIRA², Glayciane Bezerra de MORAIS¹, Joselito de OLIVEIRA NETO¹, Francisco Antonio Felix XAVIER JUNIOR¹, Karen Denise da Silva MACAMBIRA¹, Natacha Teresa Queiroz ALVES², Roberta da Rocha BRAGA³, Diva Maria BORGES-NOJOSA³, Celia Maria de Souza SAMPAIO⁴, Helena Serra Azul MONTEIRO², Janaina Serra Azul Monteiro EVANGELISTA¹

1 Laboratório de Histologia dos efeitos causados pelos venenos de serpentes e plantas – HISTOVESP. Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. Brasil.

2 Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas- LAFAVET. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil.

3 Núcleo Regional de Ofiologia- NUROF. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Brasil

4 Coordenação de Ciências Biológicas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. Brasil.

Correspondência: Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE. CEP: 60714-903. Telefone: (85) 3101 9889. E-mail: janainaserrazul@gmail.com

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE PELES DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM O VENENO TOTAL DA SERPENTE *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)

RESUMO

Venenos de serpentes são compostos por substâncias ativas complexas, sendo a maioria delas de natureza proteica, causando diversos efeitos no ser humano e em animais domésticos, podendo levar ao óbito. A serpente popularmente conhecida como Corre-campo é nativa na região do Nordeste, sendo encontrada em todo o estado do Ceará e é denominada *Philodryas nattereri*. Esse estudo teve por objetivo conhecer as alterações morfofisiológicas de pele de camundongos após inoculação com o veneno total desta serpente. Os animais foram distribuídos em três grupos, sendo que dois receberam concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL, inoculados via subcutânea, e um terceiro grupo recebeu 40 µg/mL do veneno via intradérmica. Os resultados macroscópicos mostraram a presença de uma crosta na região inoculada, bem como a presença de hemorragia, tal atividade foi confirmada por achado histopatológico. Microscopicamente, todos os grupos experimentais apresentaram infiltrado inflamatório linfoblástico e de polimorfonucleares, hemorragia, edema, e presença de fibrose. O veneno da serpente *Philodryas nattereri* alterou a arquitetura normal do tegumento. Nossos resultados corroboraram em demonstrar tais alterações, uma vez que esta substância tóxica de origem animal, presente na nossa biodiversidade nordestina apresenta poucos dados na literatura, sendo desta forma, uma importante ferramenta para estudos das alterações morfofisiológicas de pele.

PALAVRAS-CHAVE: Peçonha. Pele. Histopatologia.

MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN MICE SKINS INOCULATED WITH THE TOTAL SNAKE VENOM OF *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)

ABSTRACT

Snake venoms are composed of complex active substances, most of them of protein nature, causing various effects on humans and domestic animals and can lead to death. The snake popularly known as Run-field is native to the Northeast region, found throughout the state of

Ceará and is called *Philodryas nattereri*. This study aimed to know the morphological and physiological changes in the skin of mice after inoculation with the whole venom of this snake. The animals were divided into three groups, two of which received concentrations of 20 µg / mL and 40 µg / mL, inoculated subcutaneously, and a third group received 40 µg / mL poison intradermally. The macroscopic results showed the presence of a crust in the inoculated area, and the presence of bleeding, this activity was confirmed by histopathological analysis. Microscopically, all experimental groups had lymphoblastic and polymorphonuclear inflammatory infiltration, hemorrhage, edema, and fibrosis. The venom of the snake *Philodryas nattereri* altered the normal integument architecture. Our results corroborate to demonstrate such changes, since this toxic substance of animal origin present in our Northeast biodiversity presents few literature data, thereby being an important tool for the study of morphological and physiological changes in the skin.

KEYWORDS: Poison. Skin. Histopathology

**LAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN LA PIEL DEL RATONES
CAUSADAS POR EL VENENO DE LA SERPIENTE *Philodryas nattereri* (Dipsadidae)**

RESUMEN

Los venenos de serpiente se componen de sustancias activas complejas, la mayoría de ellos de naturaleza proteica, provocando diversos efectos sobre los seres humanos y los animales domésticos, y pueden llevar a la muerte. La serpiente popularmente conocido como Run-campo es nativa de la región Nordeste, que se encuentra en todo el estado de Ceará y se llama *Philodryas nattereri*. Este estudio tuvo como objetivo conocer los cambios morfológicos y fisiológicos en la piel de ratones después de la inoculación con todo el veneno de esta serpiente. Los animales fueron divididos en tres grupos, dos de los cuales recibieron concentraciones de 20 µg / ml y 40 µg / mL, inoculados por vía subcutánea, y un tercer grupo recibió 40 µg / ml veneno por vía intradérmica. Los resultados macroscópicos mostraron la presencia de una costra en el área inoculada, y la presencia de sangrado, esta actividad se confirmó por análisis histopatológico. Microscópicamente, todos los grupos experimentales

tuvieron infiltración linfoblástica y polimorfonucleares inflamatoria, hemorragia, edema y fibrosis. El veneno de la serpiente *Philodryas nattereri* altera la arquitectura normal tegumento. Nuestros resultados corroboran para demostrar tales cambios, ya que esta sustancia tóxica de origen animal presente en nuestra biodiversidad Northeast presenta pocos datos de la literatura, siendo por lo tanto una herramienta importante para el estudio de los cambios morfológicos y fisiológicos en la piel.

PALABRAS CLAVE: Venom. Piel. Histopatología.

INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos constituem um dos maiores problemas de Saúde Pública na América Latina¹, sendo atualmente classificados como doença negligenciada pela OMS (World Health Organization, 2014). Apesar da incidência mundial e de sua gravidade serem desconhecidas, estima-se que ocorra cerca de 2.500.000 casos de envenenamentos por serpentes peçonhentas ao ano, o que resulta em, aproximadamente, 125.000 mortes e inúmeros casos resultam em sequelas graves².

Dentre os países latinos, o Brasil ocupa a 1ª colocação em números de casos, justificada pela sua grande extensão territorial³, por sua elevada biodiversidade e pelo acompanhamento de programas nacionais. Foram registrados 103.422 acidentes ofídicos, com 464 óbitos entre os anos de 2010 a 2013, sendo segundo o SINAN, no ano de 2012, 19.946 casos de acidentes ofídicos em humanos no país⁴.

O Brasil possui uma das mais ricas faunas de serpentes do Planeta, sendo conhecidas 426 espécies, pertencentes atualmente a dez famílias: Aniliidae (01 espécie), Anomalepididae (07), Boidae (13), Colubridae (38), Dipsadidae (267), Elapidae (39), Leptotyphlopidae (16), Tropidophiidae (3), Typhlopidae (6) e Viperidae (36). Dessas, 19,4% (75 espécies) são consideradas peçonhentas e são responsáveis por cerca de 20 mil acidentes ofídicos anualmente no País⁷. Apesar disto, levantamentos têm demonstrado que cerca de 20 a 40% dos acidentes ofídicos no Brasil são causados por serpentes colubrídeas^{5,6}.

As serpentes da família Colubridae, gênero *Philodryas* são consideradas não peçonhentas⁸. No entanto, alguns casos de envenenamento humano têm sido relatados na literatura⁹. A baixa incidência de acidentes causados por *Philodryas* é devido à anatomia dos dentes inoculadores (localizados na região posterior do maxilar), o que dificulta injetar o veneno, além do seu comportamento não agressivo¹⁰.

O veneno produzido pelas serpentes são compostos por toxinas. Existe uma grande variedade de estruturas tóxicas decorrente da evolução das espécies. Assim, cada espécie de serpente possui seu veneno com a sua composição química característica, levando a uma variação dos efeitos do mesmo no organismo humano.

A pele é o primeiro órgão que entra em contato com o veneno, uma vez que todo e qualquer acidente ofídico ocorre pela inoculação da peçonha na mesma. Tem a função de proteção (não só dos raios ultravioleta através da melanina, como protege contra a perda de água e contra o atrito); colabora na termorregulação do corpo; além de participar do processo de excreção de várias substâncias¹¹.

A despeito da grande diversidade de serpentes opistóglifas brasileiras é escasso o conhecimento das propriedades bioquímicas e farmacológicas de seus venenos, e considerando a importância dos acidentes ofídicos causados pelas serpentes do gênero *Philodryas* o objetivo deste trabalho foi de estudar os efeitos biológicos do veneno total da *Philodryas nattereri* (*P. nattereri*). Para este fim, foram observadas as alterações macroscópicas e histológicas provocadas pelo tal, inoculados via subcutânea em peles de camundongos nas concentrações de 40µg/mL e 20µg/mL e, por via intradérmica na concentração de 40µg/mL.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Veneno

O veneno total foi extraído e gentilmente cedido pelo Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, Brasil (Cadastro Técnico Federal nº 480572). O veneno foi liofilizado e mantido a temperatura de -20°C até o momento de sua utilização, onde foi diluído em solução salina (0,9%, w/v solução de NaCl).

Animais experimentais

Camundongos machos Swiss (20-30g), foram mantidos em alojamento com temperatura controlada, umidade relativa do ar 65,3 % e 12 h claro/escuro, receberam água e comida *ad libitum*. Os animais e os protocolos de pesquisa utilizados neste estudo estão de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará – UECE, número de protocolo 2669326/2014.

Protocolo Experimental

Foram utilizados 34 camundongos, pesando aproximadamente 25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram distribuídos em dois grupos: inoculados via subcutânea e via intradérmica. O grupo que utilizou a via subcutânea foi dividido em três subgrupos, nos quais, 08 animais receberam a concentração de 40 µg/mL (Grupo A); 08 animais receberam 20 µg/mL (Grupo B) e 06 animais formam o grupo controle (Grupo C), recebendo solução salina. Aqueles que formam o grupo inoculado via intradérmica foram divididos em dois subgrupos, sendo que 08 animais receberam a concentração de 40 µg/mL (Grupo D) e 06 animais formaram o grupo controle (Grupo E). As concentrações estão de acordo com estudos encontrados na literatura¹².

Antes dos experimentos os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico de 8 horas. Posteriormente foram anestesiados com xilazina e quetamina por via intraperitoneal (i.p) com a dose de 0,1mL/10g e a analgesia foi feita com 0,1mg/kg de tramadol. Em seguida ocorreu a tricotomia na região do dorso, em que ocorreu a inoculação utilizando agulhas hipodérmicas em seringas de insulina as diferentes concentrações do veneno total.

Após um intervalo de duas horas, 50% dos animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical, em seguida foram retirados fragmentos de pele de aproximadamente 1,5 cm² da região do dorso com auxílio de *punch*, para verificar a atividade hemorrágica. Os outros animais do grupo foram mantidos vivos, com água e ração a vontade por um período de 72h, quando foram eutanasiados e sua pele retirada para análise da atividade de necrose (adaptado¹³). Desta forma, sendo os parâmetros avaliados: presença de edema na derme, organização dos tecidos conjuntivos frouxo e denso, neoformação vascular, integridade do epitélio e presença de hemorragia e infiltrado inflamatório. Para eutanásia os animais foram previamente anestesiados e procedeu-se o deslocamento cervical. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos específicos para resíduo biológico e

congeladas para posterior coleta pela empresa responsável pelo descarte de material biológico da Universidade Estadual do Ceará.

Análise Macroscópica e Microscópica

O local da aplicação do veneno na pele foi fotografado por uma câmera fotográfica da marca Sony, modelo Cyber Shot 16.1 megapixels, para análise macroscópica. Para análise histológica, os fragmentos da pele foram acondicionados em frascos contendo solução de formol tamponado a 10% por um período de 24 horas. Em seguida esses fragmentos foram lavados em água corrente por uma hora para eliminação de resíduos de formol. Posteriormente os mesmos foram transferidos para o etanol a 70% permanecendo imerso nesta substância por um período de 24 horas, sendo iniciado o processo de desidratação em sucessivas diluições crescentes de etanol. Posteriormente passaram pelo processo de diafanização, parafinização e em seguida foram levados para corte no micrótomo na espessura de 3 μ m. Procedeu-se a coloração do material por Hematoxilina-Eosina (HE) e, posteriormente novas lâminas receberam a coloração Tricômio de Masson para observação da distribuição de fibras colágenas. As lâminas foram analisadas em microscopia de luz (MOTIC BA310, Moticam 2000).

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média, onde n representa os números de experimentos. Foi considerada diferença estatística significativa os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Os dados histológicos obtidos foram considerados Não-Paramétricos e, para tanto, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis, para análise de significância da diferença entre as médias.

RESULTADOS

Efeito macroscópico da exposição ao veneno de *P.nattereri*

Duas horas após a inoculação do veneno, observou-se a formação de uma crosta, bem como uma hemorragia nos três grupos inoculados com veneno, sendo mais evidente no grupo que recebeu via subcutânea uma concentração de 40 μ g/mL (Figura 1C). Após eutanásia, a hemorragia foi considerada intensa, observando macroscopicamente a superfície interna da

pele (Figura 1B e Figura 1D). Estes resultados se apresentaram em todos os grupos, exceto o controle (Figura 1A).

Análise histológica da pele corada por HE inoculada com veneno de *P. nattereri*

O grupo controle mostrou apenas pontos de infiltrado inflamatório, classificados como discreto (Figura 2A). As alterações histológicas se apresentaram em todos os grupos, em ambas as vias de administração, de maneira crescente e dose dependente, quando comparada ao grupo controle.

Presença de intenso infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos, no grupo A que foi eutanasiado com 02 horas. Passou a ser moderada nos animais que foram eutanasiados nas 72 horas após inoculação. No grupo B, as células inflamatórias tiveram uma intensidade moderada nos animais eutanasiados em 72 horas. Aqueles que foram eutanasiados com 02 horas após inoculação apresentaram uma discreta intensidade. O mesmo ocorreu com o grupo D, com a presença de plasmócitos e mastócitos. Desta forma, todos os grupos que receberam concentrações de venenos apresentaram uma média moderada para infiltrado inflamatório (Tabela 1).

Hemorragia foi observada macroscopicamente após as 02 primeiras horas de inoculação, sendo confirmada microscopicamente, visto que ela se mostrou intensa em todos os grupos, sendo a grupo A de maior intensidade (Figura 2A) próximo a camada muscular. Nos animais eutanasiados com 72 horas, a atividade hemorrágica se manteve presente microscopicamente, porém sua intensidade passou a ser leve, e, em cada grupo, observou-se um animal com tal atividade ausente. A média apresentou-se moderada para a hemorragia em todos os grupos, exceto os controles (Tabela 1).

O halo necrótico foi de grau leve e em apenas nos animais eutanasiados com 72 horas do grupo A. Nos demais grupos, esta atividade esteve ausente (Tabela 1).

Presença de edema em todos os animais do grupo A, variando em todos os graus, dando uma média intensa. No grupo B, um animal não apresentou edema, porém os outros se apresentaram de forma intensa. Assim como tal, o grupo D também apresentou um animal com ausência de edema, porém nos demais animais do grupo, a atividade foi moderada (Tabela 1).

Observou-se em todos os grupos, exceto controle, neovascularização na derme reticular e vasos congestos próximos a musculatura.

Análise histológica da pele corada por Tricômio de Masson inoculada com veneno de *P. nattereri*

A fibrose apresentou-se de forma intensa em todos os animais do grupo A (Figura 4B e 4D), exceto um animal que apresentou atividade leve. Os animais do grupo B (Figura 4C), que receberam a concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apresentaram uma média de fibrose variando de leve a intensa, ficando uma média moderada. Para o grupo D, um animal não apresentou tal atividade, porém nos demais animais a fibrose foi mais intensa, justificando, assim, uma média intensa para o grupo (Tabela 1).

FIGURAS

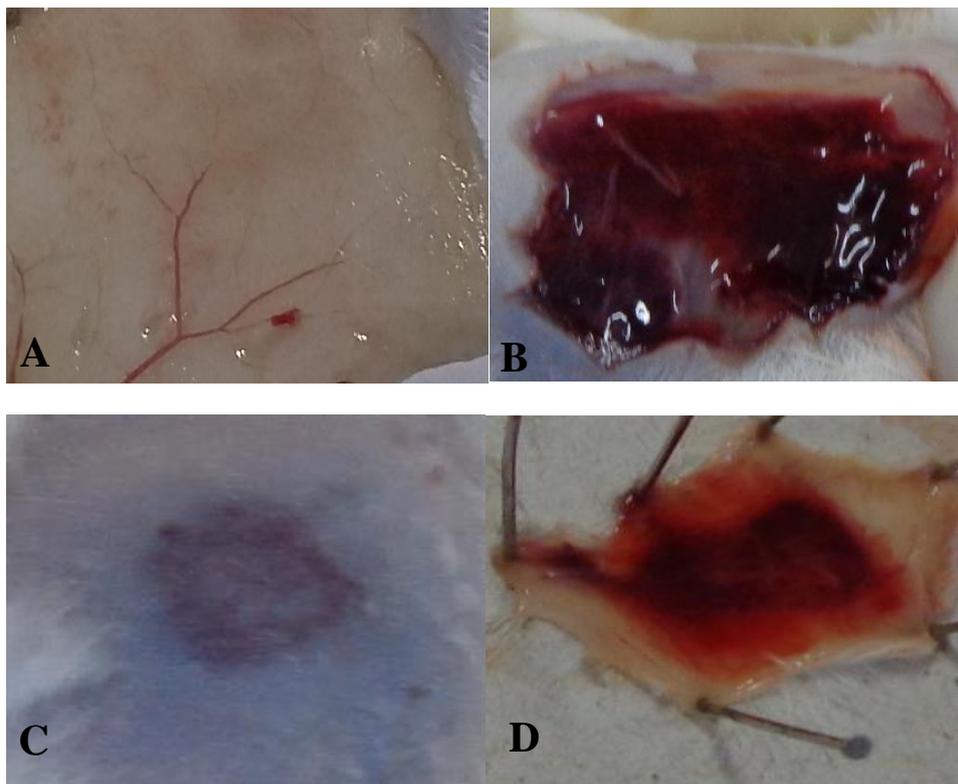


Figura 1 – Aspectos macroscópicos de cortes representativos de tegumento exposto ao veneno total da *P. nattereri* no local da inoculação A –Grupo controle via SC. B – Hemorragia macroscópica no grupo B, concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, via SC. C-Grupo A, região do dorso 2h após inoculação de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ via SC. D- Grupo D, hemorragia macroscópica onde foi inoculado via ID, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

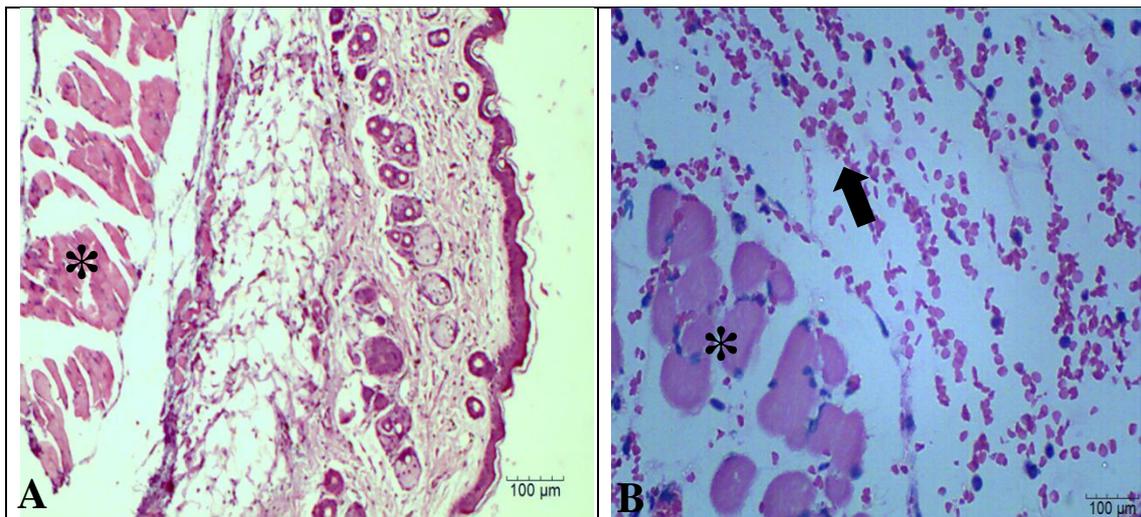
TABELAS

Tabela 1: Efeitos citotóxicos do veneno de *Philodryas nattereri* em diferentes concentrações e vias de administração sobre a pele do dorso de camundongos

Grupos experimentais	Infiltrado inflamatório	Hemorragia	Necrose	Edema	Fibrose
GA- 40 µg/mL SC	2	2	1	2	3
GB- 20 µg/mL SC	2	2	0	3	2
GC- Controle SC	1	0	0	0	0
GD- 40 µg/mL ID	2	2	0	2	3
GE- Controle ID	1	0	0	0	0

0-AUSENTE 1-LEVE OU DISCRETA 2- MODERADA 3- INTENSA

FOTOMICROGRAFIAS



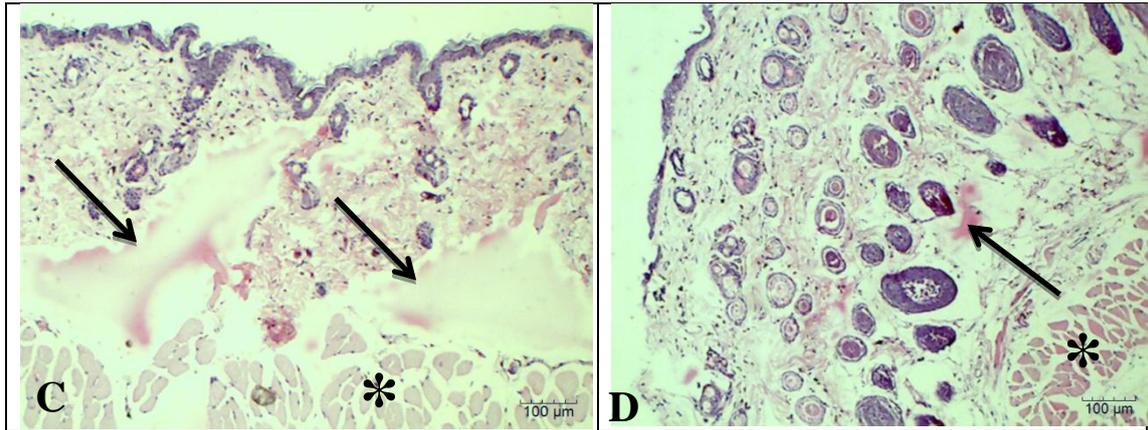


Figura 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos da região da pele (derme profunda) do dorso de camundongos exposta ao veneno total na concentração de $40 \mu\text{g}$ via SC da *P. nattereri* (H&E). Em A– Grupo controle, aumento de 100x. B- presença de hemorragia, aumento de 400x. C- Formação de edema, aumento de 200x. D - Presença de edema, descontinuidade de epiderme, acúmulo de fibras colágenas, aumento de 100x. (*) Camada muscular subcutânea (**■**) Hemorragia (**→**) edema. Microscópio Trinocular Motic® BA310 (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) e software Motic Image Plus 2.0.

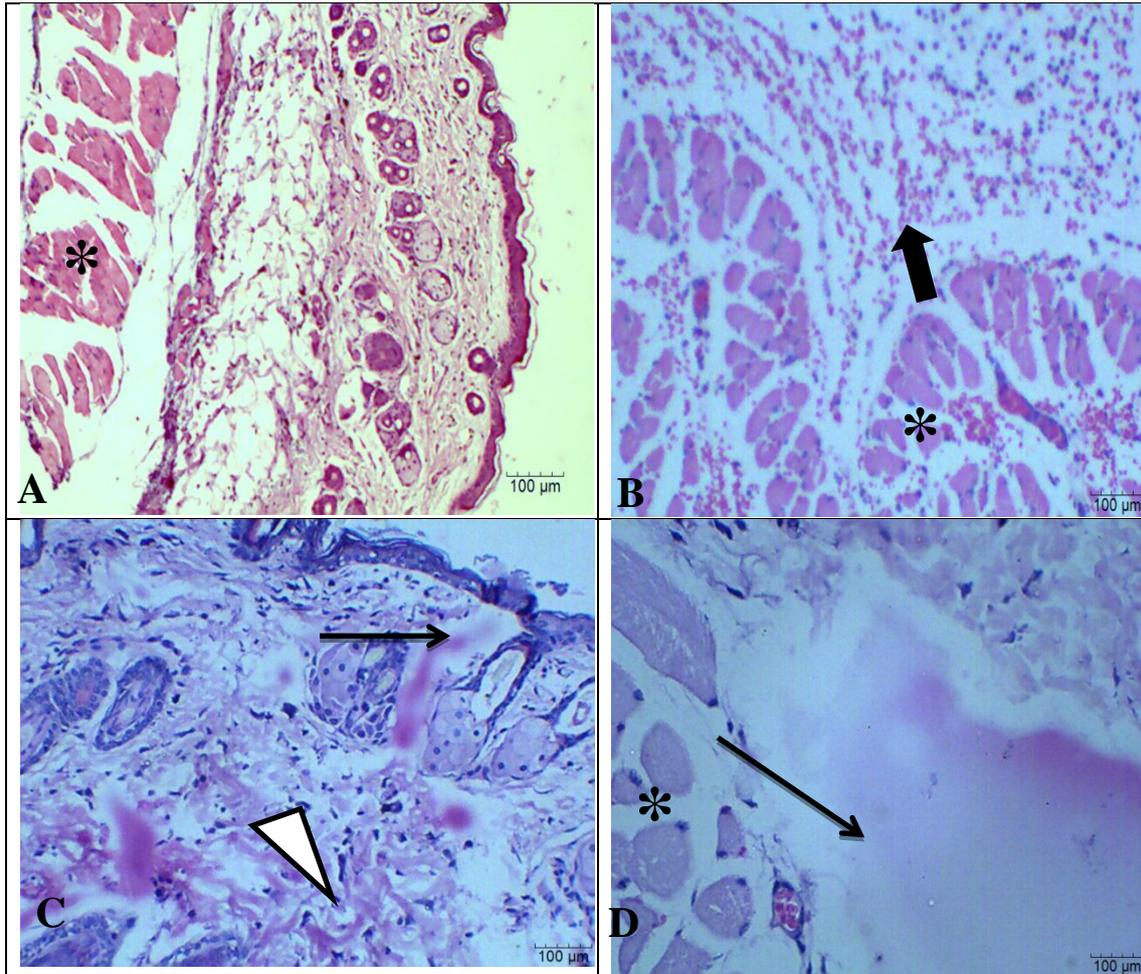


Figura 3 – Fotomicrografias de cortes histológicos da região da pele (derme profunda) do dorso de camundongos exposta ao veneno total na concentração de $20 \mu\text{g}$ via SC da *P. nattereri* (H&E). Em A - Grupo controle (100x). B - presença de hemorragia (200x). C - Acúmulo de fibras colágenas e presença de edema (200x). D - Formação de edema, próximo à musculatura (400x) (*) – Camada muscular subcutânea; (**➡**) Hemorragia (**➡**) edema (**▴**) acúmulo de fibras colágenas. Microscópio Trinocular Motic® BA310 (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) e software Motic Image Plus 2.0

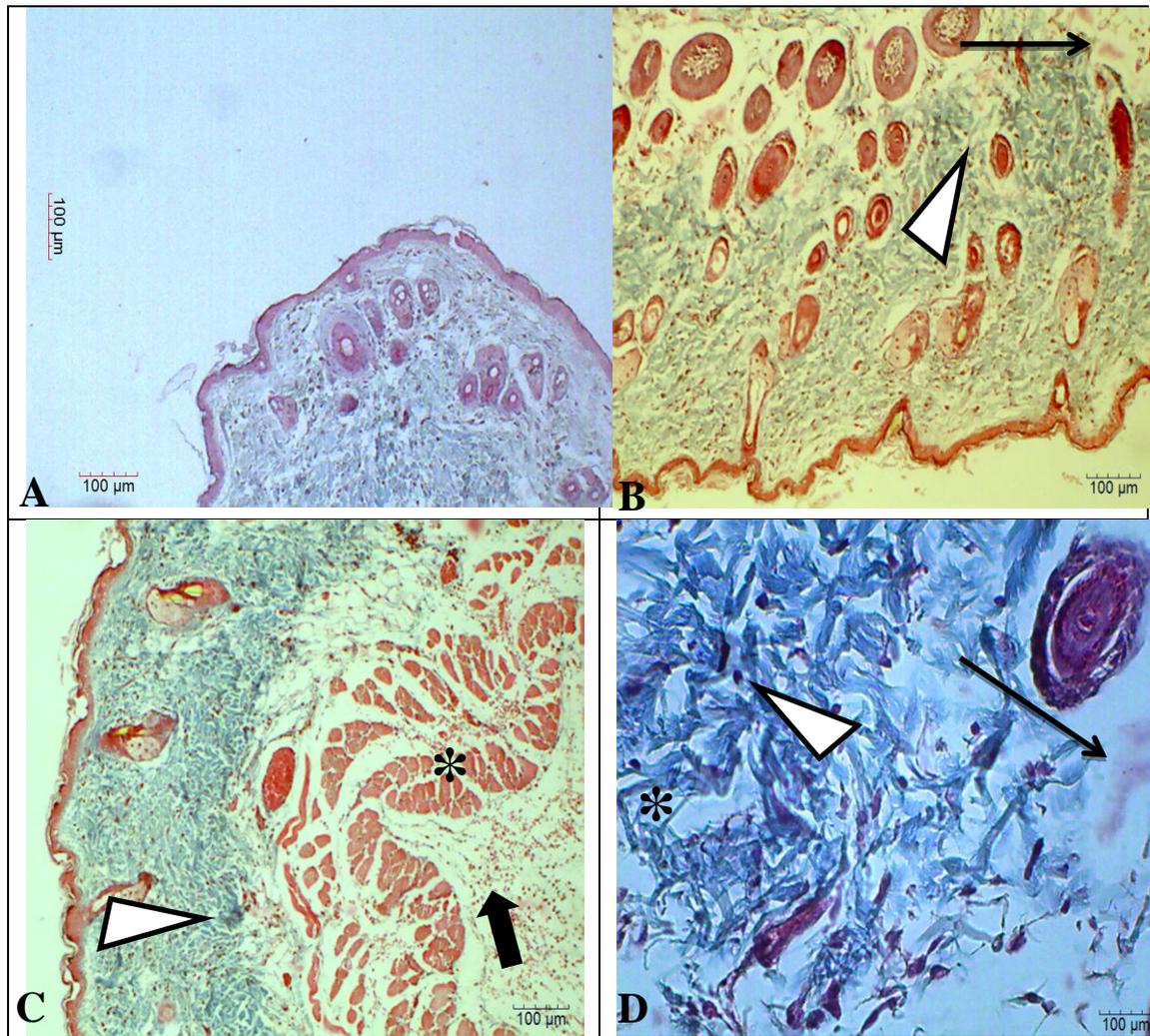


Figura 4 – Fotomicrografias de cortes histológicos da região da pele (derme profunda) do dorso de camundongos exposta ao veneno total da *P. nattereri* (Tricômio de Masson). Em A– Grupo controle (100x). B- Acúmulo de fibras colágenas e presença de edema do grupo A, (100x). C - grupo B apresentando hemorragia e fibrose (100x). D-Grupo A com edema e fibrose (400x) (*) – Camada muscular subcutânea; (➡) Hemorragia (➡) edema (▽) acúmulo de fibras colágenas. Microscópio Trinocular Motic® BA310 (Motic® 2000 2.0 MP Live Resolution) e software Motic Image Plus 2.0.

DISCUSSÃO

P.nattereri apresenta os dentes inoculadores localizados na região posterior do maxilar, dificultando desta forma, a inoculação do veneno mais profundamente na vítima¹⁰. Assim, a importância de se estudar as alterações morfológicas na pele como o órgão que sofrerá o maior dano quando um acidente ofídico ocasionado por esta espécie ocorre.

A literatura é vasta no que se refere ao veneno de serpentes pertencentes principalmente às famílias Elapidae e Viperidae¹². Porém, os estudos acerca da peçonha das *Philodryas*, ainda são escassos, uma vez que a sua produção seja em pequena quantidade¹⁴. Além disto, poucos são os estudos acerca do sistema tegumentar em envenenamentos por serpentes deste gênero.

Não foram encontradas referências científicas a respeito da pele após inoculação desse veneno em modelo animal. Em estudos realizados sobre a atividade citotóxica da peçonha da *Philodryas olfersii*, demonstrou-se que induz várias alterações morfológicas no músculo de ratos¹⁵.

Sinais e sintomas locais provocados tanto por *P. patagoniensis*, como pela *P. olfersii*, podem ser confundidos com aqueles encontrados em acidentes botrópicos¹². Logo, um conhecimento das características do envenenamento em pele por este tipo de serpente é necessário, para que a vítima receba o soro específico, evitando assim, os efeitos nocivos sobre a sua saúde no uso de um soro inapropriado¹⁶.

Efeito intenso local, incluindo dor, edema, hemorragia e necrose são características comuns tanto em serpentes do gênero *Bothrops* como *Colubridae*¹⁷.

É sabido que, se a administração do soro for feita de forma rápida, a neutralização dos efeitos sistêmicos é conseguida de forma eficaz¹⁸. Porém, uma neutralização do dano tecidual local é uma tarefa mais difícil e a falta dela resulta em sequelas permanentes com perda de tecidos¹⁹, quando a administração se dá de forma menos eficiente. O edema é produzido como uma consequência da lesão vascular e da descontinuidade endotelial, bem como por liberação de substâncias vasoativas, como histamina, prostaglandina, endotelina, óxido nítrico, etc^{18,19}.

Estudos do efeito local de envenenamento com *Bothrops* demonstraram ser complexo, apresentando edema e hemorragia em poucos minutos¹⁸, efeitos semelhantes foram observados no presente trabalho. Macroscopicamente, foi observada a formação de uma crosta, inclusive no grupo controle, pois é uma característica típica de pele normal, pois até mesmo uma injeção com solução salina pode provocar alterações na pele no local de aplicação.

Na literatura há relatos de que o veneno de *P. patagoniensis* demonstrou ser mais ativo que o da *P. olfersii*, porém ambos apresentaram respostas hiperalgésicas importantes²⁰.

A atividade hemorrágica dos venenos de colubrídeos é atribuída a atuação de metaloproteínases, enzimas preteolíticas com atividade dependente do íon zinco^{21,15}. Assim como nos viperídeos, as hemorraginas presentes no veneno podem ter um papel semelhante com relação aos processos digestivos das serpentes e a presença de atividade hemorrágica tem sido largamente indicada em várias espécies de colubrídeos²².

Estudos relatam que venenos de *P. patagoniensis* e *P. olfersii* apresentaram Dose Mínima Hemorrágica (DMH) e 26,9µg/rato e 24,1µg/rato, respectivamente, com a ação mais rápida nos tempos de 2 e 4 horas²⁰. Também há descrição das alterações promovidas pela ação tóxica do veneno da *P. nattereri* em músculos de camundongos inoculados com doses de 50µg nos tempos de 2h, 4h, 24h e 48h. Em tal trabalho, observaram-se hemorragias nas duas primeiras horas. Após 04 horas de inoculação, a hemorragia permaneceu até as 08 horas seguintes²⁴. Nossos estudos corroboraram com estes resultados anteriores, pois os grupos com concentrações de 20 µg/mL e 40 µg/mL que foram eutanasiados com duas horas após a inoculação apresentaram atividade hemorrágica moderada.

Depois de inoculado 40 µg/mL do veneno da *P. patagoniensis* no dorso de camundongos, observou-se macroscopicamente hemorragia em volta do local da inoculação¹². Em nossos resultados também foi observado hemorragia de forma macroscópica em todos os grupos experimentais que receberam a peçonha.

Para a atividade necrosante, a Dose Mínima Necrosante DMN foi igual a 180 µg/rato em determinado estudo com *P. patagoniensis*¹². Há na literatura outro relato de lesão necrótica com veneno de *P. patagoniensis* e *P. olfersii* nas doses de 50, 60, 70, 80 e 90 µg²⁰. Neste presente estudo, as concentrações utilizadas foram de 20 e 40 µg/mL e, apenas no de maior dose apresentou necrose de intensidade leve (TABELA 1).

Relatos acerca do efeito de venenos em peles, envolvendo outras espécies de serpentes, também são descritos, visto a importância da reação da peçonha no tegumento. Um estudo acerca do efeito necrótico de venenos em pele observou-se que a crotóxina, uma toxina presente no veneno crotálico, em concentrações de 40 µg/mL, induziu a formação de extensas áreas de necrose na camada muscular subcutânea. Bem como tal, nossos estudos, apresentou atividade necrótica em um grupo, também localizada nas regiões mais profundas da derme, caracterizando, assim uma ação de dermonecrose. Tal ação também foi observada em análises histopatológicas em cães envenenados por *Crotalus*²³. Entretanto, no nosso estudo, não foi possível observar macroscopicamente, diferentemente de estudos anteriores.

Na literatura é descrito a evolução de edema em pata de ratos inoculados com veneno de *P. nattereri*, onde sua ação se deu de forma rápida, sendo bem pronunciado, atingindo seu efeito máximo nas duas primeiras horas após inoculação nas concentrações de 03 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ²⁴. A sua regressão foi de forma gradativa até às 24 horas seguintes²⁴. Este estudo confirma os nossos resultados, no que se refere a uma atividade edematogênica nas duas primeiras horas. Porém, diverge no que diz respeito às horas seguintes, uma vez que o edema foi observado em nossos resultados até 72 horas após inoculação. Isto pode estar ligado à quantidade inoculada, uma vez que nossas concentrações foram de 2 até 4 vezes maior (20 e 40 $\mu\text{g/mL}$).

Estudos preliminares demonstraram que a atividade edematogênica causada pelo veneno de *Philodryas patagoniensis* foi de 0,26 mg (Dose Mínima de Edema- DME)¹², sendo muito superior àquela causada pelo veneno de espécies de *Bothrops* da Argentina, tais como: *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedii* e *B. alternatu*, que apresentam valores de DME de 0,85; 1,5; 2,05 e 4,00 mg, respectivamente²⁵.

O processo inflamatório com infiltrado de células como plasmócitos e mastócitos descrito neste trabalho corrobora com estudos anteriores, que descreveram um processo inflamatório moderado, composto por leucócitos polimorfonucleares em pele de ratos inoculados com veneno de *P. patagoniensis*¹². Tal inflamação é sugestivo de ser uma agressão tecidual provocada pelo veneno da *P. nattereri*. Isso se deve pela perda da estrutura endotelial e por liberação de substâncias vasoativas^{18,19}. Em estudos utilizando o mesmo veneno²⁴, porém em concentrações menores, confirmaram-se os achados no nosso trabalho, pois apresentaram moderado exsudato inflamatório persistindo até oito horas após inoculação, que passou a ser discreta nas 24 e 48 horas seguintes²⁴. No grupo controle do presente estudo, foi observada presença de células inflamatórias característica de pele normal que recebeu alguma injúria.

Estudos com venenos de serpentes vêm ganhando importância na área farmacológica, uma vez que são substâncias ricas em proteínas e toxinas. Desta forma, elucidar o mecanismo de ação de uma peçonha em órgãos e seus efeitos, é o passo inicial para um maior entendimento da composição do mesmo. Os acidentes ofídicos ocorrem com a inoculação do veneno na vítima através da pele, sendo ela, portanto, primeiro contato do veneno com o organismo vitimado.

CONCLUSÃO

O veneno de *Philodryas nattereri* provocou alterações histopatológicas significativas nos tecidos da pele, porém este estudo não permitiu esclarecer seu mecanismo exato de ação.

Estudos mais específicos sobre veneno de *Philodryas nattereri* se fazem necessários, a fim de se estabelecer quais os componentes do veneno povocam os efeitos locais, bem como quais fatores desencadeantes causadores de uma inflamação, ou se há uma ação direta dos fatores tóxicos do veneno sobre o tegumento.



Comitê de Ética para o Uso de Animais
Av. Paranjana, 1700- Itaperi, Fone: 3101-9890
e-mail: ceua.uece@uece.br
página na internet: www.uece.br/ceua



CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que o **Projeto de Pesquisa** intitulado: “**Avaliação histológica de pele de camundongos inoculados com veneno bruto da serpente *Philodyras nattereri* (Steindachner, 1870)**” registrado sob número **2669326/2014**, tendo como pesquisador principal **Janaína Serra Azul Monteiro** está de acordo com a legislação vigente e os **Princípios Éticos de Experimentação Animal** adotado pelo Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará sendo aprovado em 09 de junho de 2014. Este certificado expira-se em 09 de junho de 2018.

Fortaleza, 09 de junho de 2014.


 Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Presidente CEUA- UECE

REFERÊNCIAS

1. GUTIÉRREZ, J. M. ; LOMONTE, B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina. **In:** CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. JR. (ED.). **Animais Peçonhentos do Brasil:biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 310- 323, 2003.
2. ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; JACINTO, C. N.; JUNIOR, G. B. S.; LIMA, J. B.; VERAS, M. S. B.; DAHER, E. F. Acute Kidney Injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. Sao Paulo. v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos: serpentes**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-07---INCIDENCIA-CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2014.
4. BRASIL, 2012. Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS- Sistema de Informação de Agravos de Notificação- SINAN. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 28 mar. 2014.
5. SANTOS -COSTA , M.C.; A.B. OUTEIRAL ; F. D'AGOSTINI & L. CAPPELIARI . 2001. Freqüência de acidentes ofídicos na região da grande Porto Alegre e cidades próximas, RGS, Brasil. **Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, **14** (1): 89-93.
6. SALOMÃO, M.G.; ALBOLEA, A.B.P.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpetological Review**, v.34, n.3, p.307-312, 2003.
7. NERY, M.D.A. Efeitos biológicos e caracterização inicial da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* Steindacher 1870. **Tese de Doutorado Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2012.
8. PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.50, n. 1, 2004.
9. ARAÚJO DE, M.E.; SANTOS DOS, A.C.M.C.A. Casos de envenenamento humano causado por *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 30, n. 6, 1997.
10. VITT, L. J. Ecological observations on sympatric *Philodryas* (Colubridae) in northeastern Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 34, p. 87–98, 1980.
11. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8ed. Riode Janeiro, Guanabara Koogan, 2013.
12. PEICHOTO, M.E.; ACOSTA, O.; LEIVA, L.; TEIBLER, P.; MARUÑAK, S.; RUÍZ, R. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of

the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. **Toxicon**, 44: 589–596, 2004.

13. ESMERALDINO, L.E.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v.12, n.8, p. 570-576, 2005.

14. ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Isolation and characterization of five fibrin(o-gen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon** v. 32, p. 819-831, 1994.

15. ACOSTA, O., LEIVA, L.C., PEICHOTO, M.E., MARUNAK, S., TEIBLER, P., REY, L. Hemorrhagic activity of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. **Toxicon** v. 41, p. 1007–1012, 2003.

16. NISHIOKA, S. de A.; SILVEIRA, P.V.P. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo v.36, p. 279-381, 1994.

17. BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barraviera, B. (Coord.) **Venenos animais: uma visão integrada**, Rio de Janeiro: Publicações Científicas, cap.19, p.261-280, 1994.

18. MELO, M.M., HABERMEHL, G.G., CASTRO V. MERFORT, I. Topic utilization of sesquiterpene lactone from *Milleria quinqueflora* on treatment of bothropic envenomation in rabbits. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.4, p.548-552, 2005.

19. WEN, F.H. Ineficácia do antiveneno na reversão do edema e necrose em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 6., 2000, Águasde São Pedro, SP. 2000. **Anais... Águas de São Pedro:SBTx**, p.78-81, 2000.

20. ROCHA, M. M.T. DA.; FURTADO, M.F.D. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia** v. 24 (2): p. 410–418, 2007.

21. MANDELBAUM, F.R.; M.T. ASSAKURA; A.P. REICHL & S.M.T. SERRANO. *Philodryas* venom metalloproteinases, p.1-2. In: A.J. BARRETT; N.D. RAWLINGS & J.F. WOESSNER (Eds). **Handbook of proteolyticenzymes**. New York, Academic Press, XXX p. 1666, 1998.

22. ROCHA, M.M.T.; D. PAIXÃO-CAVALCANTE; D.V. TAMBOURGI & M.F.D. FURTADO. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). **Toxicon** v. 47,p. 95-103, 2006.

23. KOSCINCZUK, P. et. al. American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) bite accidents in dogs in Argentina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 52 p. 125-129 2000.

24. NERY, M. D. A.; AQUINO, H. D. ; RIBEIRO, R. T. M. ; NERY, E. A. ; MENEZES, D. B. ; XIMENES, R. M. ; AQUINO, A. D. ; BEZERRA, L. B. M. ; ALVES, N. T. Q. ; MONTEIRO, H. S. A. . Edematogenic and myotoxic activities induced by snake venom of *Philodryas nattereri* from the Northeast of Brazil. **Fundamental Toxicological Sciences**, v. 1, p. 7-13, 2014.

25. ACOSTA DE PÉREZ, O.C., KOSCINCZUK, P., TEIBLER, P., SÂNCHEZ NEGRETTE, M., RUÍZ, R., MARUNÁK, S., BOGARÍN, G. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los gêneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. **Toxicon** v. 36, p. 1165–1172, 1998.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados no presente trabalho responderam à hipótese levantada, uma vez que foi pressuposto que veneno de *Philodryas nattereri* provocaria modificações na estrutura histológica do tegumento. As alterações histopatológicas observadas, tais como hemorragia, necrose e edema, foram significativas.

Porem, não foi possível esclarecer o mecanismo exato de ação do mesmo. Logo, uma investigação mais específica se faz necessária, afim de se conhecer quais os constituintes da peçonha e quais os fatores que levam a uma inflamação ou mesmo se há uma ação direta dos fatores tóxicos do veneno sobre a pele.

8 PERSPECTIVAS

Utilizar os conhecimentos acerca das alterações histopatológicas de pele de camundongos, promovidas pela ação tóxica do veneno total da serpente *Philodryas nattereri*, como ponto de partida para posteriores estudos com a utilização do mesmo. Os primeiros passos foram dados para um entendimento das substâncias isoladas contidas nele com a finalidade de investigar acerca de seus mecanismos fisiofarmacológicos.

Logo, se fazem necessários estudos posteriores para se determinar os fatores desencadeadores de processo inflamatório sobre o tecido tegumentar levando a alterações morfoestruturais. Uma vez determinado seus efeitos, as medidas tomadas diante de um acidente ofídico podem ser mais precisas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA DE PÉREZ, O.C., KOSCINCZUK, P., TEIBLER, P., SÂNCHEZ NEGRETTE, M., RUÍZ, R., MARUNÁK, S., BOGARÍN, G. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los gêneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon* v. 36, p. 1165–1172, 1998.
- ACOSTA, O., LEIVA, L.C., PEICHOTO, M.E., MARUNÁK, S., TEIBLER, P., REY, L. Hemorrhagic activity of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. *Toxicon* v. 41, p. 1007–1012, 2003.
- AKAT, E.; ÇAKICI, O.; DINÇASLAN, Y.E.; ARIKAN, H. Histochemical and Histological Investigations on Duvernoy's Gland in *Natrix tessellata* (Squamata: Colubridae). *Kafkas Univ Vet Fak Derg* v.17 (2): 285-289, 2011.
- ALBUQUERQUE, H. N. de.; COSTA, T. B. G. da.; CAVALCANTE, M. L. F., Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Paraíba. *Revista de Biologia e ciências da terra*, v.5, n.1, 2004.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; JACINTO, C. N.; JUNIOR, G. B. S.; LIMA, J. B.; VERAS, M. S. B.; DAHER, E. F. Acute Kidney Injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. Sao Paulo. v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013.
- ARAÚJO DE, M.E.; SANTOS DOS, A.C.M.C.A. Casos de envenenamento humano causado por *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 30, n. 6, 1997.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A2 - a structural review. *Toxicon*, v.34, n.8, p.827-841, 1996.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. Isolation and characterization of five fibrin(o-gen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). *Toxicon* v. 32, p. 819-831, 1994.
- ASSAKURA, M.T.; SALOMÃO, M.G.; PUORTO, G.; MANDELBAUM, F.R. Hemorrágico, atividades fibrinogenolítica e edema de formação do veneno da cobra colubrid *Philodryas olfersii* (cobra verde). *Toxicon* v.30, p. 427-238, 1992.
- BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barraviera, B. (Coord.) *Venenos animais: uma visão integrada*, Rio de Janeiro: Publicações Científicas, cap.19, p.261-280, 1994.
- BRAGA, M.D.; MARTINS, A.M.; AMORA, D.N.; DE MENEZES, D.B.; TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; et al., Purification and biological effects of C-typelectin isolated from *Bothrops insularis* venom, *Toxicon* v.15, p. 859–867, 2006.
- BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília. DF: Fundação Nacional de Saúde. p.131, 1998

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos: serpentes**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-07---INCIDENCIA-CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2014.

BRASIL, 2012. Epidemio- Ministério Da Saúde, SVS- Sistema de Informação de Agravos de Notificação- SINAN. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

BUCARETCHI, F.; DOUGLAS, J.L.; FONSECA, M.R.C.C.; ZAMBRONE, F.A.D.; VIEIRA, R.J.; Envenenamento ofídico em crianças: frequência de reações precoces ao antiveneno em pacientes que receberam pré-tratamento com antagonistas H1 e H2 da histamina e hidrocortisona. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 451-457, 1994.

CORREIA, J.M.M. e ZULIAM, A. Imunidade relacionada a resposta alérgica no início da vida. **Jornal de Pediatria**. v. 77, n. 6, p. 441-6, 2001.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.13057-13060, 1994.

ESMERALDINO, L.E.; SOUZA, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. **Phytomedicine**, v.12, n.8, p. 570-576, 2005.

EVANGELISTA, I.L.; MARTINS, A.M.; NASCIMENTO, N.R.; HAVT A.; EVANGELISTA, J.S.; NORÕES, T.B. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2, **Toxicon** v. 55, p. 1061–1070, 2010.

FERRAREZZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das serpentes (Squamata). II. **Família Colubridae**. In: NASCIMENTO, L.B; BERNARDES, A.T. & COTTA, G.A. eds. Herpetologia no Brasil, 1. PUCMG. Belo Horizonte. p.81-91, 1994.

FOWLER, I; SALOMÃO, M.G. Activity patterns in the colubrid snake genus *Philodryas* and their relationship to reproduction and snakebite. **Bulletin of The Chicago Herpetological Society**, v. 29, n.10, p. 229-232, 1994.

FURTADO, M. F. D; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R; ROCHA, M. M. T. Sexual Dimorphism em Venon the *Bothrops Jararaca* (Serpentes Viperidae). **Toxicon** v. 48, p. 401-410, 2006.

GARCIA, L.M.; LEWIS, R.J., Therapeutic potencial of venom peptides. *Nature*, v.2, p.790-802, 2003.

GLENN, J.L.; PORRAS, L.W.; NOHAVEC, R.D.; STRAIGHT, R.C. Analysis of the Duvernoy's gland and oral secretions of *Hydrodynastes gigas* (Dumeril, Bibron, and Dumeril) (Reptilia: Serpentes). In: Strimple, P.D., Strimple, J.L. (Eds.), **Contributions in Herpetology**. Cincinnati Museum of Natural History, Cincinnati, OH, p. 19-26, 1992.

GUTIÉRREZ, J. M. Compreendendo los Peçonhas de serpientes: 50 anos de investigaciones en América Latina. **Rev. Biol. Trop.** **50(2):** 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M. ; LOMONTE, B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina. **In:** CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. JR. (ED.). **Animais Peçonhentos do Brasil:biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** 1. ed., São Paulo, Sarvier, p. 310- 323, 2003.

HAVT, A.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A.The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA2and PAF blockers, **Toxicon** v.39, p. 1841–1846, 2001.

HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A., Princípios integrados de zoologia. 11. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004, cap.28, p.540-541.

HIESTAND, P.C.; HIESTAND, R.R. 1979. *Dispholidus typus* (boomslang) snake venom: purification and properties of the coagulant principle. **Toxicon** v. 17, p. 489-498, 1979.

INSTITUTO BUTANTAN. Animais Peçonhentos: Serpentes. Série Didática 5. São Paulo, SP s/d. Disponível em: <<http://www.toxnet.com.br/download/serpentes.pdf>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2015.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular.** 8ed. Riode Janeiro, Guanabara Koogan, 2013.

KARDONG, K.V. Colubrid snakes and Duvernoy’s “venom” glands. **J. Toxicol.- Toxin Reviews**, 21: 1-19, 2002.

KORNALIK, F.; TAÂBORSKAÂ , E.; MEBS, D. Pharmacological and biochemical properties of a venom gland extract from the snake *Thelotornis kirtlandi*. **Toxicon** v. 16, p. 535-542, 1978.

KOSCINCZUK, P. et. al. American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) bite accidents in dogs in Argentina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 52 p. 125-129 2000.

LEMOS, J.C.; ALMEIDA, T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA, A.A.; SIMÕES, M.O.S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia (online).** V. 12, n.1, pp.50-59, 2009.

LIMA, M. F. Formação em preparação e administração de medicamentos. 2008. Acesso em:http://www.farmaciamarques.com/Imgs/content/page_87/formacao%20em%20administracao%20de%20medicamentos.pdf> Acesso em: 22, Abril, 2015.

LOPES, H.P. Alterações Locais Induzidas pela Secreção Tóxica de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae). **Dissertação de Doutorado Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2008.

MANDELBAUM, F.R.; M.T. ASSAKURA; A.P. REICCHL & S.M.T. SERRANO. *Philodryas* venom metalloproteinases, p.1-2.**In:** A.J. BARRETT; N.D. RAWLINGS & J.F.

WOESSNER (Eds). **Handbook of proteolytic enzymes**. New York, Academic Press, XXX+1666p, 1998.

MARCHI-SALVADOR, D.P. Estudos estruturais com LYS49 e ASP49 Fosfolipases A2 nativas e complexadas com Brometo de *p*-BROMOFENACILA. **Tese de Doutorado da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, Botucatu, 2008.

MARCHI-SALVADOR, D.P.; CORREA, L.C.; MAGRO, A.J.; OLIVEIRA, C.Z SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of Crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of Crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, 2008a.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e Manejo de serpentes. IN: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLICEIRA, R. S. Animais de laboratório. Criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 175-198p, 2002.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. IN: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR.,V. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. SAVIER: FAPESP. p. 468pp, 2003.

MELO, M.M., HABERMEHL, G.G., CASTRO V. MERFORT, I. Topic utilization of sesquiterpene lactone from *Milleria quinqueflora* on treatment of bothropic envenomation in rabbits. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**,v.57, n.4, p.548-552, 2005.

MINTON, S. A.; WENSTEIN, S. A. Colubrid snake venoms: immunologic relationships, electrophoresic patterns. **Copeia**, p.993-1000, 1987.

MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES M.C. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results, **Pharmacol. Toxicol.** v. 85, p. 198–200, 1999.

NERY, M.D.A. Efeitos biológicos e caracterização inicial da peçonha da serpente *Philodryas nattereri* Steindacher 1870. **Tese de Doutorado da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2012.

NERY, M.D.A.; ALVES, N.T.Q.; ALVES, R.S.; SOUSA, D.F.; MENEZES, D. B.; NERY, E.A.; AQUINO, H.D.; RIBEIRO, R.T.M.; MONTEIRO, H.S.A. The renal effects and initial characterization of venom from *Philodryas nattereri* Steindachner, 1870. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 812-819, 2014.

NERY, M. D. A.; AQUINO, H. D. ; RIBEIRO, R. T. M. ; NERY, E. A. ; MENEZES, D. B. ; XIMENES, R. M. ; AQUINO, A. D. ; BEZERRA, L. B. M. ; ALVES, N. T. Q. ; MONTEIRO, H. S. A. . Edematogenic and myotoxic activities induced by snake venom of *Philodryas nattereri* from the Northeast of Brazil. **Fundamental Toxicological Sciences**, v. 1, p. 7-13, 2014.

NICKERSON, M.A.; HENDERSON R.W. Um caso de envenenamento pela American colubrid Sul, *Philodryas olfersii* . **Herpetologica**, V. 32. p. 197-198, 1976.

- NISHIOKA, S. de A.; SILVEIRA, P.V.P. *Philodryas patagoniensis* bite and local envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo v.36, p. 279-381, 1994.
- OLIVEIRA NETO, J. Alterações mecânicas e histológicas de pulmões em modelo experimental de lesão aguda induzida pelo veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella*. **Dissertação de mestrado da Universidade Estadual do Ceará**, Fortaleza, 2015.
- OWNBY, C.L.H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, S.; WHITE, S.P.; FLECTHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v.37, p.411-445, 1999.
- PEICHOTO, M.E.; ACOSTA, O.; LEIVA, L.; TEIBLER, P.; MARUÑAK, S.; RUÍZ, R. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. **Toxicon**, 44: 589–596, 2004.
- PEICHOTO, M.E.; LEIVA, L.C.; GUAIMÁS MOYA, L.E.; REY, L.; ACOSTA, O. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: effects on blood coagulation. **Toxicon**, 45: 527-534, 2005.
- PEICHOTO, M.E.; TEIBLER, P.; RUIZ, R.; LEIVAA, L.; ACOSTA, O. Systemic pathological alterations caused by *Philodryas patagoniensis* colubrid snake venom in rats. **Toxicon** v. 48, p.520–528, 2006.
- PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.50, n. 1, 2004.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B.W.; DRENTH, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipases A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.11627-11636, 1985.
- ROBERSTSON, S.S.D.; DELPIERRE, G.R. Studies on African snake venoms-IV. Some enzymatic activities in the venom of the boomslang *Dispholidus typus*. **Toxicon** v. 7, p. 189-194, 1969.
- ROCHA, M.M.T. Estudo comparado dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichttenstein, 1823) e *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae). Tese (Doutrado em Ciências). **Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo**. P.144, 2005.
- ROCHA, M.M.T.; D. PAIXÃO-CAVALCANTE; D.V. TAMBOURGI & M.F.D. FURTADO. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). **Toxicon** v. 47, p. 95-103, 2006.
- ROCHA, M. M.T. DA.; FURTADO, M.F.D. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii*(Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia** v. 24 (2): p. 410–418, 2007.
- ROSENBERG, P. Phospholipases. In: SHIER, W.T.; MEBS, D. (Eds.). **Handbook of toxinology**. New York: Marcel Dekker, p.67-277, 1990.

SAKAI, A.; HONMA, M.; SAWAI, Y. Studies on the pathogenesis of envenomation of the Japanese colubrid snake yamakagashi *Rhabdophis tigrinus tigrinus*. 1. Study on the toxicity of the venom. **The Snake** v. 15, p. 7-13, 1983.

SALOMÃO, M.G. Estrutura e secreção das glândulas de Duvernoy de *Sibynomorphus mikanii* (Colubridae, Didsadinae) e *Philodryas olfersii* (Colubridae, Xenodontidae) e das glândulas de veneno de *Bothrops jararaca* (Viperidae, Crotalinae) e *Micrurus frontalis* (Elapidae, Elapinae) e a influência dos estados de alimentação e jejum. Tese (Doutorado em Ciências). **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, São Paulo, p.122, 1991.

SALOMÃO, M.G. & M. DI BERNARDO. *Philodryas olfersii*: uma cobra comum que mata. Caso registrado na área da 8ª Delegacia Regional de Saúde. **Arquivos da Sociedade de Zoológicos do Brasil** (14-16): 21, 1995.

SALOMÃO, M.G.; ALBOLEA, A.B.P.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpetological Review**, v.34, n.3, p.307-312, 2003.

SANTOS -COSTA, M.C.; A.B. OUTEIRAL; F. D'AGOSTINI & L. CAPPELIARI. 2001. Frequência de acidentes ofídicos na região da grande Porto Alegre e cidades próximas, RGS, Brasil. **Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia**, 14 (1): 89-93.

SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. B. Répteis da Serra do Japi: Notas sobre a história natural. In: MORELLATO, L. P. **História Natural da Serra do Japi: Ecologia e Preservação de uma área Florestal no Sudeste do Brasil**. FAPESP, Campinas, p. 212-237, 1992.

SERAPICOS, E.O. Estudo anatômico, morfológico, histoquímico e ultra-estrutural da Glandula de Duvernoy em seis espécies de Colubrídeos opistóglifos (SERPENTES-COLUBRIDAE- XENODONTINAE). **Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo**, 2006.

SILVA, M.V.; BUONONATO, M.A. Relato Clínico de envenenamento Humano por *Philodryas olfersii*. **Memorial do Instituto Butantan** v. 47/48, p. 121-126, 1983/1984.

SILVEIRA, P.V.P.; NISHIOKA, S.A. Non- venomous snake bite and snake bite whitout envenoming in a Brazilian teaching hospital, analysis of 91 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. V.34, n.6, p. 499-503, 1992.

SINAN, 2013. Sistema de Informação de Agravos de Notificação [documento na Internet]. Animais peçonhentos. Acesso 23 de fevereiro de 2015. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. I.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina veterinária. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999. Pag. 31 – 31.

TAUB, A. M. Ophidian cephalic glands. **J. Morphol.** 118(4): 529-542, 1966.

UETZ, P.; HOSEK J., 2015 Base de dados Reptilia. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso em: 12 de julho de 2015.

VEST, D.K. The toxic Duvernoy's secretion of the wandering garter snake, *Thamnophis elegans vagrans*. *Toxicon* v. 19, p. 831-839, 1981b.

VEST, D.K. Some effects and properties of Duvernoy's gland secretion from *Hypsiglena torquata texana* (Texas night snake). *Toxicon* v. 26, p. 417-419, 1988.

VITT, L. J. Ecological observations on sympatric *Philodryas* (Colubridae) in northeastern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 34, p. 87-98, 1980.

WEINSTEIN, S.A.; KARDONG, K.V. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. *Toxicon*, v. 32, p. 1161-1185, 1994.

WEINSTEIN, S.A.; SMITH, L.A. Chromatographic profiles and properties of Duvernoy's secretions from some boigine and dispholidine colubrids. *Herpetologica* v. 49, p. 78-94, 1993.

WEN, F.H. Ineficácia do antiveneno na reversão do edema e necrose em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 6., 2000, Águas de São Pedro, SP. 2000. *Anais... Águas de São Pedro:SBTx*, p.78-81, 2000.

ZAHER, H., GRAZZIOTIN, F.G., CADLE, J.E., MURPHY, R.W., MOURA-LEITE, J.C., BONATTO, S.L., Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South America xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Pap. Av. Zool.* 49, 115-153, 2009.

ZINGALI, R. B.; BIANCONI, M. L.; MONTEIRO, R. Q. Interaction of Bothrojaracin with prothrombin. *Haemostasis*, 31: 273-278, 2001. Disponível em: <http://www.cobrasbrasileiras.com.br/serpentes_classificacao.html>. Acesso em: 20 de março de 2014.