

WARLEY GOMES DOS SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS E SORO ANTIOFÍDICO NO TRATAMENTO DO
ENVENENAMENTO BOTRÓPICO EM COELHOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinária

Linha de Pesquisa: Toxicologia e plantas tóxicas

Orientadora: Prof. Dra. Marília Martins Melo

Co-orientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco

Escola de Veterinária
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – Minas Gerais
2017

S237a Santos, Warley Gomes Dos, 1980
Associação de Fármacos e Soro Antiofídico no Tratamento do Envenenamento Botrópico em
Coelhos/ Warley Gomes dos Santos - 2017
118 p.: il.

Orientador: Marília Martins Melo
Coorientador: Benito Soto - Blanco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola
de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Coelhos como animal de laboratório - Teses. 2 – Veneno de cobra - Teses. 3 - Envenenamento.
4- Serpente. I. Melo, Marília Martins - II. Soto - Blanco, Benito – III. Universidade Federal de
Minas Gerais – IV. Veterinária.

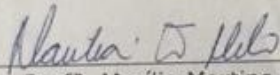
CDD – 636.0895

FOLHA DE APROVAÇÃO

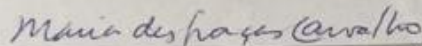
WARLEY GOMES DOS SANTOS

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS

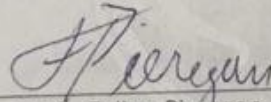
Aprovada em 31 de Março de 2017, pela banca constituída pelos membros:



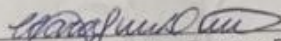
Prof.ª Marília Martins Melo
Presidente - Orientador



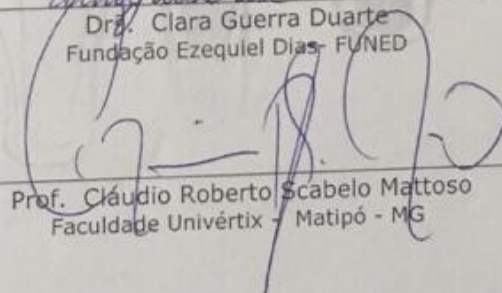
Prof.ª Maria das Graças Carvalho
Faculdade de Farmácia - UFMG



Prof. Felipe Pierzan
Escola de Veterinária - UFMG



Dra. Clara Guerra Duarte
Fundação Ezequiel Dias - FUNED



Prof. Cláudio Roberto Scabelo Mattoso
Faculdade Univértix - Matipó - MG

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marília Martins Melo responsável pelos recursos financeiros para a realização da pesquisa que originou a tese, orientação técnico-científica e emocional.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado.

Aos diretores da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Dr. Cláudio Fonseca de Freitas (Divisão de Produção Animal) e Dr. Maurício Abreu Santos (Divisão de Produção de Biológicos) pela doação do soro antibotrópico utilizado neste experimento.

Ao Professor Dr. Cláudio R. Mattoso pelo auxílio na realização dos exames hematológicos.

À Professora Dra. Maria das Graças Carvalho pelo auxílio na realização dos testes de Geração de Trombina e apoio incondicional.

Ao Professor Ênio Ferreira e à doutoranda Tatiany Luiza Silveira pelo auxílio na realização da imunistoquímica.

À Dra. Juliana Mol por sempre ter disponibilidade em me atender e pelo auxílio na realização do SDS-PAGE.

Ao Professor Dr. Filipe Pierezan e ao doutorando Matheus Vilardo Lóes Moreira no auxílio na leitura dos exames histológicos.

Aos alunos de iniciação científica Antônio Vieira e Daniel Escarce que me auxiliaram durante a execução do experimento.

DEDICATÓRIA

AOS MESTRES COM CARINHO

Às “tias” do ensino primário que me alfabetizaram e as “tias” do ensino fundamental que plantaram em mim vários sonhos, desde a Escola Estadual Maria Guilhermina Pena, Escola Estadual Professor Álvaro Maia, Polivalente...Tia Bete; Tia Vânia; Tia Otonina; Tia Lucimar; Tia Meire Cruz; Tia Luana; Tia Márcia; Dona Magda; Dona Néria; Marinete; Elizabeth Silva; Bel Pessotti; Rita Deoclides; Maria Eugênia e tantas outras que fizeram parte da minha vida.

Aos professores que fizeram de mim um médico veterinário na graduação na Universidade Federal do Espírito Santo.

Aos professores que trilharam comigo durante os programas de Mestrado e o Doutorado na Universidade Federal de Minas Gerais.

Dedico incondicionalmente à minha orientadora, Professora Marília Martins Melo. Você professora, está realizando o sonho da minha VIDA!

À Deus por ter me privilegiado de ter um PAI maravilhoso, que só me deu exemplo de dignidade. Que devemos trabalhar e jamais desistir de encontrar a nossa pedra preciosa... a cada dia encontro as minhas.

Às minhas irmãs e sobrinhas que AMO incondicionalmente.

Às minhas MÃES. Não estão mais nesta luta da terra comigo, mas estão plantadas em minha alma.

À Universidade Federal do Estado de Minas Gerais por ter me permitido chegar até aqui.

Aos animais que foram utilizados neste estudo, peço meu PERDÃO! Mas vocês foram heróis, e são vocês que abrem as portas para outros estudos que irão salvar muitas vidas.

“Não sou nada, nunca serei nada, não posso querer ser nada. À parte isto, tenho em mim todos os sonhos do mundo” (Fernando Pessoa).

“Não é a nossa condição social, mas a qualidade de nossa alma que nos torna feliz” (Voltaire).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 A HISTÓRIA DO OFIDISMO NO BRASIL	18
3.2 SERPENTE <i>Bothrops alternatus</i> (Duméril, Bibron e Duméril, 1854)	19
3.3 COMPONENTES DO VENENO DE SERPENTES DO GÊNERO <i>Bothrops</i>	19
3.3.1 Metaloproteinase, Serinoproteinases, Fosfolipases e Lecitinas tipo C: Efeitos sobre a hemostasia e mionecrose	19
3.3.2 Metaloproteinases (SVMPs)	20
3.3.3 Serinoproteinases (SVSPs)	21
3.3.4 Fosfolipases A ₂ (PLA ₂)	22
3.3.5 Lecitinas tipo C	23
3.4 MIONECROSE	23
3.5 SISTEMA HEMOSTÁTICO E HEMOSTASIA	24
3.5.1 PRINCIPAIS COMPONENTES ENVOLVIDOS NA HEMOSTASIA	26
3.5.2 HEMOSTASIA BASEADA EM SUPERFÍCIES CELULARES E O PAPEL DE ALGUNS FATORES DA COAGULAÇÃO	28
3.6 FASES DO MODELO <i>IN VIVO</i> DA HEMOSTASIA	29
3.6.1 Fase de iniciação	29
3.6.2 Fase de amplificação	30
3.6.3 Fase de propagação	30
3.6.4 Fase de finalização (fibrinólise)	31
3.7 OS TESTES DE HEMOSTASIA E O NOVO MODELO <i>IN VIVO</i> DA COAGULAÇÃO	31
3.7.1 Teste de geração de trombina - TGT	32
3.8 ENVENENAMENTO BOTRÓPICO E INFLAMAÇÃO	34
3.8.1 Células inflamatórias	35
3.8.2 Proteinograma fracionado	36
3.9 COMPLICAÇÕES SISTÊMICAS	37
3.9.1 Injúria renal aguda (IRA) decorrente de veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	37
3.9.2 Mecanismos da injúria renal aguda nos envenenamentos botrópicos	38
3.10 FÁRMACOS ANTIFIBRINOLÍTICOS	39
3.10.1 Ácido tranexâmico (ATX)	40
3.11 OUTROS FÁRMACOS COM ATIVIDADE SOBRE A HEMOSTASIA	41
3.11.1. Hormônio antidiurético ou vasopressina	41
3.11.2. Desmopressina (DDAVP)	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. VENENO	43
4.2. ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS/PAGE)	43
4.3. ANIMAIS	43
4.4. IMPLANTAÇÃO DE CATETER CENTRAL	44
4.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS	44
4.6. COLETAS DE SANGUE	45
4.7. PROVAS DE COAGULAÇÃO	46
4.7.1. TTPa, TP, TT, Fibrinogênio e TGT	46
4.8. HEMATOLOGIA	46
4.9. BIOQUÍMICA SÉRICA	47
4.10. EUTANÁSIA	47
4.11. HISTOLOGIA	47
4.11.1. Análise imunistoquímica para caspase-3	47
4.12. ESTATÍSTICA	49
5. RESULTADOS	50

5.1. VENENO	50
5.2. PROVAS DE COAGULAÇÃO	51
5.2.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), Tempo de Protrombina (TP), Tempo de trombina (TT) e fibrinogênio	51
5.2.2. Teste de geração de trombina (TGT)	53
5.3. HEMOGRAMA	59
5.3.1. ERITROGRAMA.....	59
5.3.1.1. Hemácias	59
5.3.1.2. Hemoglobina	59
5.3.1.3. Volume globular.....	59
5.3.1.4. Concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e volume globular médio (VGM).....	59
5.3.1.5. Índice de anisocitose - RDW - SD	59
5.3.1.6. Contagem plaquetária.....	60
5.4. LEUCOGRAMA.....	62
5.4.1. Leucócitos totais.....	62
5.4.2. Neutrófilos segmentados (número relativo e absoluto).....	62
5.4.3. Linfócitos (números relativo e absoluto).....	62
5.5. EXAMES BIOQUÍMICOS.....	64
5.5.1. Glicose.....	64
5.5.2. Triglicerídeos	65
5.5.3. Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), α glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA).....	65
5.5.4. Ureia.....	67
5.5.5. Creatinina	67
5.5.6. Eletrólitos	69
5.5.6.1. Potássio	69
5.5.6.2. Sódio	70
5.5.6.3. Proteína sérica total	71
5.5.6.4. Proteinograma fracionado	71
5.5.6.4.1. Albumina.....	71
5.6. EXAME ANATOMOHISTOPATOLÓGICO	73
5.6.1. Exame macroscópico da musculatura estriada esquelética	73
5.6.2. Histopatologia Musculatura Estriada Esquelética	74
5.6.3. Exame macroscópico dos pulmões	77
5.6.4. Histopatologia dos pulmões	77
5.6.5. Exame macroscópico hepático	79
5.6.6. Histopatologia hepática.....	79
5.6.7. Exame macroscópico dos rins	79
5.6.8. Histopatologia dos rins.....	79
5.6.9. Exame macroscópico da musculatura estriada cardíaca.....	81
5.6.10. Histopatologia da musculatura estriada cardíaca	81
6. DISCUSSÃO	82
6.1. PROVAS DE COAGULAÇÃO.....	82
6.2. HEMOGRAMA	85
6.2.1. Eritrograma	85
6.2.2. Leucograma.....	85
6.3. EXAMES BIOQUÍMICOS.....	86
6.3.1. Glicose e triglicerídeos.....	86
6.3.2. Alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST)	87
6.3.3. Ureia, creatinina e eletrólitos	87
6.3.4. Proteína sérica total e proteinograma fracionado.....	88
6.4. AVALIAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	89
6.4.1. Musculatura estriada esquelética.....	89

6.4.2. Pulmões	90
6.4.3. Fígado.....	90
6.4.4. Rins	91
6.4.5. Musculatra estriada cardíaca	92
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Serpente <i>Bothrops alternatus</i> (Foto: Arquivo Professora Marília Martins Melo).....	19
Figura 2. Modelo clássico da cascata de coagulação. Compilado de Blaya <i>et al.</i> (1998).	25
Figura 3. Hemostasia baseado em superfícies celulares. Compilado de Ferreira <i>et al.</i> , 2010.....	30
Figura 4. Trombograma oriundo do TGT e seus principais componentes.....	331
Figura 5. Demonstrativo dos desafios dos grupos experimentais: G1, G2 e G3 (NaCl 0,9%) e, G4, G5, G6, G7, G8 e G9 (Veneno <i>B. alternatus</i>).....	451
Figura 6. Demonstrativo dos tratamentos dos grupos experimentais: G1, G5 e G8 (ácido tranexêmico); G2, G6 e G9 (desmopressina); G4 (NaCl 0,9%); G3, G7, G8 e G9 (soro antibotrópico).....	45
Figura 7. Exames realizados nos determinados tempos experimentais.....	45
Figura 8. SDS-PAGE do veneno utilizado, com os principais componentes do veneno de <i>Bothrops alternatus</i> . Setas indicando a massa molecular do padrão.....	47
Figura 9. Geração de trombina do grupo G4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) nos tempos 4h, 8h e 12h, e grupo controle (animais hígidos).....	51
Figura 10. Geração de trombina de coelhos hígidos (controle) e de coelhos que receberam desmopressina distribuídos nos grupos G2 (sem indução de envenenamento + desmopressina), G6 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + desmopressina), G9 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + soro antibotrópico + desmopressina), comparados ao grupo G4 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i>), 8h após.....	56
Figura 11. Geração de trombina de coelhos hígidos (controle) e de coelhos que receberam desmopressina distribuídos nos grupos G2 (sem indução de envenenamento + desmopressina), G6 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + desmopressina), G9 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + soro antibotrópico + desmopressina), comparados ao grupo G4 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i>), 12h após.....	52
Figura 12. Geração de trombina de coelhos hígidos (controle); G4 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i>); G5 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + ácido tranexâmico); G6 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + desmopressina).....	57
Figura 13. Geração de trombina de coelhos hígidos (controle) e de coelhos que receberam ácido tranexâmico (ATX) distribuídos nos grupos, G1 (sem indução de envenenamento + ATX), G5 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + ATX), G8 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i> + soro antibotrópico + ATX), comparados ao grupo G4 (com indução de envenenamento, <i>B. alternatus</i>), 8h após.....	57
Figura 14. Geração de trombina de coelhos hígidos (controle); G1 (sem indução de envenenamento + ácido tranexâmico - ATX); G4 (veneno <i>B. alternatus</i>); G5 (veneno <i>B. alternatus</i> + ATX) e G8 (veneno <i>B. alternatus</i> + ATX + soro antibotrópico), 12h após (tempo final).	58
Figura 15. Grupo controle (geração de trombina de coelhos hígidos); G4 (veneno <i>B. alternatus</i>); G5 (veneno <i>B. alternatus</i> + ATX) e, G6 (veneno de <i>B. alternatus</i> + desmopressina (G6), 12h após (tempo final).	58
Figura 16. Valores médios de glicose (mg.dL ⁻¹) entre os tempos experimentais iniciais (T0) e tempos finais (T12) nos diferentes grupos (G).....	60
Figura 17. Valores médios ± desvio padrão da ureia entre T0 e T12 no grupo G4 (veneno de <i>B. alternatus</i> + NaCl 0,9%).	63
Figura 18. Valores médios e desvio padrão de creatinina nos tempos T0 (valores basais) e T12 (tempo final) no grupo G7 (<i>B. alternatus</i> + soro antibotrópico).	63
Figura 19. Valores de potássio entre os diferentes grupos experimentais no tempo T12.	65
Figura 20. Valores médios do sódio entre os diferentes grupos experimentais no T12 e um grupo controle.....	66
Figura 21. Coelho: musculatura vasto-lateral do membro pélvico direito de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i> + NaCl 0,9%) apresentando área hemorrágica no sítio de inoculação (setas vermelhas) da peçonha.....	69

Figura 22. Coelho: musculatura vasto-lateral do membro pélvico direito de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i> + NaCl 0,9%) apresentando área hemorrágica no sítio de inoculação (setas vermelhas) da peçonha.....	69
Figura 23. Coelho: secção histológica da musculatura de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando grande área de hemorragia (seta) no sítio de inoculação do veneno de serpente <i>B. alternatus</i> . Coloração HE, Bars 50µ.....	74
Figura 24. Coelho: secção histológica da musculatura de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando vacuolização da fibra muscular (seta) no sítio de inoculação do veneno de serpente <i>B. alternatus</i> . Coloração HE, Bars 50µ.	75
Figura 25. Coelho: secção histológica da musculatura de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando grande área de hemorragia (seta vermelha) e intenso infiltrado inflamatório heterofílico (setas pretas) no sítio de inoculação da peçonha. Coloração HE, Bars 50µ.	75
Figura 26. Coelho: secção histológica da musculatura estriada esquelética de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando intenso infiltrado inflamatório na parede vascular (setas pretas), revelando uma vasculite. Coloração HE, Bars 50µ.....	76
Figura 27. Coelho - secção histológica de musculatura estriada esquelética coradas por imunistoquímica para caspase-3. Marcação citoplasmática positiva em marron, compatível com células em apoptose (setas pretas). Aumento: Bars 50µ.	76
Figura 28. Coelho: áreas multifocais a coalescentes de hemorragia em lobos pulmonares (setas vermelhas) 12h após inoculação de veneno de serpente <i>B. alternatus</i> (grupo 4).....	77
Figura 29. Coelho: Secção histológica dos pulmões de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando hemorragia pulmonar discreta (seta preta), edema (seta vermelha), 12h após inoculação de veneno de serpente <i>B. alternatus</i> . Coloração HE, Bars 50µ.	78
Figura 30. Coelho: Secção histológica dos pulmões de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando hemorragia pulmonar discreta (seta preta), 12h após inoculação de veneno de serpente <i>B. alternatus</i> . Coloração HE, Bars 50µ.	78
Figura 31. Coelho: Secção histológica dos rins de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando presença de conteúdo proteináceo intratubular (setas pretas), 12h após inoculação de veneno de serpente <i>B. alternatus</i> . Coloração HE, Bars 50µ.	76
Figura 32. Coelho: Secção histológica dos rins de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando presença de necrose tubular aguda caracterizado pela ausência de núcleos no epitélio simpes, vacuolização citoplasmática (setas pretas), 12h após inoculação de veneno, Coloração HE, Bars 50µ.	76
Figura 33. Secção histológica dos rins de um animal do grupo 4 (veneno de <i>B. alternatus</i>) demonstrando presença de núcleos picnóticos e aumento de basofilia (setas pretas), 12h após inoculação de veneno de serpente <i>B. alternatus</i> . Coloração HE, Bars 50µ.	81
Figura 34. Coelho: área focal de hemorragia em epicárdio (seta preta) 12h após inoculação de veneno de serpente <i>B. alternatus</i> (grupo 5 veneno <i>B. alternatus</i> + desmopressina).....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), Tempo de protrombina (TP), tempo de trombina (TT) e fibrinogênio de coelhos de diferentes grupos (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8 e G9) em diferentes tempos (T0, T1, T4, T8 e T12)	52
Tabela 2. Geração de trombina entre os grupos experimentais G1, G2, G4, G5, G6, G8, G9 no tempo experimental T8 comparado a um grupo controle.	54
Tabela 3. Geração de trombina entre os grupos G1, G2, G4, G5, G6, G8 e G9 no tempo experimental T12 comparado a um grupo controle.	55
Tabela 4. Valores médios \pm desvio padrão do hemograma (hemácias, hemoglobina, volume globular, CHGM e VGM), nos tempos T0 (valores basais) e T12h (tempo final) dos nove grupos experimentais. .	61
Tabela 5. Valores de referência do leucograma de coelhos, segundo Campbell (2007a).....	62
Tabela 6. Valores médios \pm desvio padrão do leucograma nos tempos T0 e T12: Leucócitos totais ($X 10^3/\mu\text{L}$); neutrófilos segmentados relativos (%) e absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$); linfócitos relativos (%); linfócitos absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$ de sangue); eosinófilos relativos (%) e absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$); monócitos relativos (%) e absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$).....	63
Tabela 7. Valores bioquímicos de referência para ureia, creatinina, ALT, AST, GGT, FA, glicose, triglicérides, proteína total e albumina de coelhos hígidos conforme Hewitt <i>et al.</i> (1989)a, Campbell (2007)b , Spinelli <i>et al.</i> (2012)c e Kaneko, (2008)d.	65
Tabela 8. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros glicose em (mg.dL^{-1}), triglicérides (mg.dL^{-1}), ALT , AST, GGT e FA (U.L^{-1}) de coelhos de todos os grupos experimentais nos tempos T0 e T12.	66
Tabela 9. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros ureia e creatinina em (mg.dL^{-1}), de coelhos de todos os grupos experimentais nos tempos T0 e T12.	68
Tabela 10. Valores médios dos íons sódio e potássio em mmol.L^{-1} provenientes de um <i>pool</i> de amostra de cada grupo e um grupo controle basal.	70
Tabela 11. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros proteína sérica total e proteinograma fracionado dos grupos experimentais nos tempos iniciais (T0) e finais (T12).	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: alanino aminotransferase
AST: Aspartato aminotransferase
ATX: Ácido tranexâmico
B. alternatus: *Bothrops alternatus*
B. jararaca: *Bothrops jararaca*
B. jararacussu: *Bothrops jararacussu*
B. moojeni: *Bothrops moojeni*
CAT: Trombografia automática calibrada
DDAVP: acetato de desmopressina
ETP - Endogen thrombin potential: Potencial endógeno de trombina
FA: Fosfatase alcalina
FT: Fator tecidual
GGT: Gama glutamiltransferase
IL-1: Interleucina 1
IL-6: Interleucina 6
IRA: Injúria Renal Aguda
kDa: Quilodalton
Low tissue factor 1pM: baixo fator tecidual 1 picomolar
PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio - 1
Peak height: Altura do pico
PLA₂: Fosfolipase A₂
SVMPs: Metaloproteinases de veneno de serpentes
SVSPs = Serinoproteases de veneno de serpentes
TFPI: Inibidor da via do fator tecidual
TGT: Teste de geração de trombina
Time to peak: tempo para atingir o pico
TNF- α : Fator de necrose tumoral α
TP: tempo de protrombina
TT: tempo de trombina
TTPa: tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

RESUMO

Os acidentes ofídicos são um problema de saúde pública em diversas regiões tropicais do planeta podendo cursar com óbito. Além de acometer o homem, os acidentes com serpentes também acometem os animais domésticos. A pesquisa de estratégias terapêuticas e fármacos que possam contribuir na antagonização dos efeitos deletérios do veneno ofídico sobre o sistema hemostático e outros sistemas orgânicos são praticamente inexistentes. Deste modo, o estudo de fármacos coadjuvantes como o ácido tranexâmico e a desmopressina são de grande importância, uma vez que estes apresentam comprovada atividade sobre o sistema hemostático reduzindo hemorragias de origens variadas e sendo de fácil acesso a sua aquisição. Neste contexto, este estudo objetiva avaliar se a utilização destes fármacos promove algum benefício quando utilizados nos casos de envenenamento por serpente *Bothrops alternatus* em modelo experimental de envenenamento em coelhos. Para tal, foram realizados exames hematológicos, testes da hemostasia incluindo o teste de geração de trombina, testes bioquímicos e histopatologia da musculatura estriada esquelética, pulmões, fígado, coração e rins. Para isso, foram utilizados 36 coelhos, da raça Nova Zelândia, distribuídos em diferentes grupos experimentais, a saber: G1- Grupo sem indução do envenenamento e tratado com ácido tranexâmico; G2- Grupo sem indução do envenenamento e tratado com desmopressina; G3- Grupo sem indução do envenenamento e tratados com soro antibotrópico; G4- Grupo *B. alternatus* sem tratamento; G5- Grupo *B. alternatus* tratado com ácido tranexâmico; G6- Grupo *B. alternatus* tratado com desmopressina; G7- Grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico; G8- Grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- Grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + desmopressina. O protocolo experimental consistiu na inoculação do veneno via intramuscular superficial na coxa dos animais e, após isto, cada grupo recebeu seu respectivo tratamento. O estudo demonstrou que o veneno de serpente *B. alternatus* atua sobre o sistema hemostático promovendo um desequilíbrio, uma vez que a geração de trombina se apresentou reduzida nos animais que receberam veneno. Os fármacos utilizados não promoveram melhora da hemostasia sendo que os animais tratados com ácido tranexâmico ou desmopressina apresentaram geração de trombina reduzida similar ao grupo G4 que recebeu veneno e não foi tratado. Todos os animais do estudo que receberam veneno apresentaram hemorragia no sítio de inoculação do veneno com inflamação e necrose. Infere-se que o veneno utilizado no estudo promoveu morte celular na musculatura estriada esquelética por apoptose sendo positivo para caspase-3. Além da hemorragia no local, vários animais apresentaram hemorragia pulmonar. Somente o grupo G4 apresentou elevação dos níveis de ureia e creatinina, nos demais grupos não houve alteração. Por outro lado, elevação dos níveis de glicose e triglicerídios em determinados grupos foi observada, sugerindo um desequilíbrio metabólico. Conclui-se que os fármacos empregados no estudo como coadjuvantes no tratamento do ofidismo por *Bothrops alternatus* não são benéficos ao sistema hemostático.

Palavras-chave: acidente ofídico; toxinologia; *Bothrops alternatus*; terapia intensiva; hemostasia; geração de trombina.

ABSTRACT

Snakebite accidents are a public health problem in many tropical regions of the planet and may be fatal. In addition to attacking man, snake accidents also affect domestic animals. The research for therapeutic strategies and drugs that may contribute to the antagonization of the deleterious effects of snake venom on hemostatic and other organic systems are practically non-existent. Thus, the study of drugs adjuvants such as tranexamic acid and desmopressin are of great importance, since they have proven activity on the haemostatic system reducing hemorrhages of varied origins and being easily accessible. In this context, this study aims to evaluate if the use of these drugs promotes some benefit when used in cases of *Bothrops alternatus* snake envenomation in an experimental model of rabbit envenomation. Hematologic tests, haemostasis tests including the thrombin generation assays biochemical tests and histopathology of the skeletal striated muscles, lungs, liver, heart and kidneys were performed. For this, 36 rabbits, New Zealand, were distributed in different experimental groups, namely: G1- Group without induction of envenomation and treated with tranexamic acid; G2- Group without induction of envenomation and treated with desmopressin; G3- Group without induction of envenomation and treated with antitropic serum; G4- Group *B. alternatus* without treatment; G5- Group *B. alternatus* treated with tranexamic acid; G6- Group *B. alternatus* treated with desmopressin; G7- Group *B. alternatus* treated with antitropic serum; G8- Group *B. alternatus* treated with antitropic serum + tranexamic acid; G9- Group *B. alternatus* treated with antitropic serum + desmopressin. The experimental protocol consisted of the inoculation of the venom via the superficial intramuscular in the thigh of the animals and, therefore, each group received its respective treatment. The study shows that the venom of snake *B. alternatus* acts on hemostasis and coagulation promoting an imbalance, since the generation of thrombin was reduced in animals receiving venom. The drugs used did not improve the hemostasis and the animals treated with tranexamic acid or desmopressin presented thrombin generation also reduced and similar to the G4 group that received venom and was not treated. All animals in the study receiving venom presented haemorrhage at the venom inoculation site with inflammation and necrosis. It is inferred that the venom used in the study promoted cell death in the skeletal striated musculature by apoptosis being positive for caspase-3. In addition to local hemorrhage, several animals had pulmonary hemorrhage. Only the G4 group showed elevation of urea and creatinine levels, however, in the other groups no change was observed. Elevated glucose and triglyceride levels were also observed in certain groups, suggesting a metabolic imbalance. It is concluded that the drugs used in this study as coadjuvants in the treatment of snakebite accidents by *Bothrops alternatus* are not beneficial to the hemostatic system.

Key-words: snake envenomation; toxinology; *Bothrops alternatus*; critical care; hemostasis; thrombin generation.

1 INTRODUÇÃO

O ofidismo é uma doença tropical comum que faz parte da lista das doenças negligenciadas, pois constitui um relevante problema de saúde coletiva, com mortalidade mundial estimada em cerca de 50.000 óbitos por ano (Chippaux, 1998).

No Brasil, as serpentes da família Viperidae são as principais envolvidas nos acidentes ofídicos que podem culminar com complicações hemorrágicas, lesão renal aguda, perda funcional ou amputação de membros posterior à necrose local, e até mesmo o óbito (SINAN NET, 2016).

Segundo dados do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação, no ano de 2015 foram notificados 18.565 casos de acidentes com serpentes. Deste total, 13.373 (72,02%) foram causados pelo gênero *Bothrops* (SINAN NET, 2016), o que deixa evidente que os acidentes ofídicos botrópicos em humanos são os de maior ocorrência no Brasil. Apesar de não existirem dados na literatura no contexto da medicina-veterinária, os acidentes com os animais, possivelmente seguem a epidemiologia humana.

Além disso, existem muitas crenças e mitos em relação ao manejo clínico dos animais envenenados por serpentes, pois quase sempre ocorre um atraso ou não administração do soro antiofídico na vítima (Santos *et al.*, 2013).

A pesquisa de estratégias terapêuticas e fármacos que possam contribuir na antagonização dos efeitos deletérios do veneno ofídico, especialmente, sobre a hemostasia são praticamente inexistentes. Alguns fármacos apresentam ações nas diferentes vias da cascata de coagulação, como exemplo, o ácido tranexâmico que é utilizado nas situações com fibrinólise excessiva (CRASH 2, 2010) e, o acetato de desmopressina, usado há quatro décadas para o tratamento de distúrbios sanguíneos congênitos, pois promove a liberação de fatores de coagulação (Fator VIII e de von Willebrand) pelo endotélio vascular e aumenta a agregação plaquetária (Desborough *et al.*, 2016). Estas alterações como o consumo de fatores da coagulação, não agregação plaquetária e fibrinólise excessiva são os principais sinais clínicos do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* (Svensson *et al.*, 2014).

No entanto, apesar de existirem inúmeros trabalhos sobre a hemostasia no envenenamento botrópico, alguns aspectos ainda continuam obscuros, tais como a cinética da trombina pelos índices da sua geração, que nunca foi estudada. Diante deste contexto, a investigação de fármacos coadjuvantes para tratar alguns efeitos decorrentes do envenenamento, como as hemorragias são de grande importância.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial terapêutico de fármacos, como o ácido tranexâmico e a desmopressina, no envenenamento experimental por peçonha de serpente *Bothrops alternatus*, utilizando o coelho como modelo experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o sistema hemostático, por meio de provas de coagulação, e o teste de geração de trombina, em coelhos após envenenamento experimental por *B. alternatus*, tratados ou não com soro antiofídico e/ou ácido tranexâmico ou desmopressina.

Avaliar o perfil sanguíneo (exames hematológicos, bioquímicos) de coelhos após envenenamento experimental por *B. alternatus*, tratados ou não com soro antiofídico e/ou com ácido tranexâmico ou desmopressina.

Avaliar as alterações macro e microscópicas de diferentes órgãos e tecidos de coelhos após envenenamento experimental por *B. alternatus*, tratados ou não com soro antiofídico e/ou com ácido tranexâmico ou desmopressina.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A HISTÓRIA DO OFIDISMO NO BRASIL

Foi João Batista de Lacerda o primeiro no Brasil e provavelmente na América Latina, a dedicar-se a medicina experimental. Em 1876, ingressou no Museu Nacional no Rio de Janeiro e fundou o primeiro laboratório de fisiologia e em colaboração com Louis Couty, discípulo de Vulpian, pesquisou a origem do curare, plantas tóxicas de nossa flora, o veneno de serpentes brasileiras e reconheceu a jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). Verificou Lacerda a ação hemolítica *in vitro* do veneno da cascavel e a proteolítica e emulsionante de gorduras do veneno botrópico. Em outra pesquisa, constatou a inativação *in vitro* dos venenos ofídicos pelo permanganato de potássio. Todavia, os resultados com o permanganato de potássio foram criticados por seu colaborador Couty e foi considerado de pequeno ou nenhum valor no tratamento do ofidismo (Lima *et al.*, 2010).

Coube a Vital Brazil, criar a maior escola, de estudos e pesquisas sobre venenos animais e envenenamentos causados por peçonhas. Vital Brazil testou numerosas plantas indicadas pela medicina popular para o tratamento do ofidismo, porém sem obter êxito. No Brasil, no final do século XIX, Vital Brazil reportou as diferenças clínicas entre envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* e testou fármacos da época em animais (Hawgood, 1992).

Vital Brazil teve conhecimento que Albert Calmette preparava no Instituto Pasteur de Lille (França) um imunossoro contra o veneno ofídico, o *serum antivenimeux*, compreendendo que este seria o caminho certo para o tratamento eficiente. Em 1897, no Instituto Bacteriológico, junto de Adolpho Lutz, Vital Brazil reportou as diferenças clínicas entre envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, relatando que o veneno botrópico provocava enorme tumefação constituída de edema e hemorragia, seguido de lesão tecidual. Uma vez verificada a diferença nas ações dos venenos crotálico e botrópico, Vital Brazil imunizou separadamente animais com veneno de cascavel e jararaca. Verificou que o imunossoro obtido com a imunização com o veneno de jararaca, muito ativo contra este veneno, era completamente destituído de ação preventiva ou curativa contra o veneno de cascavel. Verificou então, a especificidade dos soros antiofídicos, concluindo que o *serum antivenimeux* de Calmette, preparado com predominância de veneno de *Naja*, era incapaz de neutralizar o veneno de cascavel e quase inativo contra o veneno de jararaca. Vital Brazil foi, portanto, pioneiro em nosso país, na produção de soro antiofídico. Assim, desde o desenvolvimento do soro antiofídico, esse continua até hoje sendo uma das principais condutas no tratamento específico nos acidentes ofídicos para a neutralização dos efeitos sistêmicos (León *et al.*, 2013).

Além das pesquisas com soro antiofídico, Vital Brazil realizou outras pesquisas sobre a identificação de serpentes, doses médias mortais, diferenças de respostas clínicas nos animais domésticos e após injeção em diferentes vias de inoculação. Vital Brazil juntamente com Rangel Pestana e Gastão Rosenfeld relataram que animais inoculados com venenos das *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, o sangue encontrava-se sempre fluido, incoagulável (Vital Brazil, 1935).

O desenvolvimento dos fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina - IECA- foi elaborado a partir do conhecimento de componentes do veneno de serpente *B. jararaca*, mas isto precedeu a descoberta da bradicinina por Rocha e Silva *et al.* (1949).

Em estudo histórico realizado em cães e cobaias, Rocha e Silva *et al.* (1949) descobriram que o peptídeo bradicinina que causava a hipotensão que ocorria após o envenenamento por *Bothrops jararaca*. Durante a década de 1960, Ferreira que era colaborador de Rocha e Silva demonstrou que este peptídeo potencializador das bradicininas, que era o componente presente no veneno das serpentes *Bothrops jararaca* que estimulava a liberação das bradicininas (Ferreira, 1998). Mais tarde em 1975 foi sintetizado o captopril a partir deste conhecimento científico básico.

Diversos fármacos comercializados e outros ainda em estudo que atuam sobre a hemostasia e coagulação, tiveram origem em componentes de venenos de serpentes (Assafim *et al.*, 2016).

Uma das últimas pesquisas de Vital Brazil foi sugerida pelo emprego na França do veneno de *Naja* no tratamento da dor, principalmente de origem neoplásica, com resultados promissores. Vital Brazil selecionou o veneno de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) preparando ampolas diluídas com soro fisiológico e distribuindo aos médicos que solicitavam para o tratamento da dor. Em 1993, Giorgi *et al.*, relataram uma substância de pequena massa molecular na peçonha de cascavel com atividade analgésica (Giorgi *et al.* 1993).

3.2 SERPENTE *Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron e Duméril, 1854)

A serpente *B. alternatus*, conhecida como urutu-cruzeiro, cruzeira é uma serpente muito temida no sul e centro-sul do Brasil, provavelmente por ser uma das maiores produtoras de veneno, podendo chegar a 380mg por extração (Araújo e Belluomini, 1960). É um animal corpulento que pode ultrapassar 1,5m de comprimento. Possui manchas dorsolaterais características em forma de gancho ou ferradura de cor castanho-escuro. Vive nos campos e outras áreas abertas desde o sul de Goiás até o Paraguai, Argentina e Uruguai (Fig. 1).



Figura 1. Serpente *Bothrops alternatus* (Foto: Arquivo Professora Marília Martins Melo)

3.3 COMPONENTES DO VENENO DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops*

3.3.1 Metaloproteinase, Serinoproteinases, Fosfolipases e Lecitinas tipo C: Efeitos sobre a hemostasia e mionecrose

Amostras de veneno de *B. alternatus* de 62 serpentes de várias regiões do Brasil, incluindo o estado de Minas Gerais, foram analisadas. O perfil eletroforético dessas amostras revelou, em geral, 15 bandas (entre 67 e 28 kDa), entretanto, somente três bandas conservadas em todas as amostras (de 55, 27 e 14 kDa). Também foi demonstrada a grande variabilidade de bandas entre 30 kDa e 57 kDa (Rocha e Furtado, 2005).

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* possui constituintes complexos de natureza proteica e não proteica. Os principais constituintes tóxicos são metaloproteinases (dependentes do metal zinco para sua ação), serinoproteinases, fosfolipases A₂ (PLA₂), lecitinas tipo C e outros constituintes não protéicos (Escalante *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2007; Escalante *et al.* 2011; Sajevic *et al.*, 2011; Markland Jr e Swenson, 2013; Serrano, 2013).

As toxinas do veneno podem ter atividades proteolítica, pró-coagulante, anticoagulante, hemorrágica (local e sistêmica) nos sítios e adjacências da inoculação do veneno (Escalante *et*

al., 2003; Gutiérrez *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2011; Markland Jr e Swenson, 2013; Serrano, 2013). Por volta de 1881, foi demonstrado que o veneno de serpente poderia ser proteolítico e somente em 1960 que se comprovou a presença de metaloproteinasas. Somente mais recentemente com o avanço da proteômica demonstrou-se melhor a constituição das SVMPs nos venenos de viperídeos, além da estrutura cristalográfica (Fox e Serrano, 2008). Deve ser ressaltado que as metaloproteinasas constituem os principais componentes tóxicos do veneno de serpentes *Bothrops* (Gutiérrez *et al.*, 2016).

Além destas frações clássicas do veneno das serpentes, outras enzimas com atividade toxicológica como L-amino oxidases estão presentes contribuindo com o quadro clínico dos envenenamentos. Foi isolada no veneno de *B. alternatus* uma L-amino oxidase com massa molecular de 66 kDa, que possui discreto efeito sobre plaquetas e induz edema em pata de ratos (Stábeli *et al.*, 2014).

3.3.2 Metaloproteinasas (SVMPs)

As SVMPs são subdivididas em três classes, a saber: P-I: contêm apenas um domínio metaloproteínase; P-II: contêm domínios metaloproteínases e desintegrinas; P-III: contêm domínios metaloproteínases, tipo desintegrinas, ricos em cisteína, podendo ainda ter lecitina tipo C. As SVMPs possuem massa molecular em sua maioria entre 40 a 67 kDa, aproximadamente. Nas serpentes jovens, há um predomínio de metaloproteínases P-III, sendo estas com efeitos predominantemente hemorrágicos ao passo que serpentes adultas, há um predomínio de metaloproteínases da classe P-I, que promove mais efeitos locais (Escalante *et al.*, 2011; Markland Jr e Swenson, 2013).

Esta variação das classes de SVMPs entre serpentes jovens e adultas ocorre especialmente devido ao tipo de alimentação destes animais. As serpentes jovens em geral alimentam-se, sobretudo de presas ectotérmicas e as adultas por presas endotérmicas (Antunes *et al.*, 2010). Adicionalmente, pode haver diferença inclusive dentro do gênero *Bothrops*, sendo o motivo de o soro antiofídico no Brasil ser composto por um *pool* de veneno de diferentes espécies e idades de serpentes, como *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. jararacussu* (Queiroz, 2008).

As SVMPs podem exercer as seguintes ações sobre a homeostasia: atividade fibrinogenolítica, devido à presença de SVMPs das classes P-I e P-II do veneno de *B. alternatus*; atividade fibrinolítica (fibrinólise excessiva), ativação de fator II (protrombina) e ativação de fator X (fator X forma um complexo entre protrombina e com o fator V), segundo Costa *et al.*, (2007).

A destruição da matriz extracelular é um ponto chave na ocorrência de hemorragias locais, que são decorrentes das enzimas SVMPs que facilitam o efluxo de sangue de dentro dos capilares (Escalante *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2005; Sajevic *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2016). Queiroz e Petta (1984) reportaram a ocorrência de hemorragia no local de inoculação de veneno de *B. alternatus* em cerca de 10 minutos.

A jararragina é uma típica SVMP P-III, com 52 kDa e 421 aminoácidos que foi purificada do veneno de *B. jararaca* no início da década de 1990 (Paine *et al.*, 1992). A jararragina induz hemorragia pulmonar em camundongos sem alterar os testes de coagulação de triagem e independentemente da interação com as serinoproteases devido o dano microvascular (Escalante *et al.*, 2003).

Uma outra SVMP da classe P-III com massa molecular de 55 kDa, isolada do veneno de *B. alternatus* da região noroeste da Argentina, foi denominada como baltergina. Esta enzima é capaz de atuar tanto sobre o sistema homeostático gerando hemorragia pulmonar, quanto sobre a integridade capilar (Gay *et al.*, 2009).

Costa *et al.* (2007) isolaram duas SVMPs do veneno de *B. alternatus* das classes P-I e P-II, com massa molecular de 29 e 36 kDa, respectivamente, com atividade fibrinogenolítica (inibida por fenantrolina). Esta atividade fibrinogenolítica atua, principalmente, sobre a cadeia alfa do fibrinogênio, discretamente na cadeia beta e ausente na cadeia gama. A enzima da classe P-II possui maior atividade sobre o fibrinogênio do que a P-I, demonstrando maior atividade anticoagulante.

As SVMPs degradam o colágeno tipo IV presente na membrana basal do subendotélio evoluindo com a ruptura do endotélio vascular (Bjarnason e Fox, 1994). Em ampla revisão, Gutiérrez *et al.* (2016) esclareceram os dois principais mecanismos fisiopatológicos de hemorragia provenientes das SVMPs. Um dos mecanismos denominado *per rexis* que é devido à lesão capilar em musculatura estriada esquelética e o segundo *per diapedesis* ocorrem em vênulas e em outros sistemas orgânicos pelo alargamento de junções intercelulares.

Adicionalmente, as SVMPs podem promover alterações qualitativas e quantitativas plaquetárias como reportado por Kamiguti *et al.* (2005) e clivagem do fator de von Willebrand em múltiplos não hemostaticamente ativos (Kamiguti *et al.*, 1996). Também pode haver um grande consumo plaquetário devido à adesão destas nas microlesões no endotélio (Kamiguti *et al.*, 1991). Gutiérrez *et al.* (2016) reportaram que as alterações *in vivo* sobre agregação plaquetária e sobre o fator de von Willebrand precisam ser melhores esclarecidas fisiopatologicamente.

Foi demonstrado que α_2 -macroglobulinas plasmáticas de coelhos podem inibir proteases como as SVMPs P-III de *B. jararaca* com moderada eficiência (Kawano *et al.*, 2002). Todavia em ratos, as α_2 -macroglobulinas plasmáticas inibem, somente, parcialmente as SVMPs P-III de *B. jararaca*, mas conseguem inibir as SVMPs da classe P-I de *B. asper* (Escalante *et al.*, 2003 e 2004). Isto explica que as SVMPs da classe P-I promovem somente hemorragia no local da picada, pois são inativadas quando caem na corrente sanguínea sistêmica, ao passo que as SVMPs de classe P-II e P-III não são inibidas pelas macroglobulinas plasmáticas (Escalante *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2016).

3.3.3 Serinoproteinases (SVSPs)

As SVSPs do veneno de serpente (enzimas com ações do tipo tripsina) estão abundantemente presentes no veneno de serpentes *Bothrops* e apresentam massa molecular geralmente entre 20 e 40 kDa. Estas enzimas podem causar um desbalanço no sistema hemostático atuando sobre o sistema calicreína-cinina, e sobre a agregação plaquetária como a PA-BJ isolada do veneno de *B. jararaca* que ativa plaquetas via clivagem PAR 1. Atua sobre a coagulação sanguínea, com a ativação de protrombina, fator X, fator V; fator VII e também pode agir sobre a proteína C (proteína C atividade anticoagulante inibindo complexo tenase). Ainda possuem a capacidade de ativar o plasminogênio com aumento da fibrinólise, degradação do fibrinogênio e da fibrina e inativação de serpinas (Pérez *et al.*, 2007; Serrano, 2013).

Dentro da classe das SVSPs, há um grupo de enzimas que apresentam em torno de 33% de homologia com a trombina (*thrombin-like*), exercendo assim algumas funções similares à trombina. Contudo, não ativam o fator XIII, gerando coágulos instáveis bem como induzem diretamente a clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, por exemplo, a botrombina e batroxobina (Sajevic *et al.*, 2011).

Foi isolada do veneno de *B. alternatus* uma SVSP com massa molecular de 32 kDa pela técnica de SDS-PAGE. Esta enzima possui semelhança com SVSPs isoladas de outras serpentes do gênero *Bothrops*. Neste mesmo estudo também foram identificadas duas SVSPs do veneno de *B. moojeni* com massa molecular de 32 kDa e outra com 35 kDa. As enzimas das duas espécies de serpentes isoladas *in vitro* foram capazes de coagular plasma humano, sendo a dose

coagulante mínima da toxina da *B. moojeni* inferior ao da *B. alternatus*. As toxinas com massa molecular de 32 kDa, de ambas as espécies, foram capazes de clivar o fibrinogênio em cadeias alfa e beta e, a de massa molecular de 35 kDa, clivar somente em cadeia alfa. A sequência de aminoácidos das enzimas isoladas com peso de 32 kDa possui grande homologia com a encontrada no veneno de *B. jararaca*. A enzima de 35 kDa proveniente da *B. moojeni* possui aproximadamente 80-85% de identidade com a batroxobina e a botrombina (Oliveira *et al.*, 2013).

3.3.4 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As PLA₂ são enzimas presentes nos venenos das serpentes *Bothrops*, sendo mantido um padrão conservativo no veneno de espécimes de *B. alternatus* da maioria das regiões do país. Possui massa molecular entre 13 e 16 kDa (Rocha e Furtado, 2005). As PLA₂ hidrolizam diversos tipos de lipídios e atuam na interface lipídio-água das membranas biológicas, desestabilizando as membranas lipídicas (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

As PLA₂ são responsáveis por síntese e remodelagem de membranas. Tem sido demonstrada sua hiper-expressão em várias doenças crônicas. São subdivididas em PLA₂ de alta e baixa massa molecular, sendo as de baixa massa presente nos venenos de serpentes. As PLA₂ de baixa massa podem ser subdivididas em duas famílias: uma, presente nos venenos de serpentes da família Elapidae e, outra, na Viperidae. O cálcio, importante na coagulação e hemostasia, também se torna fundamental para a adequada atividade catalítica destas enzimas. Adicionalmente, há homólogos de PLA₂ presentes nos venenos de diversas serpentes, que embora tenha sua atividade catalítica prejudicada, exercem outras atividades biológicas tóxicas. Foi descrito no veneno de *B. alternatus* uma PLA₂ isolada por espectrometria de massas com massa molecular de 13,9kDa. Esta toxina promoveu em ratos mionecrose e *in vitro* bloqueio neuromuscular (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

De modo geral, estas PLA₂ têm atividades ancestrais digestivas e a capacidade de induzir diferentes efeitos miotóxicos, sendo estes efeitos locais ou sistêmicos. Também levam à efeitos hemolíticos, miotóxicos, neurológicos, pró-inflamatórios, sendo esses três últimos os mais relacionados a estas substâncias (Montecucco *et al.*, 2008; Mamede *et al.*, 2016). Mamede *et al.* (2016) reportaram intensa atividade hiperalgésica e edematogênica provenientes das PLA₂ e SVMPs, sendo tais efeitos observados no veneno de *B. alternatus* inferiores, quando comparados ao veneno de *B. moojeni*.

Em relação à atividade hemolítica, foi relatado que as PLA₂ provenientes de serpente *Micrurus fulvius* (presente somente nos Estados Unidos) possui ampla atividade hemolítica demonstrada em ratos e cães (Arce-Bejarano *et al.*, 2014). A atividade neurotóxica em neurônio motor inferior pode ser exemplificada como o que ocorre em acidentes elapídicos por *Micrurus spp.* Já em relação ao efeito miotóxico, as PLA₂ estão envolvidas na necrose e inflamação da musculatura estriada esquelética local e sistêmica, tendo como exemplo a rabdomiólise no envenenamento crotálico e, a mionecrose no local da picada que pode evoluir com complicações e perda do membro, no envenenamento botrópico (Montecucco *et al.*, 2008; Mamede *et al.*, 2016).

Assim, as PLA₂ de veneno de serpentes não apresentam um efeito diretamente sobre a hemostasia e a coagulação, porém, o efeito inflamatório local e sistêmico pode favorecer a atuação das SVMPs sobre os vasos sanguíneos (Gutiérrez *et al.*, 2016).

3.3.5 Lecitinas tipo C

As lecitinas tipo C e proteínas semelhantes às lecitinas estão presentes nos venenos de diversas espécies de serpentes podendo apresentar atividade anticoagulante ou pró-coagulante; pró-agregante plaquetário ou antiagregante plaquetário por diversos mecanismos conforme amplamente revisado por Ogawa *et al.*, (2005). São proteínas presentes em torno de 10 a 15% no veneno das serpentes *Bothrops spp.* Em torno de 1% podem ser substâncias como a botrojaracina e a botroalternina com aproximadamente 27 kDa (Arocas *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 1998; Monteiro e Zingali, 2000). Estas substâncias foram descritas, respectivamente, nos venenos de *B. jararaca* e posteriormente no veneno de *B. alternatus* e são imunologicamente relacionadas (Castro *et al.*, 1998). Segundo Assafim *et al.* (2016), a botrojaracina é capaz de se ligar à trombina e também a protrombina, reduzindo assim a formação da trombina com grande potencial farmacológico, pois, *in vivo*, quando administrada isoladamente apresentou brandos efeitos tóxicos. A botroalternina também é um inibidor da trombina em induzir agregação plaquetária, tal qual a botrojaracina, porém menos eficiente que a primeira (Castro *et al.*, 1998).

3.4 MIONECROSE

Os componentes tóxicos do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* induzem graves alterações no local de inoculação do veneno. Gutiérrez *et al.* (1984) descreveram a primeira miotoxina, uma PLA₂ em veneno de *B. asper*. Atualmente, sabe-se que estas alterações locais ocorrem pelas diversas toxinas do veneno atuando de forma sinérgica, sobretudo pelas SVSPs dependentes de zinco e PLA₂ miotóxicas do veneno (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Mamede *et al.* 2016). As alterações locais surgem de forma hiperaguda com edema, hemorragia, mionecrose. Tais alterações já são conhecidas e bem documentadas, porém ainda com algumas lacunas (Gutiérrez *et al.*, 1980; Queiroz e Petta, 1984 Gutiérrez e Lomonte, 1995).

A intensidade destes efeitos locais pode variar de acordo com a espécie de *Bothrops*. O veneno da espécie de serpentes *B. moojeni* causa lesões locais cinco vezes mais intensos que das serpentes *B. alternatus*. Estes efeitos miotóxicos ocorrem com o sinergismo dos diferentes mecanismos inflamatórios. A miotoxicidade gerada pelo veneno de *B. moojeni* é mediada primariamente pelas PLA₂ (Mamede *et al.*, 2016).

A intensidade de regeneração muscular também depende do grau de lesão produzido no local podendo entre um e dois meses haver a recuperação com cicatriz, conforme demonstrado em camundongos. Há casos que não há total recuperação do tecido muscular, sendo esse substituído por tecido fibroadiposo com poucas fibras musculares (Queiroz e Petta, 1984). Foi previamente reportado que a atividade mionecrosante do veneno de *B. alternatus* pode ser inferior quando comparado ao de outras serpentes botrópicas (Rocha e Furtado, 2005). As lesões causadas pelo veneno de *B. alternatus*, por terem uma maior quantidade de SVMP de classe P-III, podem ter uma melhor recuperação quando comparadas as de outras espécies de *Bothrops* (Garcia Denegri *et al.*, 2016). Entretanto, mesmo pequenas doses do veneno como uma dose de 80 µg de veneno bruto de *B. alternatus* inoculada em musculatura tibial de camundongos foi capaz de induzir intensa hemorragia no local em aproximadamente 10 minutos após a inoculação e adicionalmente 24h após, já havia sido instalada grave mionecrose (Queiroz e Petta, 1984).

Do mesmo modo, doses de 50 µg de veneno de *B. alternatus* administradas em músculo gastrocnêmio de camundongos, causaram graves alterações na vasculatura local culminando com hemorragia e marcante inflamação. A hemorragia e a inflamação apresentam relação com a dose administrada, sendo maior quando administrados 100 µg de veneno por animal. A necrose ocorreu de forma similar após administração de ambas as doses de veneno e 28 dias depois ocorreu a cicatrização. Este estudo também reporta a redução dos capilares sanguíneos da musculatura estriada esquelética após a hemorragia. Nos primeiros três dias, a densidade capilar na musculatura foi menor na maior dose do veneno, porém, do sétimo ao 28º dia, na maior dose do veneno, houve uma maior formação de novos capilares (Garcia Denegri *et al.*, 2016).

Gutiérrez *et al.* (1980), após a administração de 50 µg do veneno de *B. asper* em camundongos, observaram microscopicamente mionecrose a partir de 3h após a inoculação do veneno e elevação da enzima creatinofosfoquinase (CK), demonstrando efeito mionecrótico intenso e hiperagudo. Em ampla revisão, Gutiérrez e Lomonte (1995) reportam que a membrana plasmática da musculatura estriada esquelética é uma das primeiras estruturas a ser afetada pelas miotoxinas.

Assim, os efeitos sobre a hemostasia e sobre a musculatura oriundos das diversas toxinas que compõem o veneno das serpentes do gênero *Bothrops* são decorrentes, principalmente, da interação entre estes componentes, embora isoladamente também possuam efeitos tóxicos.

3.5 SISTEMA HEMOSTÁTICO E HEMOSTASIA

Participam do sistema hemostático, o endotélio vascular, plaquetas e fatores de coagulação. Para um entendimento didático, divide-se a hemostasia em três fases: (a) primária, com ênfase na atividade plaquetária; (b) secundária, com o envolvimento dos fatores de coagulação propriamente dito, culminado na formação do coágulo de fibrina; e (c) terciária ou fibrinólise, que consiste na degradação por um sistema fibrinolítico.

A hemostasia é entendida como uma série de eventos fisiológicos que visam manter o sangue em estado fluido no interior dos vasos sanguíneos, e deste modo, impedir o seu extravasamento ou formação de trombos. Para que isto ocorra de modo efetivo, é necessário um equilíbrio entre fatores pró-coagulantes e anticoagulantes (Smith, 2010).

O mecanismo tradicionalmente aceito pelo qual se dá a coagulação foi descrito pela clássica “cascata da coagulação”, proposta em 1964 por MacFarlane, Davie e Ratnoff. Segundo este modelo clássico, a ativação do sistema de coagulação compreende duas vias distintas, a saber: a via extrínseca, que inclui elementos usualmente ausentes do espaço intravascular, e a via intrínseca, a qual apenas componentes intravasculares. Ambas as vias convergem para uma via comum a partir da ativação do fator X. A ativação da via extrínseca inicia-se quando o FVII plasmático é ativado na presença do fator tissular (FT), formando o complexo fator VIIa/FT, o qual ativa o fator X. O fator Xa, em conjunto com o fator Va (ativado por traços de trombina), Ca²⁺ e fosfolípidos de carga negativa, forma o complexo protrombinase, o qual converte o fator II (protrombina) em IIa, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, a transformação do fibrinogênio (fator I) em fibrina. A via intrínseca, por sua vez, é iniciada pela ativação do fator XII, quando da exposição do sangue a uma superfície com carga elétrica negativa. Uma vez ativado, o FXIIa, este ativa o fator XI, o qual ativa o fator IX; este, na presença de fator VIIIa (o qual é ativado por traços de trombina) e de íons cálcio, forma o complexo tenase, capaz de ativar o fator X, transformando-o em FXa, iniciando-se a partir daí a via comum que também culminará na geração de trombina e formação de fibrina (Franco, 2001; Zago *et al.*, 2013) (Fig. 2).

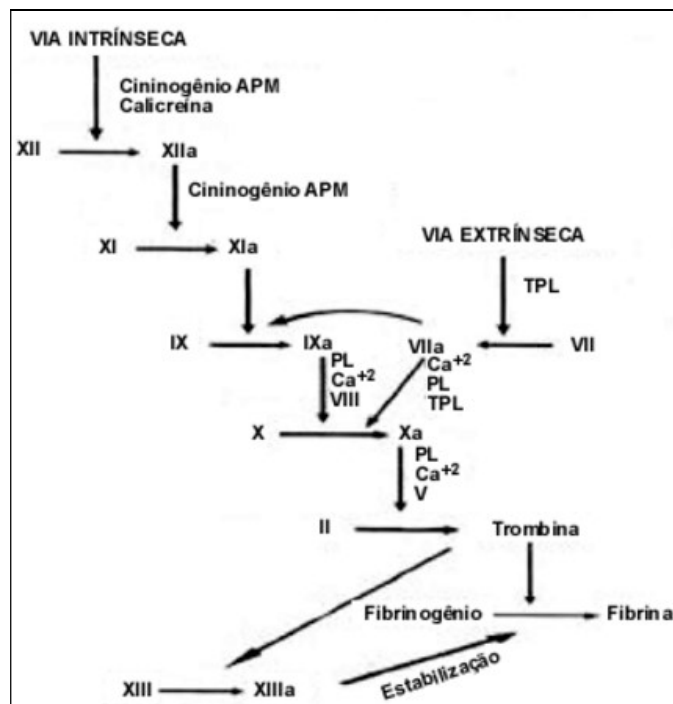


Figura 2. Modelo clássico da cascata de coagulação. Compilado de Blaya et al. (1998). TPL = fator tecidual FT.

Durante o processo de conversão da protrombina (fator II) em trombina (IIa), o fator Xa quebra uma ligação peptídica, produzindo dois resíduos: um fragmento aminoterminal denominado fragmento 1+2 e um fragmento carboxiterminal, que contém o sítio ativo, denominado pretrombina 2. Este último fragmento sofre uma clivagem pelo fator Xa e se transforma na trombina. A trombina é desligada do fragmento 1+2 da protrombina (F1+2) e, desse modo, não permanece ligada à superfície fosfolipídica, ficando livre no plasma (Scazzioti e Altman, 1996).

O conceito de cascata representou um importante avanço no entendimento da coagulação e figurou, por décadas, como um modelo de grande valor e utilidade, o qual é ainda utilizado para explicar o princípio das reações *in vitro* que ocorrem nos testes de triagem da coagulação, tais como tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada.

No entanto, vários fenômenos da hemostasia observados *in vivo* levaram à concepção de que tal modelo não era capaz de explicá-los satisfatoriamente (Riddel, 2007). Considerou-se pouco provável, por exemplo, que as vias intrínseca e extrínseca operem como caminhos redundantes e independentes, sendo aceito que todos os fatores da coagulação se interrelacionam (Hoffman, 2003b; Kaushansky *et al*, 2010). Enfim, muitas dúvidas pairavam sobre várias alterações hemostáticas que acontecem *in vivo*. Entre estas dúvidas, constam algumas perguntas clássicas: Por que portadores de hemofilia tipo A (deficiência do fator VIII da coagulação) sangram mesmo tendo uma via extrínseca que teoricamente supriria uma deficiência na via intrínseca? Por que a administração de fator da coagulação VII pode promover hemostasia em pacientes com hemofilia tipo A? Por que a deficiência do fator da coagulação XII ao invés de gerar hemorragia pode causar trombose? (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007).

Diante de tantas dúvidas relacionadas ao modelo clássico da hemostasia, em 2001, Hoffman e Monroe propuseram um novo modelo da hemostasia, respondendo a várias perguntas que o modelo tradicional não esclarecia. O modelo da hemostasia baseado em superfícies celulares evidencia como “chave na hemostasia” a participação do fator tecidual (FT) ou fator III presente nas membranas de células como monócitos, fibroblastos e plaquetas e coloca a hemostasia

intensamente controlada pela geração da trombina. Neste modelo, divide-se didaticamente a hemostasia em iniciação, amplificação e propagação, embora estes eventos ocorram praticamente simultaneamente e por último a finalização, etapa representada pela fibrinólise que tem por objetivo o restabelecimento do fluxo sanguíneo (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007).

3.5.1 PRINCIPAIS COMPONENTES ENVOLVIDOS NA HEMOSTASIA

3.5.1.1 Endotélio vascular

Pesquisas com ênfase em endotélio rendeu a vários pesquisadores o prêmio Nobel de Medicina, tamanha a sua importância (Ignarro *et al.*, 1987). O endotélio vascular, no passado, era considerado apenas como uma barreira física, porém, atualmente já se sabe que o endotélio participa ativamente da hemostasia tendo funções pró-coagulantes e anticoagulantes. O endotélio também possui outras funções no organismo não relacionadas à coagulação tais como regulação da pressão arterial e na vasodilatação mediante a liberação de óxido nítrico, na aterosclerose e na migração de partículas de tamanhos e pesos moleculares diversos (Furchgott e Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988; Carvalho *et al.*, 2001).

O endotélio está localizado revestindo a luz dos vasos sanguíneos, o qual é constituído de uma camada íntima, uma camada média e uma camada externa. Na camada média há presença de colágeno, células musculares lisas e fibroblastos. Na camada externa, há a presença de tecido conjuntivo. Dentro do vaso sanguíneo, o fluxo do sangue exerce uma força de cisalhamento ou *shear stress* sobre as células endoteliais estimulando a produção de óxido nítrico, pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Furchgott e Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988).

Em condições fisiológicas, as células não se aderem ao endotélio, mantendo um fluxo sanguíneo laminar. A força de cisalhamento que as células circulantes exercem sobre o endotélio mantém uma liberação bem regulada de óxido nítrico que contribui para o relaxamento do endotélio e para que não ocorra a adesão de células bem como a ativação de plaquetas (Furchgott e Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988).

Quando ocorre qualquer lesão neste endotélio com exposição do subendotélio e camada média, plaquetas e outras células que participam da inflamação migram imediatamente para aquela região, devido à exposição de componentes endoteliais como o colágeno e o fator de von Willebrand (Stokes e Granger, 2012). Quando ocorre lesão endotelial, a coagulação sanguínea é ativada, devido à exposição do sangue ao fator tecidual da coagulação ou fator III (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007). Este fato justifica o motivo pelo qual pacientes com enfermidades que cursam com lesões do endotélio como a aterosclerose e outras doenças altamente inflamatórias estão predispostos à ocorrência de trombose, devido ao estado de hipercoagulabilidade consequente à injúria endotelial (Stokes e Granger, 2012).

No endotélio vascular estão presentes diversos componentes com atividades pró-coagulantes como o fator VIII e o fator de von Willebrand (o fator de von Willebrand também transporta o fator VIII), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e o fator tecidual ou fator III. Paradoxalmente, no endotélio estão presentes diversos componentes anticoagulantes como o sulfato de heparan, que é um cofator da antitrombina e que potencializa a sua ação; trombomodulina, prostaciclina I₂, óxido nítrico, ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) (Ghoshal e Bhattacharyya, 2014).

3.5.1.2 Plaquetas

As plaquetas foram descobertas no final do século XIX e por muito tempo suas funções não foram bem definidas. Elas participam ativamente da hemostasia e também desempenham marcante atividade no processo inflamatório e na defesa contra patógenos, como reportado mais recentemente (Stokes e Granjer, 2012; Ghoshal e Bhattacharyya, 2014). As plaquetas têm papel essencial na hemostasia primária ou fase vaso plaquetária, formando um *plug* no local de lesão vascular, o qual é posteriormente coberto por uma rede de fibrina formando o trombo (Ghoshal e Bhattacharyya, 2014).

As plaquetas possuem diâmetro entre 2 a 4 μ c e são produzidas na medula óssea por um processo de endomitose de megacariócitos após estímulo da trombopoietina. As plaquetas são compostas de membrana bicamada fosfolípídica contendo receptores glicoproteicos para funções de adesão GP Ib/IX/V/VI e agregação GP IIb/IIIa e receptores ativados por proteases, PAR, havendo os tipos PAR-1 (VU *et al.* 1991); PAR-3 presentes somente em murinos (Sambrano *et al.* 2001) e PAR-4 (Kahn *et al.* 1998; Nakanish-Matsui *et al.*, 2000).

No interior das plaquetas há uma miríade de substâncias hemostaticamente ativas contendo grânulos denominados como densos e α . No interior das plaquetas também são armazenadas pequenas quantidades de trombina, que poderão ser utilizadas na inicialização da coagulação e ainda a presença de lisossomas, mitocôndrias e retículo endoplasmático (Vendramin *et al.*, 2006; Blair e Flaumenhaft, 2009; Ghoshal e Bhattacharyya, 2014).

3.5.1.3 Grânulos densos plaquetários

Os grânulos densos plaquetários recebem este nome por apresentarem-se eletrodensos à microscopia eletrônica (Boudreaux, 2010). Eles sintetizam e ou armazenam serotonina, histamina, cálcio, magnésio, fosfatos inorgânicos, ADP e ATP (Boudreaux, 2010; Ghoshal e Bhattacharyya, 2014).

3.5.1.4. Grânulos α plaquetários

Os grânulos α estão em maior quantidade que os grânulos densos nas plaquetas. Eles são capazes de sintetizar e ou armazenar alguns componentes como fatores de coagulação V, VIII, XI e XIII; trombina, fibrinogênio, proteínas de adesão, β -trombomodulina, fator plaquetário-4 - PF-4- proteína S, PAI-1 e fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas - PDGF; fator de crescimento de fibroblasto - FGF; fator de crescimento epitelial - EGF; fator de crescimento de endotélio vascular - VEGF, glicoproteínas GPIb-IX-V, GPIIb-IIIa, PECAM-1, receptor de vitronectina e GPIV (Blair e Flaumenhaft, 2009; Boudreaux, 2010; Ghoshal e Bhattacharyya, 2014).

3.5.2 HEMOSTASIA BASEADA EM SUPERFÍCIES CELULARES E O PAPEL DE ALGUNS FATORES DA COAGULAÇÃO

3.5.2.1 Trombina (fator IIa)

A trombina ou fator da coagulação IIa é uma serinoprotease da família das quimiotripsinas que é dependente da vitamina K para que seja ativada na via metabólica hepática denominada como gamacarboxilação oxidativa semelhantemente aos fatores VII, IX e X que também precisam desta ativação (Danckwardt *et al.* 2013). O precursor da trombina é o seu zimogênio, a protrombina. Após pequenas quantidades de trombina gerada o sistema de coagulação irá se amplificando. Somente haverá uma *burst* de geração de trombina para propagar a coagulação após a protrombina ser clivada pelo complexo protrombinase formada pelo fator de coagulação Xa e Va e pelo complexo tenase formados pelos fatores IXa e VIIIa na presença de Ca^{++} na superfície plaquetária (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007). A trombina tem múltiplas funções, sendo a sua geração o passo “chave” no processo da hemostasia. Por ser um dos pontos mais importantes da hemostasia e coagulação, diversas toxinas animais e, principalmente, toxinas presentes nos venenos de diversas espécies de serpentes atuam justamente na conversão da protrombina em trombina (Kini, 2005).

A trombina atua como pró-coagulante catalisando a conversão do fibrinogênio em monômeros de fibrina liberando os fibrinopeptídeos alfa e beta e a ativação do fator de coagulação XIII, que irá tornar o coágulo de fibrina, antes hidrossolúvel, em um coágulo formado por ligações covalentes, mais estável e insolúvel. O fator XIII, diferentemente das outras proteínas da coagulação que são serinoproteases, é uma transglutaminase (Weisel, 2005). A trombina irá também ativar os fatores V e VIII, fundamentais para a formação do complexo protrombinase e tenase que garantirão a amplificação e propagação da coagulação. Adicionalmente, a trombina ativa as plaquetas via receptores ativadores de proteases PAR-1 e PAR-4 (Di Cera, 2008; Danckwardt *et al.* 2013).

A regulação negativa da trombina se dá principalmente pela antitrombina III e serpinas. Paradoxalmente à atividade pró-coagulante, a trombina realiza um *feed-back* negativo se ligando à trombosmodulina nas células do endotélio e ativa a proteína C, que atuará inibindo a ativação do fator V e VIII, sendo uma forma de reduzir a ativação da coagulação (Esmon *et al.*, 1981; Fulcher *et al.*, 1984; Guinto *et al.*, 1984). A trombina, apesar de ser uma protease fundamental para o adequado funcionamento do sistema hemostático, também participa efetivamente em outras condições fisiológicas e patológicas. Conforme ampla revisão realizada por Danckwardt *et al.* (2013), a trombina também participa do desenvolvimento embrionário, angiogênese, inflamação aguda e crônica, aterosclerose, ativação do sistema do complemento e no desenvolvimento tumoral.

3.5.2.2 Fator tecidual (FT) e Fator VII

O FT ou fator III é uma proteína transmembrânica e está presente nas plaquetas, monócitos, células de músculo liso e em fibroblastos ao redor do leito vascular (Boudreaux, 2010).

Estudos têm demonstrado que durante a fase de cicatrização e remodelamento de feridas, ao redor dos neovasos há pouca expressão do fator tecidual, sendo o motivo que tecidos de granulação sangram facilmente. A ausência do fator tecidual ao redor destes neovasos é para que não ocorra trombose nestes vasos em formação (Hoffman, 2008). No modelo de cascata da coagulação, o fator tecidual é o responsável pelo início da via extrínseca da coagulação ativando e se complexando com o fator VII.

No modelo da hemostasia baseado em superfícies celulares, a coagulação só inicia quando ocorre o contato do sangue com as células que expressam FT o que acontece após o dano

vascular (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

O fator da coagulação VII é sintetizado no fígado e é dependente da vitamina K para a sua ativação. A forma recombinante sintética tem sido empregada em diversas situações clínicas com a finalidade de reduzir hemorragias massivas e hemotransfusões. O seu uso está regulamentado na profilaxia de sangramentos nos casos de hemofilia tipo A e B, trombastenia de Glanzmann e deficiência hereditária do fator VII bem como tem sido utilizado amplamente em hemorragias massivas provenientes de trauma, cirurgias hepáticas, entre outras situações (Vince e Brandão, 2009). As complicações mais relatadas que podem ocorrer são os fenômenos de hipercoagulabilidade (Vince e Brandão, 2009).

O fator VII tem sido comercializado na forma recombinante e está em uso clínico em diversas situações, sendo inclusive sugerido seu uso em envenenamentos ofídicos (Ruha *et al.*, 2009). Novamente surge o questionamento anterior: como o fator de coagulação VII irá promover hemostasia em pacientes com hemofilia tipo A ou mesmo nas situações citadas anteriormente sem que haja a deficiência deste fator de origem genética? O modelo da hemostasia baseado em superfícies celulares esclarece esta questão demonstrando que este fator será capaz de ativar diretamente o fator da coagulação IX e o fator X na superfície das células que expressam o fator tecidual gerando pequenas quantidades de trombina que são suficientes para iniciar a coagulação (Hoffman e Monroe, 2007).

3.5.2.3 Fator da coagulação XII

O fator XII, como a maior parte dos fatores de coagulação, é sintetizado no fígado na forma de proenzima sendo ativado quando exposto a uma superfície de carga negativa. Foi descrito inicialmente por Oscar Ratnoff e Joan Colopy (1955) durante a avaliação de um paciente com indicação cirúrgica, sem sinais clínicos de hemorragias, contudo com TTPa prolongado. Este fator recebeu o nome deste paciente, fator de Hageman, sendo mais tarde denominado como fator XII. Com o estudo da cascata da coagulação, este fator recebeu grande importância, visto que ele ativa *in vitro* o fator XI (Macfarlane, 1964; Davie e Ratnoff, 1964).

Atualmente, o modelo da hemostasia *in vivo* coloca em evidência o papel do fator de coagulação XII, pois a sua deficiência não impede a ativação dos demais fatores da coagulação, e este pode não participar da coagulação *in vivo*. Outro ponto importante é que, a deficiência deste fator XII não promove graves sangramentos, sendo um mediador importante de efeitos trombóticos em modelos animais (Woodruff *et al.*, 2011).

Alguns pesquisadores têm reportado que em modelos de primatas e roedores, a ativação do fator XI mediado pelo fator XII contribui para a formação de trombos e que a inibição desta ativação do fator XI pode ser um alvo terapêutico antitrombótico (Cheng *et al.*, 2010). Alguns mamíferos (baleias) e cetáceos (golfinhos) não têm o fator de coagulação XII, podendo esses animais serem usados para comparar aspectos fisiológicos e patológicos da hemostasia entre os mamíferos. É evidente que não é necessário a presença do fator XII para a coagulação normal, embora existam muitas incógnitas sobre o papel deste fator da coagulação (Gailani e Renné, 2007).

3.6 FASES DO MODELO *IN VIVO* DA HEMOSTASIA BASEADO EM SUPERFÍCIES CELULARES

3.6.1 Fase de iniciação

A iniciação da coagulação ocorrerá na superfície das células que expressam o fator tecidual (FT), como na superfície de monócitos e fibroblastos. Ressalta-se que todas as etapas da coagulação dependem da presença de uma membrana fosfolipídica e do fator da coagulação IV, ou seja, o íon cálcio. O FT é essencial para a ativação do fator VII da coagulação formando-se

um complexo FT/FVII para posterior ativação do fator X. O FXa irá ativar o fator V. Após a ativação do FVa será formado o complexo FXa/FVa culminando com a geração de pequenas quantidades de trombina (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

Adicionalmente, o complexo FT/FVII também é capaz de ativar o fator da coagulação IX, que irá formar o complexo tenase associando-se ao FVIIIa. Esta etapa também irá ativar mais fator X e será capaz de gerar pequenas quantidades de trombina (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

3.6.2 Fase de amplificação

As pequenas quantidades de trombina geradas inicialmente exercerão função de retroalimentação da coagulação promovendo a ativação dos fatores V, VIII e XI e, assim, amplificando a coagulação, cuja etapa ocorre na superfície de plaquetas ativadas. Com esta amplificação, cada vez mais será gerada uma maior quantidade de trombina e maior ativação, adesão e agregação plaquetária, e propagação da coagulação (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

3.6.3 Fase de propagação

A propagação ocorre na superfície plaquetária. Nesta fase há uma grande formação de complexo tenase IXa/VIIIa e complexo protrombinase Xa/Va resultando em intensa geração de trombina para que ocorra uma hemostasia efetiva e uma maior conversão do fibrinogênio nos monômeros de fibrina. Ocorrerá ainda ampla ativação, adesão e agregação plaquetária para os sítios com sangramentos. Estes fenômenos estão apresentados na Fig. 3 (Hoffman e Monroe, 2001; Hoffman, 2003; Hoffman e Monroe, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

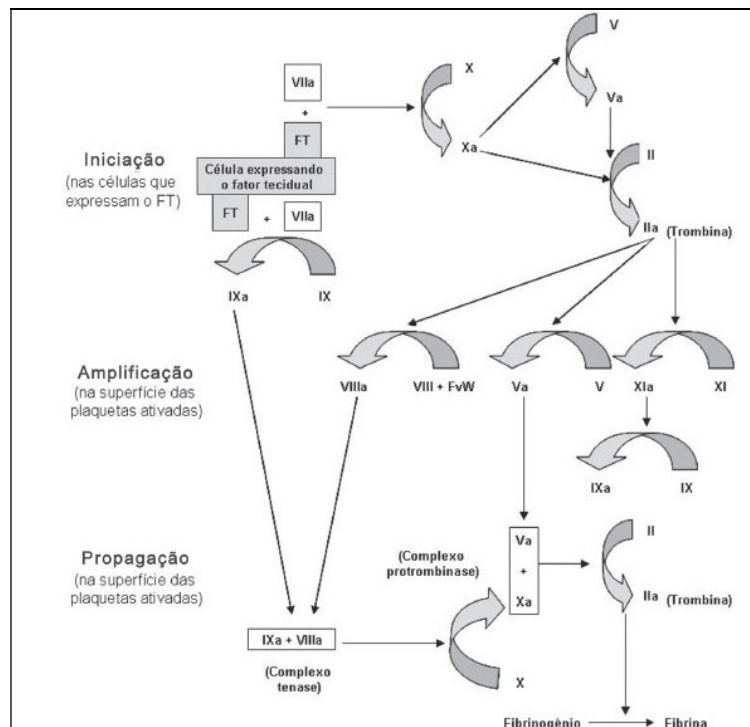


Figura 3. Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares, ilustrando as fases de iniciação, amplificação e propagação (Hoffman, 2003 e revisado por Ferreira *et al.*, 2010).

3.6.4 Fase de finalização (fibrinólise)

Conforme o próprio conceito de hemostasia que é manter o sangue fluido no interior dos vasos sanguíneos após cessar um sangramento, os trombos formados nos locais de lesão vascular precisam ser degradados, enquanto a ativação dos fenômenos de coagulação deve ser reduzida para um nível basal. Tal redução é obtida pela atuação de inibidores fisiológicos da coagulação como a antitrombina, proteína C, proteína S e inibidor da via do fator tecidual (TFPI) (Smith, 2010).

Para a degradação dos trombos formados há o sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina. Este sistema irá degradar o coágulo estável de fibrina em produtos da degradação da fibrina e em dímeros-D. Para a atuação deste sistema, é necessário que o plasminogênio seja ativado a plasmina, sendo esta última a responsável pela clivagem da fibrina. O plasminogênio pode ser ativado pelo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase - uPA e principalmente pelo ativador de plasminogênio do tipo tecidual - tPA sendo ambos ativadores liberados pelo endotélio vascular e regulados pelo inibidor de ativação de plasminogênio - PAI (Smith, 2010).

3.7 OS TESTES DE HEMOSTASIA E O NOVO MODELO *IN VIVO* DA COAGULAÇÃO

Os exames de triagem da hemostasia como o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) são exames que avaliam tradicionalmente a via extrínseca e intrínseca, respectivamente, e ambos avaliam a via comum no modelo de cascata da coagulação (Macfarlane, 1964; Davie e Ratnoff, 1964). Contudo, estes testes, não refletem a complexidade dos fenômenos hemostáticos *in vivo*. Mas ressalta-se que não há um teste que avalie totalmente todas as fases envolvidas na hemostasia, devido a grande complexidade e envolvimento de muitas proteínas, células, íons, plaquetas entre outras moléculas envolvidas no sistema (Ninivaggi e Apitz-Castro, 2012). Um teste de hemostasia ideal deveria ser realizado em sangue total devido à presença de todos os componentes envolvidos na hemostasia (Ninivaggi e Apitz-Castro, 2012).

Estes testes têm maior aplicação para avaliar as condições de hipocoagulabilidade e estarão alterados quando houver deficiência moderada a grave de um ou mais fatores da coagulação. A ocorrência de uma alteração moderada nos valores destes testes pode não refletir a real chance de um paciente evoluir com hemorragia (Hoffman e Monroe, 2007). Estas provas hemostáticas refletem apenas a fase inicial da coagulação, visto que, o valor obtido do teste não indica o potencial total de formação de trombina, pois quando o coágulo é formado, houve aproximadamente a formação de apenas 5% de trombina (Ninivaggi e Apitz-Castro, 2012). O TP e TTPa também não refletem com fidedignidade as fases de amplificação e propagação da hemostasia, quando acontece a maior geração de trombina durante a coagulação (Mann *et al.*, 2003; Wolberg, 2007).

Ainda que os testes de TP e TTPa não demonstrem o que ocorre totalmente *in vivo* na hemostasia, eles devem continuar sendo realizados como testes de triagem da hemostasia, sobretudo para os distúrbios de hipocoagulabilidade. Além do mais, estes testes estão muito bem padronizados na monitorização de pacientes com hemofilia tipo A (Hoffman e Monroe, 2007).

Todavia, os testes de TP e TTPa não se correlacionam bem com as probabilidades de sangramento, a não ser que estejam com um alargamento muito intenso a infinito sendo necessários testes mais precisos como a geração de trombina (Hemker *et al.*, 1993; Hemker e Beguin, 1995; Hemker *et al.*, 2003; Gatt *et al.*, 2008).

Testes globais da hemostasia têm sido utilizados, com o objetivo de se entender melhor o que ocorre no sistema hemostático em diferentes situações clínicas tanto com hipocoagulabilidade quanto hipercoagulabilidade. A tromboelastografia é uma técnica global, que utiliza sangue total em sua realização, e tem indicação em situações de possível hemorragia aguda (Sulaiman *et al.*, 2014). Esta prova da hemostasia já foi estudada em envenenamentos ofídicos, e pode prever a gravidade das alterações hemostáticas nos envenenamentos que cursam com hipocoagulabilidade, mas sua avaliação se dá principalmente após a formação do coágulo, predizendo a viscosidade e elasticidade deste coágulo formado (Hadley *et al.*, 1999; Armentano *et al.*, 2014).

3.7.1 Teste de geração de trombina - TGT

O teste de geração de trombina também é um método global de avaliação da hemostasia, cuja metodologia semiautomatizada é capaz de quantificar a geração de trombina continuamente em determinado período de tempo. O teste de geração de trombina pela metodologia *Calibrated Automated Thrombogram (CAT)* irá informar a cinética da quantidade de trombina gerada durante uma hora (Hemker *et al.*, 1993; Hemker e Beguin, 1995; Hemker *et al.*, 2003; Espitia e Fouassier, 2015). O TGT pode ser realizado com baixas ou altas concentrações de fator tecidual na presença de fosfolípidos de membrana e Ca^{++} . A quantificação da trombina gerada, em nanomolares, pode ser obtida mediante comparação com um calibrador de trombina de concentração conhecida. No ensaio em amostra de plasma pobre em plaquetas (PPP) o exame é mais sensível à detecção de deficiências dos fatores VIII, IX e XI, inibidores diretos da trombina e do fator Xa (Brinkman *et al.*, 2015).

O TGT foi inicialmente proposto há mais de cinco décadas atrás como uma forma de quantificar a trombina, porém a metodologia era extremamente laboriosa (MacFarlane e Biggs, 1953). Somente no início deste século, valendo-se dos avanços tecnológicos, é que foi possível a determinação do potencial de geração de trombina por métodos cromogênicos ou fluorimétricos, sendo este último o mais utilizado e promissor por ser potencialmente mais adaptável à clínica e em estudos experimentais (Hemker *et al.*, 2003).

Com o TGT, é possível determinar de forma global e com maior acurácia o equilíbrio entre as forças pró-coagulantes e anticoagulantes de determinada amostra de plasma pobre ou rico em plaquetas coletado em citrato de sódio com demonstração de toda a cinética da formação da trombina daquela amostra (Castoldi e Rosing, 2011; Espitia e Fouassier, 2015). Portanto, esta técnica poderá auxiliar na monitoração do paciente vítima de envenenamento ofídico, como nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, cujo veneno possui toxinas de origem proteica e não proteica com atividades pró-coagulantes e anticoagulantes no mesmo veneno o que certamente impactará no perfil de geração da trombina (Castro *et al.*, 1998; Escalante *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2007; Escalante *et al.* 2011; Sajevic *et al.*, 2011; Markland Jr e Swenson, 2013; Serrano, 2013). A técnica de geração de trombina tem sido amplamente estudada nos casos de pacientes com hemofilia A e B e trombofilias (Espitia e Fouassier, 2015). As maiores limitações para a realização do TGT são ainda devido à falta de padronização dificultando o estabelecimento de valores de referência para as várias condições experimentais, bem como interferências pré-analíticas, que podem ocorrer em todas as técnicas hemostáticas (Kashuk *et al.*, 2009).

As curvas obtidas do teste de geração de trombina podem refletir particularidades para cada tipo de fator deficiente no plasma. Em estudo de geração de trombina em plasmas com diferentes concentrações de cada fator da coagulação, a deficiência do fator II, V e X são os que mais interferiram na geração de trombina, com valores praticamente nulos. A ausência do fator de coagulação VIII e IX interfere moderadamente na geração de trombina, uma vez que amostras de plasma deficientes nesses fatores foram capazes de gerar alguma quantidade de trombina. Pelo contrário, a deficiência dos fatores XI e XII embora eleve o *lagtime*, ou seja, há uma maior

demora em começar a geração de trombina, a quantidade gerada de trombina é muito significativa e maior que no grupo controle do estudo (Zavyalova e Kopylov, 2016).

Os seguintes parâmetros são gerados pelo teste de geração de trombina constituindo o trombograma (Figura 4) pela metodologia *CAT* (Hemker *et al.*, 1993; Hemker e Beguin, 1995; Hemker *et al.*, 2003; Espitia e Fouassier, 2015):

- *Lagtime* (min): tempo necessário para começar a gerar trombina, isto é, tempo de latência sendo no novo modelo da hemostasia correspondente à inicialização. A coagulação começa no final do *lagtime*, correspondendo à etapa de inicialização do novo modelo de hemostasia baseado em superfícies celulares. A unidade é em minuto.
- Inclinação ascendente máxima (*maximal rising slope*): taxa de formação da trombina > taxa de inibição da trombina. “Explosão de formação de trombina”. A unidade é nanomolar por minuto.
- Altura do pico (*peak height*) (nM): taxa de formação da trombina = taxa de inibição da trombina. Concentração máxima de trombina gerada, correspondendo à propagação da coagulação. A unidade é nanomolar por minuto.
- Tempo para atingir o pico (*time to peak*): tempo necessário para atingir o máximo de formação de trombina. A unidade é em minuto.
- Potencial endógeno de trombina (*endogen thrombin potential - ETP*): área sob a curva. Indica a quantidade gerada de trombina. A unidade é nanomolar por minuto.

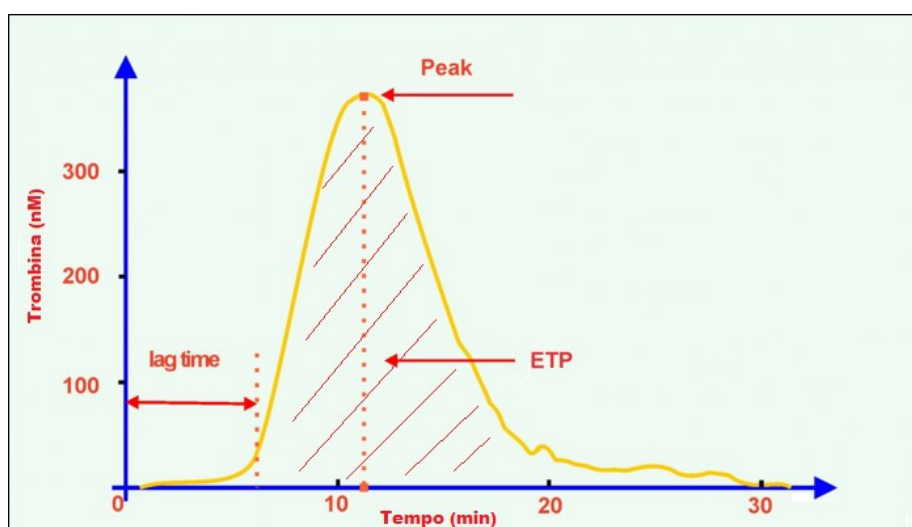


Figura 4. Parâmetros da curva de Geração de Trombina pelo método de *CAT*. *Lagtime* = Tempo de latência; *Peak* = Pico; *ETP* = potencial endógeno de trombina.

3.8 ENVENENAMENTO BOTRÓPICO E INFLAMAÇÃO

Nos acidentes ofídicos pode ser observada uma resposta inflamatória e as PLA₂ juntamente com as SVMPs estão intimamente relacionadas ao desencadeamento deste processo nos envenenamentos botrópicos e ainda outras substâncias pouco estudadas ou desconhecidas. O edema, ativação e migração de leucócitos hiperalgisia, liberação de citocinas diversas, ativação de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos entre outras são reportados decorrentes dos efeitos de PLA₂ e SVMPs (Teixeira *et al.*, 2005; Mamede *et al.*, 2016).

Foi demonstrado haver uma liberação de citocinas e eicosanoides no local de inoculação do veneno, sendo este um dos eventos responsáveis pela iniciação e amplificação da inflamação (Zamuner *et al.*, 2005). Adicionalmente, conforme demonstrado por Luna *et al.* (2010) em estudo *in vitro* com o veneno de *B. erythromelas*, foi demonstrado que o veneno desta espécie foi muito mais pró-inflamatório com maior liberação de óxido nítrico e maior indução de morte celular comparado ao veneno de *Crotalus durissus cascavella*. Foi isolado do veneno de *B. leucurus* uma PLA₂ ácida denominada BI-PLA₂. Esta enzima foi capaz de promover uma elevação nos níveis de IL-12p40, TNF- α , IL-1 β e IL-6 sem variação nos níveis de IL-8 e IL-10 em células mononucleares periféricas humanas *in vitro* (Nunes *et al.*, 2011). A lesão que ocorre no sítio de inoculação do veneno envolvendo a mionecrose está intimamente relacionada com a inflamação induzida por toxinas do veneno. Um outro estudo demonstrou que a utilização de anti-inflamatório esteroide, no caso dexametasona, antagonizou os efeitos inflamatórios e miotóxicos dos venenos de serpentes *Bothrops* (Patrão-Neto *et al.*, 2013).

Para Mamede *et al.* (2016), tanto as SVMPs quanto as PLA₂ provenientes do veneno de serpente *B. alternatus* são responsáveis pelos efeitos locais. Também foi confirmado que, as reações inflamatórias provenientes do veneno de *B. moojeni* são mediadas por eicosanoides, histamina, óxido nítrico e bradicinina induzindo miotoxicidade e hiperalgisia. Por outro lado, a histamina, óxido nítrico e leucotrienos, apesar de também induzirem os mesmos efeitos, no caso de envenenamento por peçonha de serpente *B. alternatus*, tem menor papel na formação do edema e miotoxicidade.

A inflamação quando ocorre de forma equilibrada é benéfica, atuando para que haja restabelecimento da homeostase do organismo. Entretanto, alguns casos, esta inflamação pode atingir proporções grandiosas evoluindo para a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos culminando com a morte do paciente (Johnson *et al.*, 2004). A inflamação pode lesionar os tecidos pela ação de mediadores diversos liberados por monócitos circulantes, macrófagos teciduais, plaquetas, granulócitos, ativação da imunidade celular e humoral e ainda ocasionar distúrbios da coagulação (Gonçalves, 2010).

As interleucinas IL-1, IL-6 e TNF- α induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos como a indução de proteínas de fase aguda (Bilate, 2007; Declue *et al.*, 2012). Segundo Barraviera *et al.* (1995), pessoas vítimas de envenenamento ofídico por serpentes do gênero *Bothrops* spp e *Crotalus durissus* apresentam elevação de interleucinas principalmente de IL-6, IL-8 e proteína C reativa, demonstrando que algumas características inflamatórias agudas são semelhantes as que ocorrem no trauma. Rucavado *et al.* (2002) reportam incremento de IL-1 e IL-6 mas, ausência do TNF- α em homogeneizado de músculo gastrocnêmio de camundongos inoculados com miotoxina III de *B. asper* (PLA₂ e metaloproteinase de veneno classe P-I).

O sistema de coagulação, ativado pelo fator de Hageman - XII (via intrínseca no modelo clássico) intervém através dos fibrinopeptídeos, liberados pelo fibrinogênio durante a formação da fibrina e os produtos da degradação da fibrina (PDFs) favorecendo a lise do coágulo. Os fibrinopeptídeos aumentam ainda mais a permeabilidade capilar e os PDFs têm ação quimiotática para neutrófilos. Na fase de fibrinólise, quando esta é muito excessiva, pode haver

distúrbios da coagulação, favorecendo e perpetuando as hemorragias agudas do trauma (CRASH-2, *et al.*, 2010).

Os fenômenos fibrinolíticos decorrentes da inflamação do trauma têm sido amplamente estudados (CRASH-2, *et al.*, 2010). Após as injúrias teciduais, a fibrinólise excessiva gera instabilidade do coágulo, sendo isto fator perpetuante para as hemorragias, sendo estes fenômenos reconhecidos também no cão politraumatizado (Mischke, 2005).

Mamede *et al.* (2016) reportam que ocorre envolvimento de mediadores lipídicos na inflamação local decorrente de envenenamento por *B. alternatus* e *B. moojeni*. Ainda neste estudo, foi relatado o envolvimento de óxido nítrico, histamina e bradicinina. Entretanto, quando administrado anti-histamínico seletivo para receptores H1 nos animais inoculados por veneno de *B. alternatus*, esses não foram capazes de abolir totalmente o edema. Todavia, leucotrienos e óxido nítrico parecem participar na inflamação local decorrente do envenenamento por *B. moojeni*, mas não no processo causado pelo veneno de *B. alternatus* (Mamede *et al.*, 2016).

3.8.1 Células inflamatórias

Os neutrófilos constituem as primeiras células de defesa a infiltrar na área lesionada. Eles possuem atividade fagocítica e variado complexo enzimático, constituído de hidrolases ácidas, peroxidase, fosfatase, lisozimas, lactoferrina, proteínas catiônicas, collagenase, elastase e lipases. Na inflamação, após o processo de marginação, tanto células endoteliais quanto os leucócitos circulantes são ativados pelas substâncias inflamatórias circulantes. Inicia-se, então, a fase de rolamento dos leucócitos que por meio da exposição de seus receptores, L-selectinas, e a interação destes com os receptores P selectinas das células endoteliais ativadas, desenvolvem uma fase de adesão frouxa com as células endoteliais que produzem este processo de rolamento (Mitchell *et al.*, 2006).

A adesão firme ocorre posteriormente, por meio do contato das integrinas leucocitárias com as imunoglobulinas endoteliais. Assim, no início do processo destacam-se as selectinas, dentre elas a P-selectina, que participa apenas no rolamento, enquanto a E-selectina participa tanto no rolamento quanto na adesão de leucócitos ao endotélio. Após a forte adesão ao endotélio, os leucócitos migram através de junções interendoteliais (diapedese) e se dirigem aos sítios de inflamação guiados pelos fatores quimiotáticos (Mitchell *et al.*, 2006; Pereira e Bogliolo, 2006).

Os macrófagos são os monócitos ativados e presente no tecido com ação fagocítica, principalmente em relação a elementos volumosos como células mortas e resíduos teciduais. Monócitos são ativados por substâncias produzidas pelos linfócitos T imunologicamente ativadas, endotoxinas bacterianas e substâncias químicas variadas. Por sua vez, esses macrófagos ativados liberam substâncias que irão intervir na inflamação (Mitchell *et al.*, 2006; Pereira e Bogliolo, 2006). Queiroz e Petta (1984) mostraram que há intensa atividade fagocitária no sítio de inoculação do veneno de serpente *B. alternatus*. Esta fagocitose ocorre da periferia para o centro nas fibras musculares.

Outros granulócitos participam da inflamação. Trata-se dos eosinófilos, que obedecem a uma quimiotaxia sob dependência dos mastócitos e basófilos, cujo papel se confunde com o dos mastócitos, sendo bem específica a maior parte dos casos onde há a sua grande liberação como nos processos alérgicos e infecções parasitárias (Mitchell *et al.*, 2006).

Os monócitos são atraídos por várias vias e, uma vez nos tecidos (macrófagos) são ativados para eliminar bactérias ou fagocitar. Os macrófagos liberam collagenase e elastases que lisam o tecido conjuntivo. Também liberam o fator ativador de plasminogênio que resulta na produção de plasmina. Pela liberação de IL-1 também promovem ativação de fibroblastos, responsáveis pela

síntese de colágeno para o reparo da lesão. O colágeno é depositado e gradualmente remodelado até que a área volte ao normal. A tensão de oxigênio reduzida, no foco da lesão, estimula a secreção de moléculas pelo macrófago que promovem a neovascularização para que a tensão de oxigênio seja restabelecida (Mitchell *et al.*, 2006; Pereira e Bogliolo, 2006).

3.8.2 Proteinograma fracionado

Os envenenamentos ofídicos podem promover uma grande variação no perfil proteico do paciente devido aos estímulos inflamatórios como revisado anteriormente e resposta imunológica do paciente frente à agressão (Barraviera *et al.* 1995; Luna *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2011; Telles *et al.*, 2014).

A avaliação deste perfil proteico pode auxiliar a elucidar a fisiopatologia e diagnosticar os danos inflamatórios agudos e crônicos e a ativação de resposta imune de forma acurada. Após um estímulo inflamatório ou infeccioso, o fígado pode sintetizar diversas proteínas, como as proteínas de fase aguda positiva ou reduzir a síntese de outras, como as proteínas de fase aguda negativa (Barraviera *et al.*, 1995; Freitas *et al.*, 2011; Telles *et al.*, 2014).

A eletroforese de proteínas séricas separa estas proteínas com base em suas características físicas como suas cargas negativas, positivas ou nulas e a sua massa molecular. As proteínas se subdividem em albumina sendo esta a proteína em maior quantidade, globulinas que podem se subdividir em α_1 , α_2 , β_1 e β_2 e a outra fração composta por γ globulinas (Cray *et al.*, 2009).

As demais frações são α globulinas que, por conseguinte subdividem-se em (Naoum, 1990):

- α_1 globulina: composta por α_1 -antitripsina e α_1 -glicoproteína-ácida.
- α_2 globulina: composto por α_2 - macroglobulinas, ceruloplasmina e haptoglobina.
- β globulina: inclui a transferrina, proteína amiloide sérica A, fibrinogênio (plasma).
- γ globulina: composta principalmente por anticorpos.

As principais proteínas de fase aguda positiva, tanto no ser humano quanto no coelho, são a proteína C reativa e a proteína amiloide sérica A. Foi demonstrada a grande expressão da proteína C reativa, como proteína de fase aguda em coelhos infectados com *Encephalitozoon cuniculi* (Cray *et al.*, 2013). Todavia, outras proteínas também foram consideradas, como a α_2 macroglobulina que é uma importante proteína de fase aguda positiva no rato e no coelho (Mackiewicz *et al.*, 1988). A proteína α_2 macroglobulina é uma inibidora de proteases endógenas como de tripsina, trombina e colagenase bem como transportadora de algumas citocinas.

A transferrina é uma β -1 globulina, com função de transporte de ferro do intestino, fígado, sistema reticuloendotelial para todas as células bem como atividade antibacteriana e antiviral. Sua elevação ocorre frequentemente nas deficiências de ferro e redução nas hepatopatias crônicas (Naoum, 1990). Apesar de ser considerada uma proteína de fase aguda negativa, apresentou níveis elevados com haptoglobina e ceruloplasmina, em coelhos, sete dias após infecção com *Eimeria stiedai* (Freitas *et al.*, 2011).

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda positiva presente nos mamíferos, incluindo sua descrição em coelhos. A sua resposta é moderada após estímulo. Possui múltiplas funções, tais como transporte de cobre, atividade ferroxidase e amino oxidase. Em coelhos com anemia, foi observada a elevação da ceruloplasmina (Mainero *et al.*, 1996). A ceruloplasmina responde de forma moderada após estímulos inflamatórios.

A haptoglobina do coelho, em relação ao ser humano, apresenta concentrações bem menores, mas ainda assim, o coelho é capaz de responder com uma elevação, frente a um estímulo inflamatório, como demonstrado 12h após a aplicação do imunógeno turpentina (Murray e Connell 1960). Contudo, uma hemólise pode causar redução da haptoglobina (Naoum, 1990).

A albumina constitui a proteína em maior quantidade do plasma. Ela exerce múltiplas funções como manutenção da pressão coloidosmótica, transporte de fármacos, pigmentos endógenos, cálcio, fármacos entre outras. Ela é frequentemente utilizada como marcador inflamatório negativo devido à redução de seus níveis em diversas situações clínicas e também reduz no coelho após estímulo inflamatório (Mackiewicz *et al.*, 1988; Naoum, 2011). Nos processos inflamatórios, a albumina é reduzida tanto por redução de sua síntese pelo fígado bem como aumento do catabolismo e evasão desta para o compartimento extravascular (Naoum, 1990). Segundo Barraviera *et al.*, (1995), 24 horas após acidentes ofídicos em humanos por serpentes *Bothrops spp* e *Crotalus durissus*, os níveis de proteína total e albumina apresentam uma redução. Telles *et al.* (2014), estudando ratos envenenados experimentalmente por peçonha de *B. alternatus* avaliaram o comportamento das proteínas de fase aguda demonstrando redução da proteína total e albumina, porém ocorreu mais tardiamente.

3.9 COMPLICAÇÕES SISTÊMICAS

3.9.1 Injúria renal aguda (IRA) decorrente de veneno de serpentes do gênero *Bothrops*

Os rins são altamente vulneráveis aos efeitos maléficos das toxinas, pois recebem elevado fluxo sanguíneo e por serem capazes de concentrar substâncias na urina. As toxinas presentes em venenos de serpentes de diversas espécies podem promover na vítima, sejam humanos, ou animais, um quadro de injúria renal aguda (IRA) por diversos mecanismos patogênicos (Sitprija, 1998; Santos *et al.*, 2009; Ross, 2011; Sitprija e Sitprija, 2012; Albuquerque *et al.*, 2013).

O funcionamento dos rins é primordial para manter a homeostase do organismo sendo que eles recebem em torno de 20% a 25% do débito cardíaco. Nos cães, em torno de 90% do fluxo sanguíneo renal está direcionado para a região cortical, e menos de 10% para a região medular (Sigrist, 2007).

A IRA é uma síndrome caracterizada pelo aumento abrupto da concentração sérica de ureia e creatinina para valores além dos estabelecidos resultando em azotemia e ou distúrbios eletrolíticos e do equilíbrio ácido-base (Ross, 2011).

A IRA pode ser dividida didaticamente em quatro fases a seguir:

- A primeira, ou fase de iniciação ocorre imediatamente após o insulto para os rins.
- A segunda fase é a fase de extensão, durante a qual a isquemia, hipoxemia, inflamação e lesão celular levam a apoptose celular, necrose ou ambos. As alterações clínicas e laboratoriais podem não ser evidentes durante as duas primeiras fases.
- A terceira fase, ou fase de manutenção, é caracterizada por azotemia, uremia, ou ambos e podem durar dias ou semanas. A oligúria, ou seja, uma produção urinária menor que 0,5 ml de urina/kg de peso corporal por hora, ou anúria podem ocorrer durante esta fase, embora a produção de urina seja altamente variável.
- A quarta fase é a recuperação, durante a qual a azotemia melhora e os túbulos renais podem ter alguma restauração da função. Pode ocorrer poliúria durante esta fase como resultado da restauração parcial da função tubular renal e de diurese osmótica decorrente do acúmulo de solutos. A função renal pode ser restabelecida ou o animal ficar com uma disfunção renal (Ross, 2011).

Entre os critérios para definições de IRA atualmente adotados para o homem incluem-se o RIFLE e AKIN sendo conceitualmente adaptados para a aplicação em cães e gatos com algumas ressalvas, pois frequentemente não se conhece previamente o valor da creatinina daquele animal. A associação internacional *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), define IRA como um aumento da creatinina sérica $\geq 0,3\text{mg.dL}^{-1}$ em 48h ou um aumento $\geq 1,5$ ao valor basal da creatinina conhecida ou presumida até sete dias anteriormente ou um volume urinário $< 0,5 \text{ ml/kg.h}^{-1}$ em 6h (Bellomo *et al.*, 2004; Kdigo, 2012).

3.9.2 Mecanismos da injúria renal aguda nos envenenamentos botrópicos

A injúria renal aguda pode ocorrer nas primeiras 24 horas após o envenenamento por serpentes *Bothrops*. Os mecanismos patogênicos da IRA podem ser gerais e específicos sendo pré-renal, renal e pós-renal em conjunto ou isoladamente. Os principais mecanismos gerais nos acidentes ofídicos são devido a alterações hemodinâmicas como hipovolemia e hipotensão, aumento ou redução da resistência vascular renal; CID, deposição de imunocomplexos nos glomérulos, inflamação (PLA₂ do veneno e ativação de citocinas endógenas) e mecanismos específicos como lesão direta dos componentes do néfron principalmente nos túbulos e glomérulos pelas toxinas presentes no veneno (Castro *et al.*, 2004; Shelton, 2004; Sangiorgio *et al.* 2008; Evangelista *et al.*, 2010; Sitprija e Sitprija, 2012). A manutenção do equilíbrio da bomba de Na⁺/K⁺ ATPase tem função importante para o funcionamento adequado dos túbulos, modulando a reabsorção do Na⁺. Segundo Linardi *et al.* (2011), o veneno de *B. alternatus* promove uma disfunção deste equilíbrio com o aumento da expressão desta bomba de Na⁺/K⁺ ATPase.

Qualquer alteração hemodinâmica culminando com hipoxemia renal e hipovolemia persistentes podem gerar uma necrose tubular aguda (NTA), sendo a necrose tubular aguda frequentemente a causa de IRA em envenenamentos botrópicos (Albuquerque *et al.*, 2013).

A intensidade das lesões renais está diretamente ligada à quantidade de veneno que chega até os rins conforme demonstrado em estudo experimental da toxicocinética de veneno botrópico em ratos (Mello *et al.*, 2010). O veneno destas serpentes pode gerar lesão renal como necrose cortical devido ao vasoespasmo, nefrotoxicidade direta do veneno botrópico e ou CID levando à oclusão vascular com fibrina e isquemia renal (Amaral *et al.*, 1985). Estudos experimentais demonstram que o veneno pode induzir diretamente lesões tubulares mediadas parcialmente pela peroxidação lipídica, mas muitos mecanismos não estão esclarecidos. Estas lesões podem ser evitadas com a administração do soro antibotrópico (Castro *et al.*, 2004).

Dentre as espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, *B. jararacussu* possui um dos venenos mais nefrotóxicos (Milani *et al.*, 1997). Segundo Evangelista *et al.* (2010), a presença de PLA₂ no veneno de *B. marajoensis*, além de induzir hipotensão e bradicardia, também reduz a taxa de filtração glomerular (TFG) e alterações eletrolíticas. Outro estudo experimental demonstrou que o veneno de *B. moojeni* promoveu uma redução da resistência vascular renal (Barbosa *et al.*, 2002).

Segundo Boer-Lima *et al.* (1999), entre 5h e 16h após a administração de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ do veneno de *B. moojeni*, intravenoso em ratos, houve redução da TGF, alterações agudas tubulares e nas estruturas glomerulares compatíveis com NTA. Estes autores relataram que, devido às alterações glomerulares, ocorreu proteinúria persistente por até 48h. Estas alterações também estão relacionadas à marcante atividade proteolítica do veneno e das PLA₂ que causam mesangiólise, formação de microaneurismas e danos aos pedicelos (Boer-Lima *et al.*, 2002).

Segundo Barbosa *et al.*, (2002), além da redução da resistência vascular renal, o veneno de *B. moojeni*, promove natriurese e caliurese, demonstrando grande interferência na fisiologia renal e equilíbrio eletrolítico.

Em estudos da toxicocinética renal do veneno de *B. alternatus*, após a administração intravenosa de 0,8 mg.kg⁻¹ do veneno, este apresentou cinética bioexponencial, sendo detectado no sangue circulante até sete dias após. Nos tecidos renais, foi identificado 30 minutos após, reduzindo progressivamente e de forma similar às concentrações séricas. O veneno também foi detectado nos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais, tecidos perivascular e vascular. Entre três horas a sete dias após ocorreu oligúria. Dentro das três primeiras horas ocorreu elevação da densidade urinária e também foi o período com maior proteinúria. Adicionalmente, nas seis primeiras horas foi detectado glicosúria, cetonúria, piócitos e sangue oculto urinário. O *clearance* da creatinina reduziu progressivamente entre 24h a 48h após o envenenamento, retornando a valores normais após este período. As alterações instaladas foram reversíveis após a excreção renal das toxinas do veneno (Mello *et al.* 2010).

A IRA pode evoluir com o óbito do paciente se a resolução não ocorrer dentro de um curto período de tempo (Bellomo *et al.*, 2004; Kdigo, 2012; Albuquerque *et al.*, 2013). No caso de envenenamentos por serpentes, o tempo que ocorre a inoculação do veneno até a administração do soro antiofídico é fator determinante para a prevenção da IRA. Nos animais, geralmente, a administração do soro é mais demorada que nos seres humanos, deixando-os mais susceptíveis a um quadro de IRA com óbito (Castro *et al.*, 2004; Sitprija e Sitprija, 2012).

A IRA pré-renal ocorre devido à redução da taxa de filtração glomerular (TFG) e pela redução da perfusão dos rins em que não tenha ocorrido nenhum dano estrutural ou celular aos rins, como hipovolemia e hipotensão que ocorre com frequência nos acidentes ofídicos devido a hemorragias e ou liberação de bradicininas (Santos *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2013). O veneno de algumas serpentes pode aumentar a resistência vascular renal, e isto ativa o sistema aldosterona-renina-angiotensina. A ativação deste sistema interage com o sistema nervoso simpático e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (Chaiyabutr e Sitprija, 1999).

A IRA de origem renal ocorre devido a agressões ao parênquima renal, culminando com redução da taxa de filtração glomerular e elevação dos metabólitos nitrogenados no sangue (Santos *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2013). Alguns exemplos que podem ocorrer nos acidentes ofídicos são: NTA, glomerulonefrite, lesão arteriolar, deposição intrarrenal de sedimentos, presença de trombos nos capilares renais, hemoglobinúria e mioglobinúria (Santos *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2013).

Na IRA pós-renal a causa inicial está distal aos néfrons, sendo que nos acidentes ofídicos pode ocorrer secundariamente após obstrução dos ureteres por coágulos (Sitprija, 1998).

Deste modo, os componentes presentes no veneno das serpentes *Bothrops spp* de forma direta e ou indiretamente podem induzir em suas vítimas alterações das funções renais.

3.10 FÁRMACOS ANTIFIBRINOLÍTICOS

Diversas condições clínicas podem culminar com uma fibrinólise excessivas tais como: trauma, pancreatite, hepatopatia, uremia, cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea, envenenamentos botrópico e crotálico, entre outros (Mischke, 2005; Prins *et al.*, 2010). Ressalta-se que decorre da fibrinólise excessiva, o paciente pode apresentar grave hemorragia e evoluir para o óbito. Condutas terapêuticas que visam reduzir a fibrinólise tem sido um alvo nos pacientes críticos. Com a finalidade de reduzir a fibrinólise, fármacos antifibrinolíticos têm sido utilizados na prática clínica e em estudos experimentais tais como aprotinina, ácido tranexâmico (ATX) e ácido épsilo aminocapróico (AEAC). A utilização desses fármacos pode causar um impacto favorável de ordem clínica e econômica, pois podem reduzir a utilização de sangue e hemoderivados bem como dos custos no atendimento ao paciente (CRASH-2, *et al.*, 2010; McCormack, 2012).

3.10.1 Ácido tranexâmico (ATX)

O ácido tranexâmico (ATX) é um análogo sintético da lisina, e possui grande potência antifibrinolítica. O ATX pode ser administrado pelas vias oral, tópica e intravenosa e por essa última, 3% encontra-se ligado às proteínas plasmáticas. A sua meia-vida é de aproximadamente duas horas e a sua eliminação é, em maior parte, pela excreção renal, podendo prolongar-se por mais de 24h. O ATX sofre pouca metabolização hepática e pode haver interações com alguns fármacos pró-coagulantes. O ATX age por mecanismo competitivo, inibindo a ativação do plasminogênio a plasmina. Ele bloqueia reversivelmente a interação entre o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) com o plasminogênio e os monômeros de fibrina nos sítios de ligação do aminoácido lisina. O ATX atravessa as membranas placentárias, barreira hematoencefálica, líquido, membrana sinovial, humor aquoso e vítreo (McCormack, 2012).

A plasmina é a principal proteína responsável pela dissolução do coágulo de fibrina. O ATX promove maior estabilidade do coágulo, pois sua ação se faz na fase posterior à formação do coágulo ou, mais precisamente, alargando o tempo de dissolução da rede de fibrina. Essa menor fibrinólise favorece a coagulação em cirurgias, trauma, doenças hemorrágicas e nos sangramentos onde a fibrinólise é, comprovadamente, um fator atuante (Cole e Davenport, 2014).

O risco da utilização de antifibrinolíticos é a ocorrência de trombose. No estudo CRASH 2, onde avaliou-se o emprego do fármaco em grandes centros hospitalares em pessoas com suspeita de hemorragia decorrente de trauma, o uso precoce do ATX reduziu em 32% a mortalidade até três horas após o acidente, sem diferença na frequência de fenômenos trombóticos entre os pacientes que receberam ou não o ATX (CRASH 2, 2010). Estes fenômenos trombóticos têm sido mais reportados em decorrência da aprotinina, embora essa possa ter um melhor efeito na profilaxia de hemorragias pós-operatórias de cirurgias cardíacas. Alguns estudos mais recentes têm sido favoráveis ao uso da aprotinina (Mangus *et al.*, 2014).

O uso dos antifibrinolíticos análogos da lisina está mais relacionado com o aparecimento de convulsões, principalmente quando há utilização de altas doses. As convulsões foram descritas em gatos experimentalmente, hipotetizando-se que esses efeitos neurológicos seriam decorrentes da inibição do GABA pelo ATX, resultando numa hiperexcitabilidade (Pellegrini, 1982). Contudo, em estudos mais recentes, foi relatado que as convulsões decorrentes do uso do ATX podem ser decorrentes da inibição dos sítios de ligação do aminoácido glicina no córtex cerebral, pois o ATX possui uma estrutura análoga à glicina, competindo pelos mesmos sítios de ligação (Lecker *et al.*, 2012).

Zafar *et al.* (1998), em estudo retrospectivo realizado em vítimas de acidentes ofídicos por serpentes do Paquistão, reportaram que o uso do ATX pode ser empregado nos casos que cursam com fibrinólise excessiva reduzindo os sangramentos. Neste estudo foram avaliados 40 pacientes e 75% destas vítimas receberam soro antiofídico polivalente para serpentes daquela região. Um total de 58% destes pacientes apresentou algum sinal de hemorragia sistêmica como hematêmese, melena, hemoptise e hematuria. Adicionalmente, 40% apresentavam plaquetopenia e 18% redução do fibrinogênio e elevação de PDFs, TP e TTPa. Ainda neste estudo, dois pacientes tiveram elevação moderada de TP e TTPa sem qualquer evidência de sangramento ou plaquetopenia. Todos os pacientes com sinais de sangramentos receberam o ATX por via intravenosa na dose de 500 mg, três vezes ao dia. Dentre os pacientes do estudo, dois (5%) foram à óbito devido a hemorragias, insuficiência respiratória e outras complicações. O estudo demonstrou êxito na utilização do ATX como coadjuvante no acidente ofídico. Contudo, deve ser ressaltado que existe uma falha metodológica, por não haver um grupo controle bem como randomização, além de não ser um estudo-cego ou mesmo multicêntrico.

Abdul-Kareem (2007) no Oriente Médio avaliou a utilização do ATX no segundo dia após a admissão de pacientes vítimas de acidentes ofídicos e não foi observada redução da mortalidade quando comparado com vítimas que não fizeram uso deste fármaco. Todavia, deve ser enfatizado que nenhum paciente recebeu o soro antiofídico, seja por motivos de ausência do imunobiológico ou outros não relatados na publicação. A mortalidade anual descrita no Oriente Médio é de aproximadamente 24,4%. A administração do ATX na dose de 1,0 mg.kg⁻¹ a cada 8h foi considerada segura e não causou eventos tromboembólicos, apesar do pequeno número de pacientes envolvidos no estudo (n=65).

3.11 OUTROS FÁRMACOS COM ATIVIDADE SOBRE A HEMOSTASIA

3.11.1 Hormônio antidiurético ou vasopressina

O hormônio antidiurético (HAD), também denominado como vasopressina, é sintetizado por neurônios do hipotálamo sendo armazenado na hipófise posterior. Ele exerce grande atividade na regulação da osmolaridade, equilíbrio hídrico e eletrolítico do organismo humano e em outras espécies animais. Além do efeito antidiurético, este hormônio possui ação sobre a hemostasia e também é um potente vasoconstritor, sendo por isto o sinônimo vasopressina (Horstman *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 2010).

Condições clínicas que cursam com hiperosmolaridade, hipotensão, hipovolemia são estímulos fisiológicos capazes de induzir a uma maior liberação endógena deste hormônio (Naves *et al.*, 2003). Para esta regulação da osmolaridade e volemia, a vasopressina contempla atividades diferentes da aldosterona. A vasopressina age diretamente na reabsorção de água aumentando a quantidade de aquaporinas nos túbulos renais na região de ducto coletor ao passo que a aldosterona atua na reabsorção de sódio na porção ascendente da alça de Henle (Naves *et al.*, 2003; Kortenoeven e Fenton, 2014).

O hormônio vasopressina tem sido empregado em quadros de choque quando não se consegue reverter a vasodilatação com outros fármacos vasoativos, como a noradrenalina, podendo ter grande aplicabilidade nos casos de choque séptico. A vasopressina tem sido utilizada também em parada cardiorrespiratória, em substituição à primeira ou segunda administração de adrenalina, contudo, os estudos ainda não são conclusivos sobre a utilização deste fármaco com esta finalidade (Martins *et al.*, 2010). Comercialmente, existe o fármaco vasopressina sintético e também análogos sintéticos como a terlipressina e a desmopressina, que será descrita a seguir.

3.11.2 Desmopressina (DDAVP)

A DDAVP é um análogo sintético do hormônio vasopressina (Horstman *et al.*, 1995). Apresenta mecanismo de ação similar ao da vasopressina com a ligação do peptídeo à receptores específicos das células renais tubulares seguidos por ativação intracelular (Vilhard *et al.*, 1987). Apesar de a DDAVP possuir múltiplas atividades semelhantes ao seu análogo HAD, ela não promove efeitos cardiovasculares e nem induz a contração da musculatura lisa dos vasos sanguíneos (Mannucci *et al.*, 1977). O medicamento possui marcante atividade antidiurética reduzindo a eliminação de água do organismo (Horstman *et al.*, 1995). Além da função na regulação da osmolaridade, pode desempenhar atividades sobre a hemostasia, sendo utilizada em alguns distúrbios da coagulação, como na hemofilia tipo A e na doença de von Willebrand tipo 1 (Svensson *et al.*, 2014). A DDAVP induz a uma maior liberação endotelial do fator VIII, conforme demonstrado por Vilhard *et al.* (1987) em estudo realizado em cães.

Foi demonstrado que pode haver redução do sangramento em pacientes humanos submetidos a diferentes tipos de cirurgias e sem distúrbios da coagulação pré-existentes. Após a administração de DDAVP, os níveis plasmáticos do Fator VIII, e seu carreador, o fator de von Willebrand elevam-se substancialmente devido a liberação pelo endotélio vascular, com uma possível melhora da função plaquetária (Svensson *et al.*, 2014).

Além da liberação destes fatores, há também liberação do ativador de plasminogênio do tipo tecidual - t-PA e redução do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 - PAI-1 (Svensson e Ljungstrom, 1991). Os efeitos antidiuréticos e hemostáticos são considerados dose dependentes, sendo necessárias doses maiores para a indução de liberação endotelial dos fatores VIII e von Willebrand. Em seres humanos, doses de 0,3µg/kg de peso já podem culminar com a liberação endotelial destas substâncias hemostaticamente ativas (Svensson e Ljungstrom, 1991).

Adicionalmente, tem sido reportado que em pacientes humanos com sangramentos devido à uremia, cirrose hepática, disfunções plaquetárias induzidas por fármacos, a DDAVP foi eficiente na redução dos tempos de sangramentos (Horstman *et al.*, 1995; Svensson *et al.*, 2014). Outra situação em que foi reportado êxito na redução de sangramentos com o uso deste fármaco, foi numa série de casos de pacientes humanos portadores de leptospirose (Pea *et al.*, 2003). Segundo Di Mauro e Holowaychuk (2013), em três cães, após a administração IV de DDAVP, reduziu-se o tempo de sangramento em mucosa bucal durante transoperatório de cirurgia de disco intervertebral. Estes animais tinham aumento do tempo de sangramento provocado pelo uso de ácido acetil salicílico.

Portanto, a DDAVP tem potencial terapêutico para ser utilizada em várias situações, além da hemofilia tipo A leve e doença de von Willebrand, que são situações clássicas de sua utilização (Mannucci *et al.*, 1977). Hemorragias agudas de outras causas podem ser beneficiadas, apesar de alguns de seus mecanismos farmacodinâmicos e interações ainda permanecerem pouco esclarecidos (Svensson e Ljungstrom, 1991; Pea *et al.*, 2003; Svensson *et al.*, 2014; Carreiro *et al.*, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. VENENO

Utilizou-se um *pool* de veneno coletado de espécimes adultos de *B. alternatus*, cristalizado e armazenado a -20°C até o tempo da utilização. Este veneno faz parte do estoque de venenos do Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG. A concentração proteica do veneno foi determinada em espectrofotômetro pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Além disto, o veneno foi submetido a eletroforese em gel de acrilamida (SDS/PAGE) como descrito a seguir.

4.2. ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS/PAGE)

O veneno foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE de acordo com a técnica de Laemmli, por uma hora nas seguintes condições: 100 V, 102 mM e 120 W (Laemmli, 1970). Foram adicionados 10 mL de tampão desnaturante em 20 μg de amostra que foi incubada em banho-maria a 100°C por cinco minutos para desnaturação das proteínas. A amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 12 % (Mix acrilamida 30% [acrilamida 29% e 1% N,N-metileno-bis-acrilamida], Tris 1,5 M pH 8,8, Dodecil Sulfato de Sódio 10%, Persulfato de Amônio 10%,¹) com gel de empilhamento a 4 % (Mix acrilamida 30% [acrilamida 29% e 1% N,N-metileno-bis-acrilamida], Tris 1,0 M pH 6,8, Dodecil Sulfato de Sódio 10%, Persulfato de Amônio 10%²), juntamente com padrão de massa molecular³. Após a eletroforese, os géis foram corados pela solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,1%⁴, 25% metanol e 5% ácido acético⁵) por 60 minutos à temperatura ambiente e lavados em solução descorante (5% ácido acético e 10% metanol), até o desaparecimento da coloração de fundo. A mesma técnica também foi realizada utilizando a coloração por prata.

4.3. ANIMAIS

O projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA-UFMG (protocolo experimental 274 / 2015) e realizado de acordo com princípios éticos de proteção e bem-estar animal. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de 80 x 50 x 40 cm, no Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal (LAMACA), e foram alimentados com ração específica para a espécie, tendo alimento e água *ad libitum* até o momento do experimento.

Previamente à realização do experimento, foi realizado um estudo piloto com quatro coelhos inoculando-se 150 μg de veneno de serpente *B. alternatus* via IM na face lateral externa da coxa esquerda. Os coelhos do estudo piloto foram avaliados por 12h para a verificação de sinais clínicos no sítio de inoculação do veneno. Ao final de 12h estes foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico na dose aproximada de $150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ IV. Essa dose de veneno que foi inoculado produziu macroscopicamente grave halo hemorrágico cutâneo e, microscopicamente, presença de mionecrose muscular e hemorragia intensa, incluindo os pulmões, sendo então a dose utilizada nos grupos experimentais.

Foram utilizados 36 coelhos *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, machos, com peso entre 2,1 a 3,4kg de peso vivo, mantidos no Laboratório de Experimentação Animal, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

¹ TEMED - GE Healthcare, Inglaterra

² TEMED - GE Healthcare, Inglaterra

³ *BenchMark® Protein Lader* - Invitrogen, EUA

⁴ *Coomassie Brilliant Blue R-250*/Thermo Scientific-EUA

⁵ Merck-Alemanha

4.4. IMPLANTAÇÃO DE CATETER CENTRAL

No dia anterior à realização do envenenamento experimental e tratamento dos animais, foi realizada a cateterização da veia jugular externa por técnica cirúrgica, com técnica de Seldinger modificada. Como protocolo anestésico para a cateterização da jugular externa, os animais foram pré-medicados com maleato de midazolam na dose de 1mg.kg^{-1} via IM e, após aproximadamente 10 minutos, foi feita a dissociação com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina, na dose de 35 mg.kg^{-1} e $3,5\text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente, via IM no membro pélvico direito ou musculatura epaxial dorsal.

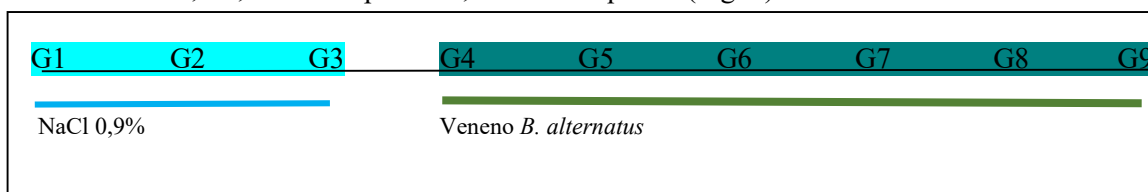
Após a anestesia dissociativa, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo realizando assim a tricotomia ampla da região correspondente à veia jugular externa direita com realização de antisepsia com iodopovidona degermante seguido de álcool etílico 70% e, por conseguinte realização da anestesia infiltrativa com lidocaína a 2% sem vasoconstritor, num volume de aproximadamente 1,0 ml na região, acompanhando o trajeto da jugular externa direita.

Incisou-se pele com uma extensão de dois centímetros, aproximadamente, com pinça anatômica dente de rato e tesoura romba-romba, e foi realizado a dissecação dos tecidos subcutâneos da face lateral da região cervical até localizar a jugular externa. Nesta etapa, foi dada atenção a pequenos vasos localizados no tecido subcutâneo, que geram sangramentos significativos na região da dissecação. Após a localização da jugular externa, foram removidos tecidos adiposos e fâscias que cobriam o vaso. Uma pinça hemostática foi colocada por baixo do vaso para um adequado isolamento. Nesta região lateral cervical, o vaso se bifurca em dois ramos. A cateterização foi realizada sempre abaixo da bifurcação. Foi utilizado cateter central monolúmen 18g comprimento 20cm^6 . A jugular foi puncionada com o mandril do kit e após a punção direta, introduzido o guia e, por conseguinte o dilatador. O cateter foi introduzido pelo guia sendo o guia removido à medida que o cateter avançava. Após isto, foi realizada a aproximação do tecido subcutâneo e pele com mononylon 3.0. O cateter foi reduzido adequadamente com o adaptador em forma de borboleta e este foi suturado à pele e também colado com adesivo sintético.

4.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS

O veneno bruto cristalizado foi reconstituído em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) e posteriormente rediluído em solução de PBS/BSA 0,1% para a administração nos animais. Uma das finalidades dessa diluição em solução, contendo BSA 0,1%, foi reduzir perdas do veneno por aderência nas paredes da seringa. Aproximadamente 12h após a implantação do cateter iniciou-se o protocolo experimental propriamente dito.

Um total de 36 animais foram distribuídos aleatoriamente em nove grupos (G) experimentais ($n=4$). Os animais dos grupos G1, G2 e G3 receberam 0,25ml de uma solução de soro fisiológico (NaCl 0,9%), via IM superficial, na coxa esquerda. Os animais dos grupos G4, G5, G6, G7, G8 e G9 receberam $150\mu\text{g.kg}^{-1}$ de veneno de *B. alternatus* diluídos em uma solução de PBS/BSA a 0,1%, via IM superficial, na coxa esquerda (Fig. 3).



⁶ Cateter central

Figura 5. Demonstrativo dos desafios dos grupos experimentais: G1, G2 e G3 (NaCl 0,9%) e, G4, G5, G6, G7, G8 e G9 (Veneno *B. alternatus*)

Uma hora após, os animais foram tratados da seguinte forma: 25mg.kg⁻¹ de ácido tranexâmico (ATX)⁷ (G1, G5 e G8); desmopressina (DDAVP) 4µg/ml⁸ na dose de 0,3µg.kg⁻¹ (G2, G6 e G9), 0,25ml/animal soro antibotrópico (AB)⁹ (G3, G7, G8 e G9) e NaCl a 0,9% (G4) (Fig. 6).

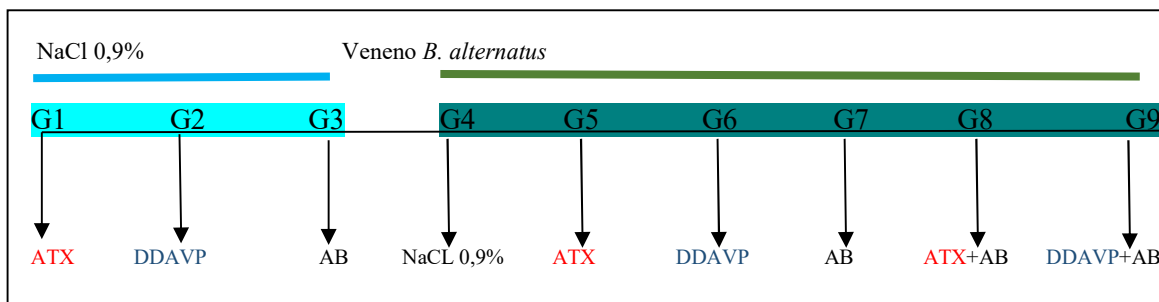


Figura 6. Demonstrativo dos tratamentos dos grupos experimentais: G1, G5 e G8 (ácido tranexâmico); G2, G6 e G9 (desmopressina); G4 (NaCl 0,9%); G3, G7, G8 e G9 (soro antibotrópico)

Grupos experimentais:

- G1- Grupo sem indução do envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com ácido tranexâmico.
- G2- Grupo sem indução do envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com desmopressina.
- G3- Grupo sem indução do envenenamento (NaCl 0,9%) e tratados com soro antibotrópico.
- G4- Grupo veneno *B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%.
- G5- Grupo veneno *B. alternatus* tratado com ácido tranexâmico.
- G6- Grupo veneno *B. alternatus* tratado com desmopressina.
- G7- Grupo veneno *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico.
- G8- Grupo veneno *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + ácido tranexâmico.
- G9- Grupo veneno *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + desmopressina.

4.6. COLETAS DE SANGUE

Foram coletadas amostras de sangue (5ml) diretamente do cateter, no tempo zero (T0), valores basais, e 1h após a instituição dos desafios (NaCl 0,9% ou veneno), antes dos tratamentos (T1). As demais amostras de sangue foram coletadas com intervalo de 4 horas (T4, T8 e T12), após desafios e tratamentos, conforme tab. 1.

Adicionalmente a cada coleta, era realizada a perfusão do cateter com *bolus* de solução cristalóide para reduzir as chances de coagulação dentro do cateter. Em todas as coletas de sangue, sempre era desprezado cerca de 0,5 ml de sangue para evitar a presença de cristalóide dentro do cateter.

O sangue coletado foi colocado em diferentes tubos com anticoagulante (EDTA de potássio a 10% ou citrato de sódio a 3,2%) para obtenção do plasma e sem anticoagulante para obtenção do soro. Previamente à realização dos exames laboratoriais, foram realizadas dosagens nos equipamentos com soro controle, para maior precisão dos exames dos animais.

⁷ Ácido tranexâmico

⁸ Desmopressina 4µ/ml Ferring

⁹ Soro antibotrópico, FUNED, Belo Horizonte, MG

4.7. PROVAS DE COAGULAÇÃO

4.7.1. TTPa, TP, TT, Fibrinogênio e TGT

As provas de coagulação, Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), Tempo de Protrombina (TP), tempo de trombina (TT) para cálculo do fibrinogênio foram realizadas com plasma citratado obtido a partir de amostra na proporção de 1:9 (relação de citrato de sódio e sangue) utilizando reagentes comerciais¹⁰. Estas provas de coagulação foram realizadas em todos os cinco tempos experimentais, ou seja, T0, T1, T4, T8 e T12 em equipamento coagulômetro¹¹. Os testes de TTPa e TP foram realizados aproximadamente 30 minutos após cada coleta de amostra. O fibrinogênio foi realizado posteriormente com plasma citratado armazenado a -20°C aproximadamente. As dosagens do fibrinogênio foram realizadas pela determinação do tempo de trombina (TT) e estes valores em segundos foram convertidos por curva de calibração nos valores do fibrinogênio. O plasma citratado, foi centrifugado por oito minutos a uma velocidade de 6×10^3 rotações por minuto.

O teste de geração de trombina foi realizado com metodologia semi-automatizada, utilizando um fluorímetro¹² e um *software*¹³ por meio do método *Calibrated Automated Thrombogram (CAT)* que permite a quantificação da trombina gerada, em nanomolares, mediante uso de um calibrador de trombina de concentração conhecida (680 nM). Os reagentes utilizados foram fator tissular, fosfolípidos (*Low tissue factor*¹⁴) e substrato fluorescente adicionado de cálcio¹⁵.

Detalhes da metodologia empregada no TGT, utilizada pelo Departamento de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG estão em anexo ao final da tese. Para este teste também foi utilizado um *pool* de plasma citratado congelado a -80°C de cada grupo experimental no tempo T8 e T12, ou seja, 8h e 12h (tempo final). Adicionalmente, foi realizado um *pool* do tempo inicial T0, constituindo um grupo controle, sem qualquer tratamento. Para este *pool*, foram utilizadas alíquotas do T0 (valores basais) dos 36 animais, ou seja, amostras de animais hígidos. No T4 (4h), somente foi realizado o exame de TGT no grupo que recebeu veneno de *B. alternatus* sem tratamento, ou seja, 4h após o envenenamento.

4.8. HEMATOLOGIA

Amostras de sangue coletadas nos tempos zero (T0) e 12h (tempo final) foram acondicionadas em tubos com EDTA de potássio a 10%, homogeneizadas e processadas em analisador hematológico veterinário automático¹⁶. Foram avaliados a contagem total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e, a concentração de hemoglobina, e calculados os índices hematimétricos (volume globular médio – VGM, concentração de hemoglobina globular média – CHGM, índice de anisocitose – RDW e volume plaquetário médio – VPM). O volume globular foi realizado pela técnica de micro-hematócrito em microcentrífuga.

Uma gota de sangue sem anticoagulante foi utilizada para a realização dos esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro para microscopia (26x76mm), corados com panótico rápido para a semiologia de lâmina (contagem diferencial de leucócitos, morfologia) em microscopia óptica.

¹⁰ Bios Diagnostica

¹¹ Clot Time

¹² Fluoroskan Ascent

¹³ Thrombinoscope, BV

¹⁴ *Low tissue factor* – Stago- France

¹⁵ *Fluca* – Stago- France

¹⁶ Poch-100iV Diff® ROCHE

4.9. BIOQUÍMICA SÉRICA

O soro foi utilizado para dosagem bioquímica por método automatizado¹⁷ das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), triglicérides, creatinina, ureia, glicose, proteína total no tempo experimental inicial T0 e T12 com reagentes bioquímicos comerciais¹⁸.

Para as dosagens de eletrólitos sódio¹⁹ e potássio²⁰ foram utilizados *pool* de soro de cada grupo experimental (G1 a G9) com reagentes comerciais no equipamento semiautomático²¹. Para constituir estes *pools*, foram pipetados 50µL de soro de cada animal do grupo que constituíam no tempo final do experimento T12 e, além disto, formou-se um grupo controle do mesmo modo pipetando, 50µL dos animais no tempo inicial (T0).

O perfil proteico sérico fracionado foi realizado pela técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose a 12% e tampão TRIS, utilizando as amostras de soro congeladas. Foram feitas com amostras nos tempos iniciais (T0) e finais (T12). Os géis foram corados com amido negro e descorados em uma série de etanol e ácido acético. A leitura dos géis foi feita por um *scanner* utilizando um *software*²². A concentração proteica (mg/dL) foi determinada multiplicando-se o percentual de cada fração obtida pela concentração da proteína total realizada por técnica bioquímica.

4.10. EUTANÁSIA

Ao final do tempo experimental T12, foi realizada a eutanásia dos coelhos com sobredose de tiopental sódico (dose aproximada de 150 mg.kg⁻¹) IV em bollus rápido no cateter central. Após a eutanásia, os animais foram necropsiados para a avaliação macroscópica e coleta de fragmento dos seguintes órgãos e tecidos: musculatura estriada esquelética onde foi inoculado o veneno, coração, fígado, pulmões e rins.

4.11. HISTOPATOLOGIA

Estes fragmentos de tecidos foram fixados por 24h em formalina tamponada a 10% e após isto, armazenadas em solução de álcool à 70% para posterior processamento de rotina histológico. Os fragmentos após fixação foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados e incluídos em parafina para posterior corte histológico em micrótomo na espessura de cinco micrômetros. Após, os cortes foram estirados em água aquecida a 56°C, distendidos em lâminas de vidro, desparafinizados, hidratados e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina e, finalmente montados com lamínula e bálsamo do Canadá.

4.11.1. Análise imunoistoquímica para caspase-3

O exame de imunoistoquímica do tecido muscular estriado esquelético foi realizado em um animal de cada grupo que recebeu veneno de serpente *B. alternatus* independente do tratamento realizado (G4, G5, G6, G7, G8 e G9). Foram obtidos cortes histológicos de 4 µm do tecido muscular em lâminas de vidro gelatinizadas. Essas lâminas foram desparafinizadas em estufa a

¹⁷ Cobas Mira Plus® ROCHE

¹⁸ Bioclin

¹⁹ Human diagnostic world wide

²⁰ In vitro

²¹ TP Analyzer

²² Celm SE-250

60°C por 12 horas, para a realização da técnica de imunistoquímica com sistema de detecção polimérico-HRP (estreptoavidina-peroxidase).

As reações de recuperação antigênica foram feitas com citrato pH 6,0 em panela de pressão tipo pascal²³ seguido pelo bloqueio da peroxidase endógena com solução de água oxigenada em metanol 1%, e da proteína endógena (Ultra V-block) em temperatura ambiente. As amostras foram então recobertas pelo anticorpo primário anti-caspase-3 (clone Ab-4, diluição 1:300), com o tempo de incubação *over night* em temperatura 8°C. Para a revelação, foi utilizado sistema de detecção polimérico²⁴, de acordo com as instruções do fabricante. A revelação colorimétrica foi realizada com diaminobenzidina (DAB). A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer na imunomarcagem. Foram considerados positivos os casos em que houve marcação citoplasmática e nuclear nas fibras musculares pela caspase-3.

A figura 7. elenca os exames realizados no presente estudo e respectivos tempos experimentais.

Exames	Tempo				
	T0	T1	T4	T8	T12
TTPa	X	X	X	X	X
TP	X	X	X	X	X
TT	X	X	X	X	X
Fibrinogênio	X	X	X	X	X
TGT**	X		X	X	X
Hemograma	X				X
Glicose	X				X
Triglicérides	X				X
ALT	X				X
AST	X				X
GGT	X				X
FA	X				X
Ureia	X				X
Proteinograma	X				X
Sódio***	X				X
Potássio***	X				X
Eutanásia e anatomopatologia					X

Figura 7. Exames realizados e respectivos tempos experimentais. T0 = Tempo antes de qualquer intervenção (valores basais); T1 = Tempo 1h após administração de NaCl ou veneno (desafio), e antes de qualquer tratamento; T4= 4h após desafios e tratamentos; T8= 8h após desafios e tratamentos; T12 após desafios e tratamentos (tempo final). **TGT= Teste de Geração de Trombina. Realizado com *pool* de amostras do G4 (veneno) somente no T4 (4h). Realizado com *pool* de amostras dos grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9 em T8 (8h) e T12 (12h). ***Sódio e potássio - exames realizados com *pool* de amostras. TTPa= Tempo de tromboplastina parcial ativado; TP= Tempo de protrombina; TT= tempo de trombina. FA= Fosfatase alcalina; ALT= alanino aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase.

²³ Dako, USA

²⁴ Novo Link -RE7280-K Novocastra

4.12. ESTATÍSTICA

O delineamento aplicado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (Sampaio, 2007). As parcelas correspondem aos tratamentos e, as subparcelas, aos tempos de avaliação. Os resultados obtidos foram testados quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram plotados em tabelas e analisados pelo programa *Statistical Analysis System* (SAS).

Foi realizada análise de variância – ANOVA e a comparação de médias pelo teste de Tukey, com um nível de significância com $p \leq 0,05$.

Para o Teste de Geração de Trombina (TGT) foi feita a correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

5.1. VENENO

A dosagem proteica do veneno bruto após diluição revelou uma concentração de 53,2 mg.ml⁻¹.

A caracterização do veneno pela eletroforese vertical em gel de poliacrilamida – SDS PAGE corada por prata demonstrou em 10 e 20 µg de amostra, a presença das principais frações, de acordo com as massas moleculares das bandas responsáveis pelos sinais clínicos e sintomas decorrentes de envenenamento botrópico, isto é, bandas com massas em torno de 28 kDa, e bandas entre 32 a 55 kDa aproximadamente, sendo que, nestas faixas de massa molecular estão as lectinas tipo C, serinoproteases e metaloproteases de classes P-I e P-III. As bandas que caracterizam as SVMPs (acima de 40 kDa) tiveram a marcação mais intensa no gel. Adicionalmente, foi observado bandas de aproximadamente 14 kDa, relativa às PLA₂. Estas bandas somente foram marcadas após redução das pontes dissulfetos (Fig.8).

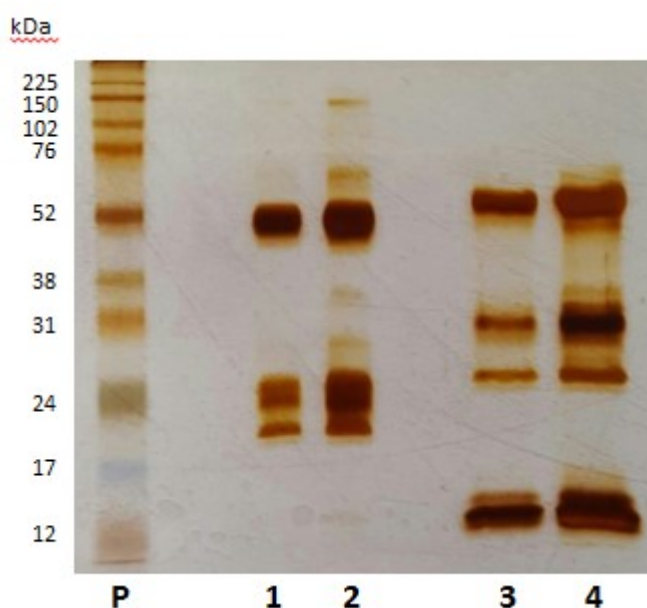


Figura 8. SDS-PAGE do veneno utilizado, com os principais componentes do veneno de *Bothrops alternatus*.

Gel de concentração: 4%

Gel de separação: 12,5%

P - Padrão: ECL™ Rainbow™ Marker – Full range (Amersham™)

1 – *B. alternatus* sem redução (10µg)

2 – *B. alternatus* sem redução (20µg)

3 – *B. alternatus* com redução (10µg)

4 – *B. alternatus* com redução (20µg)

Coloração por prata

5.2. PROVAS DE COAGULAÇÃO

5.2.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), Tempo de Protrombina (TP), Tempo de trombina (TT) e fibrinogênio

Entre os diferentes tempos experimentais (T0, T1, T4, T8 e 12) e entre os grupos experimentais (G1 a G9), não houve diferença estatística significativa para os parâmetros TTPa, TP, TT e fibrinogênio. Estão apresentados os valores obtidos em todos os grupos e tempos experimentais realizados, (Tab.1).

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), tempo de Protrombina (TP), tempo de trombina (TT) e fibrinogênio de coelhos de diferentes grupos (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8 e G9) em diferentes tempos (T0, T1, T4, T8 e T12)

Parâmetro	Tempo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
TTPa	T0	14,95 \pm 1,68	11,97 \pm 1,26	11,77 \pm 2,51	16,46 \pm 2,36	10,75 \pm 3,80	12,64 \pm 2,79	11,85 \pm 1,50	14,08 \pm 1,06	17,88 \pm 0,75
	T1	14,53 \pm 0,48	10,93 \pm 2,06	13,53 \pm 0,45	20,15 \pm 5,57	12,69 \pm 5,69	12,30 \pm 2,63	16,0 \pm 1,00	12,44 \pm 1,69	14,69 \pm 2,04
	T4	14,41 \pm 1,84	10,62 \pm 1,58	11,41 \pm 1,80	21,32 \pm 4,75	17,16 \pm 6,03	18,39 \pm 5,54	13,5 \pm 1,30	15,19 \pm 1,49	16,54 \pm 0,89
	T8	13,64 \pm 2,21	8,78 \pm 1,74	12,64 \pm 1,00	21,47 \pm 5,41	16,01 \pm 2,60	18,25 \pm 6,63	12,9 \pm 1,25	14,63 \pm 0,11	17,91 \pm 1,96
	T12	14,48 \pm 2,72	10,14 \pm 0,78	11,00 \pm 2,67	19,95 \pm 7,48	18,59 \pm 3,49	13,73 \pm 7,24	12,30 \pm 2,67	15,02 \pm 2,02	14,81 \pm 3,51
TP	T0	9,01 \pm 1,09	7,48 \pm 0,23	7,83 \pm 0,83	8,49 \pm 1,19	8,05 \pm 0,58	9,83 \pm 0,20	8,10 \pm 0,80	8,55 \pm 0,90	9,31 \pm 1,04
	T1	8,55 \pm 1,10	7,59 \pm 0,16	7,45 \pm 0,35	10,25 \pm 0,60	8,15 \pm 0,60	9,91 \pm 0,32	7,33 \pm 0,60	8,66 \pm 0,79	9,70 \pm 1,00
	T4	8,54 \pm 1,46	7,59 \pm 0,39	7,80 \pm 0,29	9,76 \pm 1,08	8,44 \pm 0,81	9,81 \pm 0,51	6,33 \pm 0,55	9,09 \pm 0,87	8,24 \pm 1,34
	T8	8,09 \pm 1,19	7,09 \pm 0,11	7,90 \pm 0,30	8,94 \pm 0,64	8,20 \pm 0,60	9,56 \pm 0,71	6,9 \pm 0,40	8,29 \pm 1,31	8,13 \pm 0,93
	T12	7,89 \pm 0,79	6,95 \pm 0,07	7,01 \pm 0,68	8,73 \pm 0,75	8,61 \pm 0,49	10,18 \pm 0,96	8,38 \pm 0,85	7,83 \pm 0,79	7,53 \pm 0,66
TT	T0	7,70 \pm 0,30	7,65 \pm 0,10	7,80 \pm 0,20	8,59 \pm 0,93	8,41 \pm 0,49	8,51 \pm 1,32	8,44 \pm 1,25	7,40 \pm 0,30	7,44 \pm 0,29
	T1	7,43 \pm 0,33	7,51 \pm 0,59	7,45 \pm 0,30	9,34 \pm 1,58	8,88 \pm 0,48	8,54 \pm 0,91	8,50 \pm 0,30	8,50 \pm 0,38	7,39 \pm 0,26
	T4	7,26 \pm 0,24	7,75 \pm 0,43	7,25 \pm 0,20	8,63 \pm 0,75	8,53 \pm 0,54	8,28 \pm 1,19	8,55 \pm 0,56	8,24 \pm 0,67	7,43 \pm 0,28
	T8	7,45 \pm 0,20	7,94 \pm 0,41	7,85 \pm 0,43	9,18 \pm 1,36	7,68 \pm 0,63	8,03 \pm 0,45	7,78 \pm 0,50	8,05 \pm 0,33	8,13 \pm 0,98
	T12	7,70 \pm 0,75	7,40 \pm 0,33	7,90 \pm 0,45	8,39 \pm 0,71	7,88 \pm 0,62	7,94 \pm 0,37	7,80 \pm 0,40	7,65 \pm 0,80	8,14 \pm 0,99
Fibrinogênio	T0	502,75 \pm 35,75	506,75 \pm 12,75	500,75 \pm 30,70	421,50 \pm 70,75	427,00 \pm 46,50	443,25 \pm 127,75	440,40 \pm 80,70	542,33 \pm 43,11	536,75 \pm 38,25
	T1	539,00 \pm 44,00	535,00 \pm 69,00	540,00 \pm 45,00	387,00 \pm 99,50	385,25 \pm 38,75	425,50 \pm 85,50	400,35 \pm 38,00	418,25 \pm 34,75	543,00 \pm 33,50
	T4	561,25 \pm 34,25	498,50 \pm 51,00	565,30 \pm 34,00	413,25 \pm 68,25	418,00 \pm 44,50	463,75 \pm 96,88	420,00 \pm 45,55	454,50 \pm 80,75	538,25 \pm 37,25
	T8	533,50 \pm 25,75	477,50 \pm 46,00	500,50 \pm 48,00	391,00 \pm 83,50	514,50 \pm 76,50	466,75 \pm 49,75	525,00 \pm 74,00	462,50 \pm 35,00	469,75 \pm 105,75
	T12	516,25 \pm 91,25	542,50 \pm 45,00	545,50 \pm 45,00	434,50 \pm 69,00	489,75 \pm 71,25	475,25 \pm 41,75	500,20 \pm 35,10	522,67 \pm 92,44	469,50 \pm 107,00

T0 = Tempo antes de qualquer intervenção (valores basais); T1 = Tempo 1h após administração de NaCl 0,9% ou veneno *Bothrops alternatus* (desafios), e antes de qualquer tratamento; T4= 4h após desafios e tratamentos; T8= 8h após desafios e tratamentos; T12 após desafios e tratamentos (tempo final).

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e + ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) + desmopressina; G3- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) + soro antibotrópico; G4- grupo *B. alternatus* + NaCl 0,9%; G5- grupo *B. alternatus* + ácido tranexâmico; G6- Grupo *B. alternatus* + desmopressina; G7- grupo *B. alternatus* + soro antibotrópico; G8- grupo *B. alternatus* + soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* + soro antibotrópico + desmopressina.

5.2.2. Teste de geração de trombina (TGT)

Os grupos G3 (soro antibotrópico) e G7 (veneno *B. alternatus* + soro antibotrópico) apresentaram erro na leitura do teste de geração de trombina, portanto, não serão apresentados.

Diferentemente das provas clássicas de triagem da hemostasia relacionadas anteriormente (TTPa, TP, TT e fibrinogênio), os índices obtidos do trombograma pelo teste de geração de trombina (TGT), revelaram no tempo experimental de 8h (T8) que, os menores valores de geração de trombina (*ETP*) foram observados nos grupos G4 (*B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%), G5 (*B. alternatus* tratado com ATX) e G6 (*B. alternatus* tratado com DDAVP) e, o maior valor de TGT ocorreu no grupo controle (plasma de coelhos hípidos), seguido dos grupos G2 (DDAVP) e G1 (ATX), conforme demonstrado na tab. 2.

Em relação ao *Lagtime*, o maior valor obtido foi observado no grupo G6 (*B. alternatus* tratado com DDAVP), um maior tempo para iniciar a geração de trombina e formar o coágulo. Os grupos G4 (*B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%) e G5 (*B. alternatus* tratado com ATX) apresentaram *lagtime* semelhantes, inclusive iguais ao grupo G2 (DDAVP), cujos animais não receberam veneno de serpente *B. alternatus* (Tab. 2).

Os grupos que apresentaram os menores índices para atingir o pico *ttPeak* foram os grupos G2 (DDAVP), G4 (indução de envenenamento *B. alternatus* + NaCl 0,9%), G6 (indução de envenenamento *B. alternatus* + DDAVP) e G8 (indução de envenenamento *B. alternatus* + soro antibotrópico + ácido tranexâmico). Fato relevante é que, o grupo G2 (DDAVP) não recebeu veneno de serpente (Tab. 2).

Quando se avalia o *Lagtime*, que é o período de latência até gerar a trombina, nota-se que no tempo experimental final (T12), todos os grupos apresentaram valores semelhantes, exceto o grupo G6 (*B. alternatus* + DDAVP) que apresentou o maior índice, ou seja, houve um maior tempo para a formação do coágulo, semelhante ao observado no T8 (8h). Este parâmetro pode ser relacionado ao TTPa, que neste estudo não apresentou alargamento de forma tão intensa, mesmo gerando menor quantidade de trombina. Os grupos G5 (indução de envenenamento *B. alternatus* + ATX) e G6 (indução de envenenamento *B. alternatus* + DDAVP) tiveram os piores índices de *Lagtime* indicando prolongamento para coagular e os menores índices de *ETP*, indicando as menores taxas da geração da trombina.

O grupo G6 (*B. alternatus* tratado com DDAVP) foi o que mais demorou a atingir o pico de geração de trombina, seguido do grupo G5 (indução de envenenamento *B. alternatus* + ATX) e G9 (indução de envenenamento *B. alternatus* + soro antibotrópico + DDAVP). Os menores valores para o pico de geração de trombina foram observados nos grupos G4 (indução de envenenamento *B. alternatus* + NaCl 0,9%), G5 (indução de envenenamento *B. alternatus* + ATX), G6 (indução de envenenamento *B. alternatus* + DDAVP) e G8 (indução de envenenamento *B. alternatus* + soro antibotrópico + ácido tranexâmico) e, os maiores valores para o grupo controle e G1 (ATX) (Tab.3).

No tempo final do experimento (T12), todos os grupos que receberam veneno de serpente *B. alternatus* apresentaram geração de trombina demonstrada pelo *ETP* inferior ao grupo controle (animais hípidos). Os piores índices deste parâmetro foram

observados nos grupos G5 (*B. alternatus* + ATX) e G6 (indução de envenenamento *B. alternatus* + DDAVP) e, os melhores índices observados nos grupos controle, G1 (ATX) e G2 (DDAVP) (Tab. 2 e 3).

Houve forte correlação de Pearson positiva entre o índice de geração de trombina, *ETP* e o pico de geração *Peak* com $r = 0,84$ e coeficiente de determinação ajustado $R^2 = 0,68$. Também houve forte correlação de Pearson positiva entre *Lagtime* e *ttPeak* com $r = -0,83$ e coeficiente de determinação ajustado $R^2 = 0,67$.

Adicionalmente, foi observada forte correlação de Pearson negativa entre *Lagtime* e *ETP* com $r = -0,78$ e coeficiente de determinação ajustado $R^2 = 0,59$. Também houve forte correlação de Pearson negativa, entre *Peak* e *ttPeak* $r = -0,73$ e coeficiente de determinação ajustado $R^2 = 0,50$. Houve moderada correlação de Pearson negativa entre *Lagtime* e *Peak* $r = -0,70$ e coeficiente de determinação ajustado $R^2 = 0,45$. E por último, presença de moderada correlação de Pearson negativa entre *ETP* e *ttPeak*, $r = -0,57$ com $p = 0,0158$ e coeficiente de determinação ajustado $R^2 = 0,28$.

No TGT, 4h após o envenenamento, já havia redução da geração de trombina observada na Fig. 9. O grupo controle (animais hígidos) apresentou os maiores níveis de trombina quando comparados aos demais grupos no tempo experimental T8 (8h), Mesmo nos grupos com soro antitotrópico, houve redução dos níveis de trombina, conforme demonstrado na Tab. 2 e 3. Da mesma forma, quando se avalia o T12 (12h), o grupo controle (animais hígidos) apresentou os maiores níveis de trombina quando comparados aos demais grupos no tempo experimental. Mesmo os grupos que receberam soroantiofídico, houve redução dos níveis de trombina. O grupo G6 (indução de envenenamento *B. alternatus* + DDAVP) apresentou os menores níveis de trombina no tempo T12 (Fig. 11).

As figuras 10 e 11 mostram uma comparação entre os grupos, G4 (*B. alternatus* + NaCl 0,9%), G5 (*B. alternatus* + ATX) e G6 (*B. alternatus* + DDAVP) e o grupo controle (animais hígidos). Fica evidente que os fármacos ATX e DDAVP não impediram a redução da geração de trombina, e inclusive a administração de DDAVP sinaliza uma pior resposta (Tab. 2).

Tabela 2. Geração de trombina entre os grupos experimentais G1, G2, G4, G5, G6, G8, G9 no tempo experimental T8 comparado a um grupo controle.

Parâmetros	<i>Low Tissue Factor 1pM</i>							
	Controle	G1	G2	G4	G5	G6	G8	G9
<i>Lagtime</i> (min)	2,13	2,47	2,80	2,80	2,80	3,47	2,13	2,47
<i>ETP</i> (nM•min)	390,79	298,35	327,96	254,49	282,52	287,41	293,41	301,65
<i>Peak</i> (nM)	117,52	77,16	73,48	62,52	54,34	58,72	59,39	70,79
<i>ttPeak</i> (min)	4,47	4,81	6,14	5,14	4,81	6,14	5,47	4,81

Lagtime (min): tempo necessário para começar a gerar trombina. *Endogen thrombin potential* - *ETP*: Potencial endógeno de trombina. *Peak height* (nM): Altura do pico. *Time to peak*: Tempo para atingir o pico. * Grupos 3 e 7 os exames apresentaram erro durante o exame. *Low tissue factor 1pM*: baixo fator tecidual 1pM

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) + ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) + desmopressina; G4- grupo indução de envenenamento *B. alternatus* + NaCl 0,9%; G5- grupo *B. alternatus* + ácido tranexâmico; G6- Grupo *B. alternatus* + desmopressina; G8- grupo *B. alternatus* + soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* tratado +antibotrópico + desmopressina.

Tabela 3. Geração de trombina entre os grupos G1, G2, G4, G5, G6, G8 e G9 no tempo experimental T12 comparado a um grupo controle.

<i>Low Tissue Factor 1pM</i>								
Parâmetros	Controle	G1	G2	G4	G5	G6	G8	G9
<i>Lagtime</i> (min)	3,0	2,13	2,67	3,33	3,67	6,0	3,0	3,0
<i>ETP</i> (nM•min)	389,38	360,03	392,26	221,44	189,71	91,9	220,35	321,21
<i>Peak</i> (nM)	95,2	80,96	68,08	52,49	33,02	11,06	28,64	37,34
<i>ttPeak</i> (min)	5,67	5,14	7,0	5,67	6,33	10,33	7,0	7,67

Lagtime (min): tempo necessário para começar a gerar trombina. *Endogen thrombin potential - ETP*: Potencial endógeno de trombina. *Peak height* (nM): Altura do pico. *Time to peak*: Tempo para atingir o pico. * Grupos 3 e 7 apresentaram erro durante o exame. *Low tissue factor 1pM*: baixo fator tecidual 1pM

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) + ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) + desmopressina; G4- grupo indução de envenenamento *B. alternatus* + NaCl 0,9%; G5- grupo *B. alternatus* + ácido tranexâmico; G6- Grupo *B. alternatus* + desmopressina; G8- grupo *B. alternatus* + soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* tratado +antibotrópico + desmopressina.

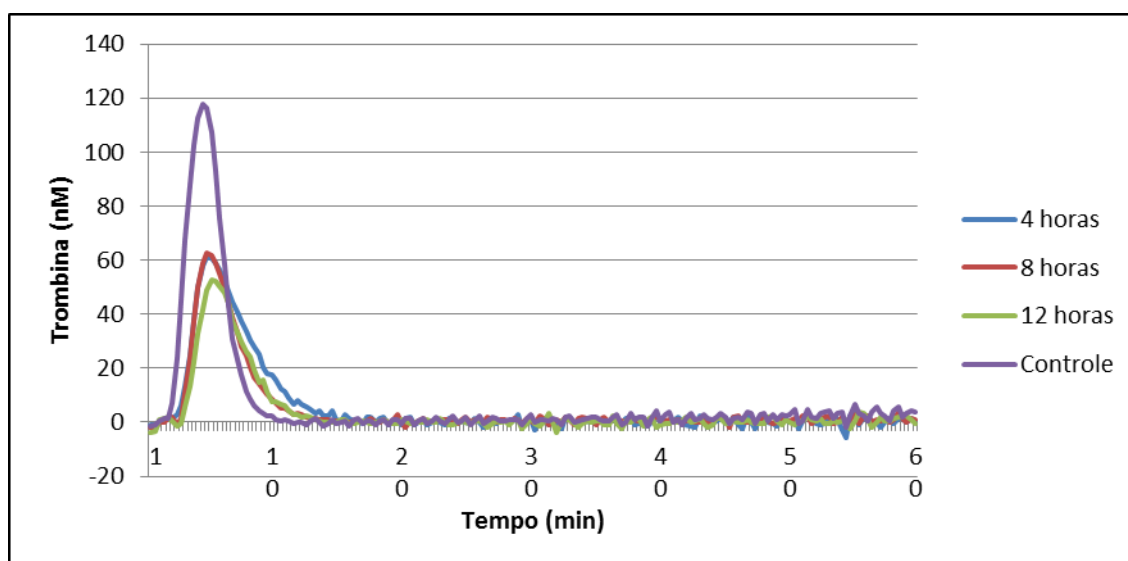


Figura 9. Geração de trombina do grupo G4 (veneno de *B. alternatus*) nos tempos 4h, 8h e 12h, e grupo controle (animais hígidos)

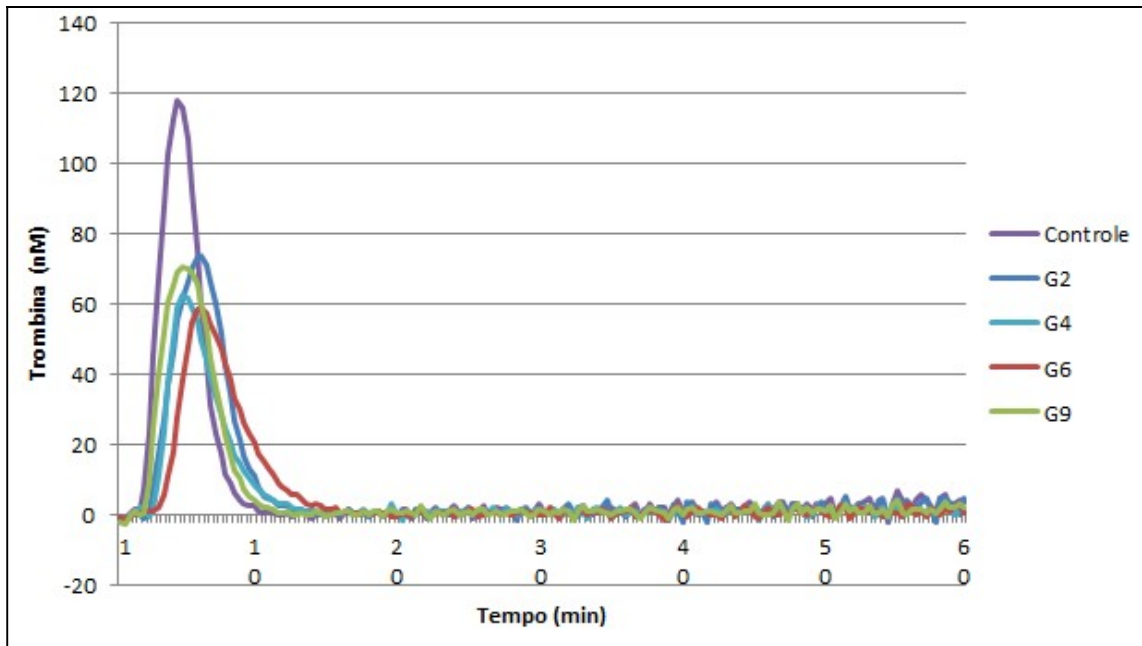


Figura 10. Geração de trombina de coelhos hípidos (controle) e de coelhos que receberam desmopressina distribuídos nos grupos G2 (sem indução de envenenamento + desmopressina), G6 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + desmopressina), G9 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + soro antitoxinogênico + desmopressina), comparados ao grupo G4 (com indução de envenenamento, *B. alternatus*), 8h após.

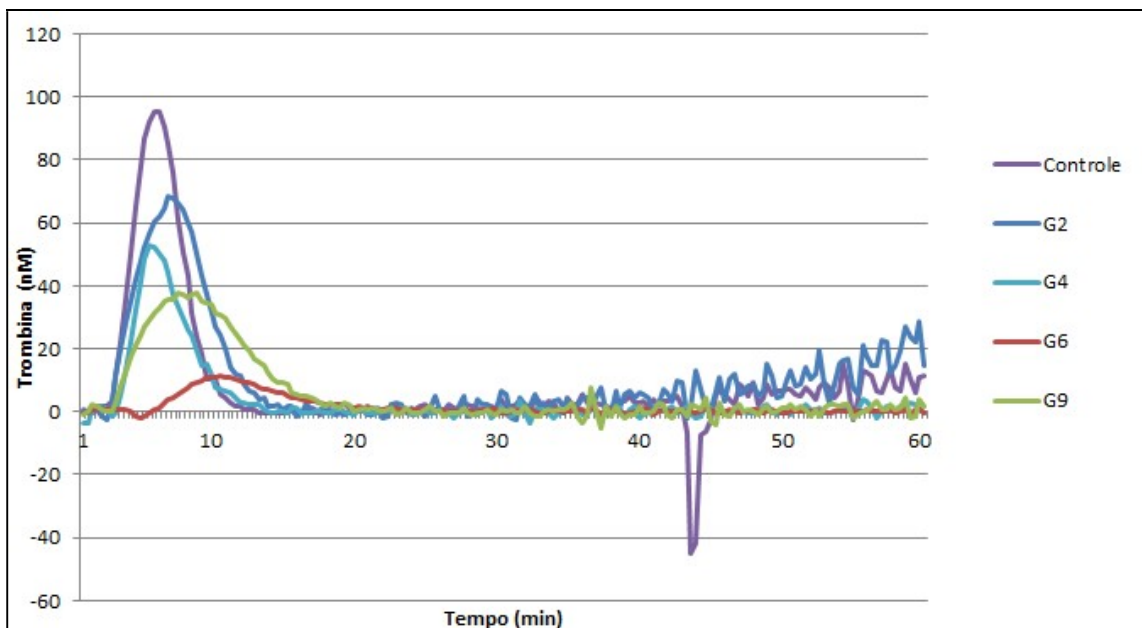


Figura 11. Geração de trombina de coelhos hípidos (controle) e de coelhos que receberam desmopressina distribuídos nos grupos G2 (sem indução de envenenamento + desmopressina), G6 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + desmopressina), G9 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + soro antitoxinogênico + desmopressina), comparados ao grupo G4 (com indução de envenenamento, *B. alternatus*), 12h após.

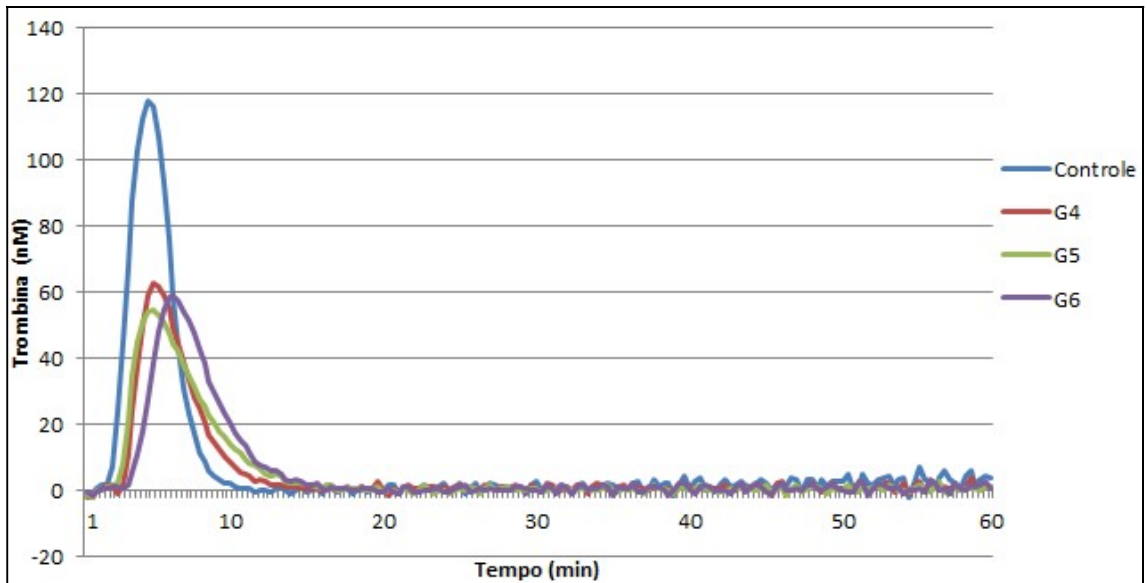


Figura 12. Geração de trombina de coelhos hígidos (controle); G4 (com indução de envenenamento, *B. alternatus*); G5 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + ácido tranexâmico); G6 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + desmopressina) no T12.

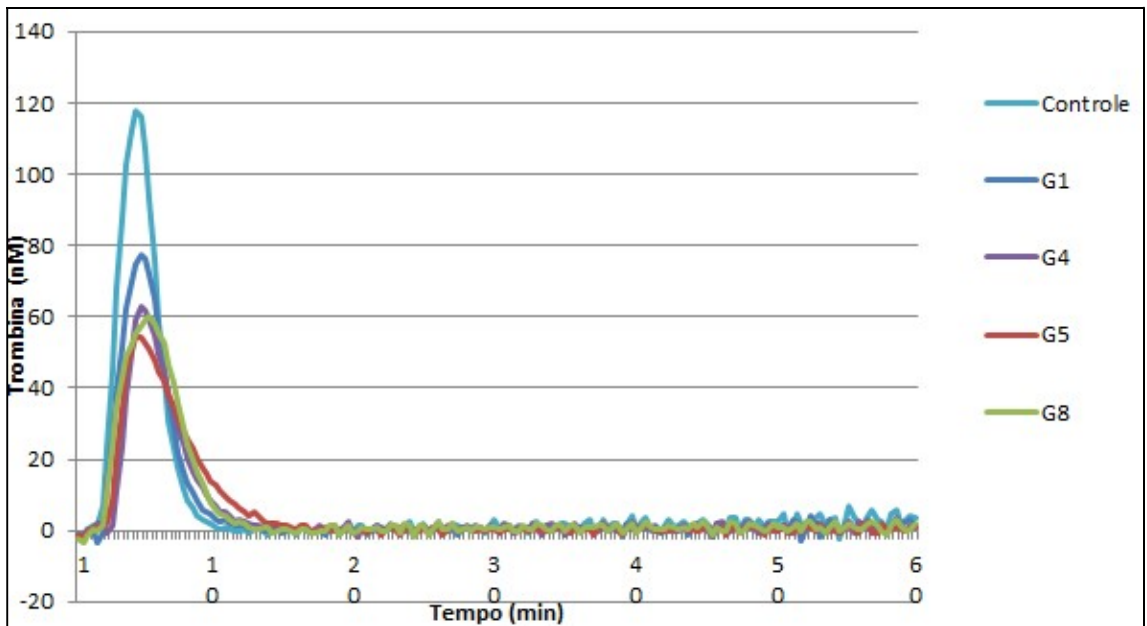


Figura 13. Geração de trombina de coelhos hígidos (controle) e de coelhos que receberam ácido tranexâmico (ATX) distribuídos nos grupos, G1 (sem indução de envenenamento + ATX), G5 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + ATX), G8 (com indução de envenenamento, *B. alternatus* + soro antitoxico + ATX), comparados ao grupo G4 (com indução de envenenamento, *B. alternatus*), 8h após.

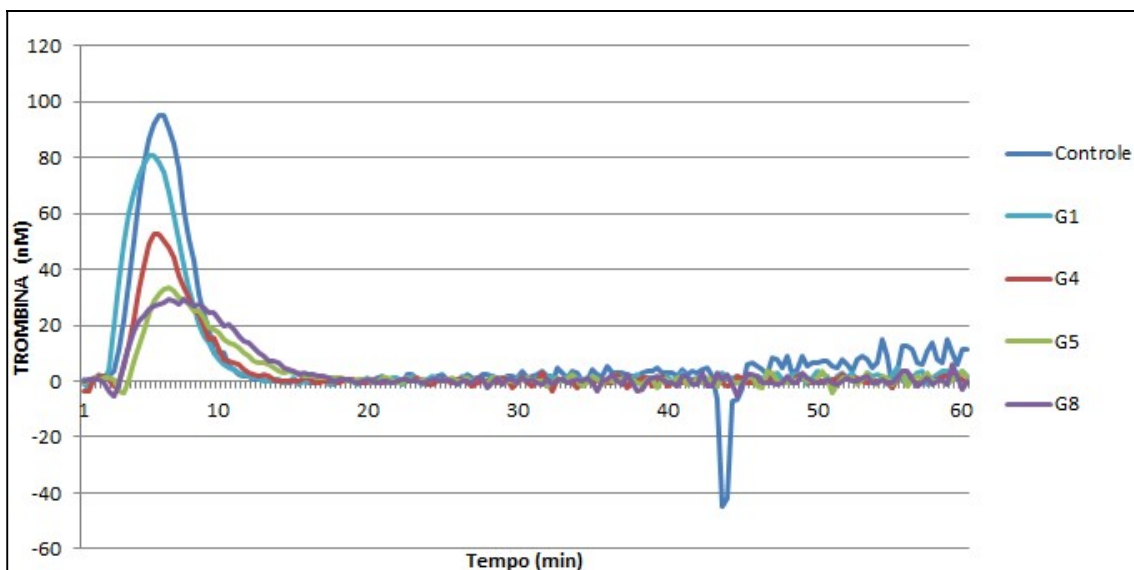


Figura 14. Geração de trombina de coelhos hípidos (controle); G1 (sem indução de envenenamento + ácido tranexâmico - ATX); G4 (veneno *B. alternatus*); G5 (veneno *B. alternatus* + ATX) e G8 (veneno *B. alternatus* + ATX + soro antibotrópico), 12h após (tempo final).

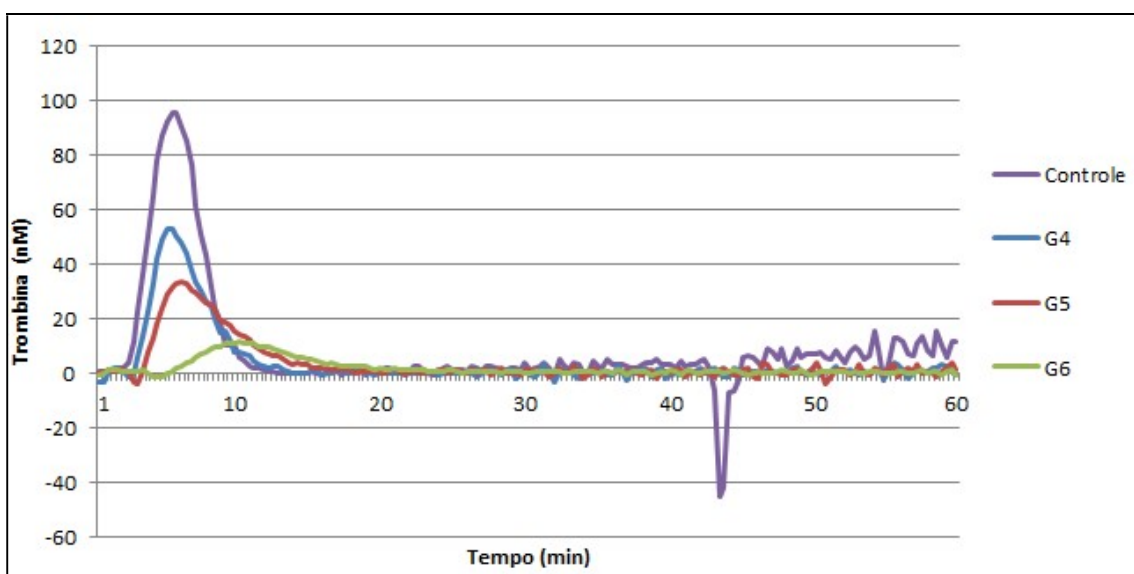


Figura 15. Grupo controle (geração de trombina de coelhos hípidos); G4 (veneno *B. alternatus*); G5 (veneno *B. alternatus* + ATX) e, G6 (veneno de *B. alternatus* + desmopressina (G6), 12h após (tempo final).

5.3. HEMOGRAMA

5.3.1. ERITROGRAMA

5.3.1.1. Hemácias

Os valores das hemácias ($\times 10^6$ céls/ μ L) não diferiram entre os grupos experimentais. Os animais do grupo G5 (veneno de *B. alternatus* + ATX) apresentaram o menor valor médio ($4,37 \pm 0,52 \times 10^6$ céls/ μ L) no tempo final, valores esses abaixo do limite de normalidade para coelhos (5,2 a 6,8 $\times 10^6/\mu$ L de sangue) conforme descrito por Campbell (2007a).

5.3.1.2. Hemoglobina

Os valores observados para hemoglobina nos grupos, G1 (sem indução de envenenamento + ATX) de $10,95 \pm 1,80$ g/dL; G4 (veneno *B. alternatus*) de $10,68 \pm 1,38$ g/dL; G5 (veneno *B. alternatus* + ATX) de $9,38 \pm 1,33$ g/dL; G6 (veneno *B. alternatus* + desmopressina) de $10,15 \pm 1,74$ g/dL e G8 (veneno *B. alternatus* + ATX + soro antibotrópico) $10,63 \pm 0,90$ g/dL apresentaram abaixo do limite inferior de normalidade para a espécie (11,5 a 15,1 g/dL) em T12, segundo Campbell (2007a).

De forma semelhante ao observado para o número de hemácias, os animais do grupo G5 apresentaram os menores valores de hemoglobina ($9,38 \pm 1,33$ g/dL) (Tab. 4).

5.3.1.3. Volume globular

Em relação ao volume globular, no tempo zero (T0), todos os grupos apresentaram valores médios dentro do limite de normalidade para a espécie (36,6 a 47,4%), segundo Campbell (2007). Após os desafios e tratamentos, somente os grupos G3 (soro antibotrópico) e G7 (veneno + soro antibotrópico) mantiveram os valores dentro do limite de normalidade. E corroborando os resultados anteriores, o grupo G5 apresentou o menor valor médio $29,5 \pm 4,80\%$ em T12 (Tab. 4).

5.3.1.4. Concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e Volume globular médio (VGM)

Não houve alteração dos valores médios de VGM entre os grupos experimentais ou tempos T0 e T12 e, os valores ficaram dentro dos limites de referência para a espécie (64,6 a 76,2 fL). De forma semelhante, os valores de CHGM não alteraram e ficaram dentro dos limites de referência para a espécie (29,5 a 33,9 %), segundo Campbell (2007). Portanto, os animais apresentaram uma anemia normocítica normocrômica (exceto os grupos, G3 e G7).

5.3.1.5. Índice de anisocitose - RDW - SD

O índice de anisocitose determinado pela amplitude de distribuição dos eritrócitos, medida como desvio padrão - RDW SD, também não diferiu entre grupos ou tempos com média amostral e desvio padrão de $36,32 \pm 2,89$ fL; coeficiente de variação 7,95%; IC 95% = 35,67 a 36,98 fL.

5.3.1.6. Contagem plaquetária

A avaliação plaquetária quantitativa foi prejudicada por causa dos agregados plaquetários vistos nos esfregaços. Realizou-se então, uma estimativa por grupos, mas que não diferem entre si.

Nos animais que receberam veneno de *Bothrops alternatus*, grupos G4, G5, G6, G7, G8 e G9, as contagens plaquetárias estavam acima de 250.000 células/ μ L.

Também não foram visualizadas alterações morfológicas significativas à microscopia óptica e nem alterações no volume plaquetário médio (VPM).

Tabela 4. Valores médios \pm desvio padrão do hemograma (hemácias, hemoglobina, volume globular, CHGM e VGM), nos tempos T0 (valores basais) e T12h (tempo final) dos nove grupos experimentais.

Parâmetro	Tempo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Hemácias $\times 10^6$ céls/ μ L	T0	5,45 \pm 0,53	5,73 \pm 0,59	6,10 \pm 0,39	5,50 \pm 0,73	5,14 \pm 0,69	5,84 \pm 0,99	5,92 \pm 0,28	5,60 \pm 0,41	6,00 \pm 0,19
	T12	5,17 \pm 0,84	5,13 \pm 0,63	5,90 \pm 0,35	5,00 \pm 0,64	4,37 \pm 0,52	4,93 \pm 0,94	5,63 \pm 0,23	4,98 \pm 0,62	5,30 \pm 0,58
Hemoglobina g/dL	T0	11,70 \pm 1,33	12,80 \pm 1,55	13,8 \pm 0,72	12,2 \pm 1,51	11,30 \pm 1,77	12,30 \pm 1,87	13,3 \pm 0,92	12,50 \pm 0,22	13,10 \pm 0,29
	T12	10,95 \pm 1,80	11,23 \pm 1,63	13,13 \pm 0,62	10,68 \pm 1,38	9,38 \pm 1,33	10,15 \pm 1,74	12,4 \pm 0,53	10,63 \pm 0,90	11,23 \pm 1,07
Volume globular %	T0	37,8 \pm 4,65	40,0 \pm 5,35	38,8 \pm 1,89	40,0 \pm 4,69	36,5 \pm 6,76	39,3 \pm 5,19	38,5 \pm 3,11	39,8 \pm 0,50	43,0 \pm 2,94
	T12	34,8 \pm 5,32	35,8 \pm 5,32	36,6 \pm 2,06	34,0 \pm 4,55	29,5 \pm 4,80	33,0 \pm 5,48	36,3 \pm 2,22	33,5 \pm 2,89	35,5 \pm 3,32
CHCM %	T0	31,5 \pm 0,7	32,1 \pm 0,7	35,8 \pm 0,9	30,6 \pm 0,5	31,2 \pm 0,9	31,3 \pm 0,9	35,3 \pm 0,7	31,5 \pm 0,5	30,6 \pm 2,6
	T12	31,5 \pm 2,0	31,4 \pm 0,4	35,1 \pm 0,9	31,4 \pm 1,1	31,9 \pm 1,7	30,8 \pm 0,2	34,8 \pm 0,4	31,7 \pm 1,1	31,6 \pm 0,2
VCM fL	T0	69,2 \pm 2,55	69,7 \pm 3,42	63,6 \pm 2,70	72,3 \pm 2,14	70,7 \pm 3,73	67,6 \pm 2,85	65,0 \pm 2,73	70,4 \pm 5,75	71,2 \pm 5,73
	T12	67,3 \pm 4,15	69,6 \pm 2,56	62,75 \pm 2,19	67,9 \pm 3,81	67,3 \pm 3,38	67,3 \pm 2,31	64,4 \pm 2,99	67,6 \pm 3,34	66,6 \pm 3,79

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com desmopressina; G3- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com soro antibotrópico; G4- grupo *B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%; G5- Grupo *B. alternatus* tratado com ácido tranexâmico; G6- Grupo *B. alternatus* tratado com desmopressina; G7- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico; G8- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + desmopressina.

5.4. LEUCOGRAMA

5.4.1. Leucócitos totais

Não houve diferença significativa na contagem total de leucócitos entre os grupos experimentais, exceto entre os grupos G4, G6 e G8 que diferiram entre grupos experimentais (Tab.6).

O maior valor médio do número de leucócitos totais, $13,30 \pm 3,96 \times 10^3/\mu\text{L}$, foi visto no grupo G6 (veneno + desmopressina) no T12 (tempo final). E, o segundo maior valor médio ($11,40 \pm 1,36 \times 10^3/\mu\text{L}$) foi observado no grupo que recebeu apenas veneno (G4), ficando acima do limite superior de normalidade para a espécie (Tab. 5).

Tabela 5. Valores de referência do leucograma de coelhos, segundo Campbell (2007a).

Parâmetros	Referência
Leucócitos totais (/μL)	6,300 – 10,060
Neutrófilos segmentados (/μL)	1,490 – 3,210
Bastonetes (/μL)	0
Linfócitos (/μL)	3,360 – 7,000
Monócitos (/μL)	50 – 450
Monócitos (/μL)	10 – 150
Basófilos (/μL)	60 – 360

5.4.2. Neutrófilos segmentados (número relativo e absoluto)

Em relação aos números relativo e absoluto de neutrófilos, somente houve diferença estatística significativa entre os grupos, G3 (grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) + soro antibotrópico) que apresentou o menor valor médio e, G6 (*B. alternatus* + desmopressina) que apresentou o maior valor médio (Tab. 6).

Os neutrófilos segmentados foram as células brancas de maior número no sangue circulante dos coelhos deste experimento (Tab. 6), independente do tratamento, desde o tempo zero (valores basais), diferindo de Campbell (2007).

5.4.3. Linfócitos (números relativo e absoluto)

Em relação aos números relativo (%) e absoluto de linfócitos não houve diferença significativa entre os grupos e tempos experimentais.

5.4.4. Monócitos, eosinófilos e basófilos

Monocitos e eosinófilos foram células raras nos esfregaços e, não foram vistos basófilos (Tab. 6).

Tabela 6. Valores médios \pm desvio padrão do leucograma nos tempos T0 e T12: Leucócitos totais ($X 10^3/\mu\text{L}$); neutrófilos segmentados relativos (%) e absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$); linfócitos relativos (%); linfócitos absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$ de sangue); eosinófilos relativos (%) e absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$); monócitos relativos (%) e absolutos ($X 10^3/\mu\text{L}$).

Parâmetro	Tempo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Leucócitos	T0	8,88 \pm 0,61	9,48 \pm 2,53	6,18 \pm 0,55	8,85 \pm 1,97a	8,25 \pm 1,68	9,65 \pm 5,64a	6,63 \pm 1,29	7,85 \pm 2,44a	14,3 \pm 3,30
	T12	9,35 \pm 1,16	9,68 \pm 1,19	7,35 \pm 1,71	11,40 \pm 1,36b	8,55 \pm 1,27	13,30 \pm 3,96b	8,90 \pm 2,03	9,88 \pm 2,22b	10,63 \pm 3,59
Neutrófilos %	T0	70,8 \pm 8,43	71,25 \pm 8,18	49,25 \pm 13,58	67,0 \pm 13,73	68,5 \pm 15,26	71,75 \pm 17,63	33,0 \pm 17,6	69,25 \pm 14,75	90,75 \pm 2,63
	T12	53,5 \pm 13,48	57,5 \pm 17,33	50,25 \pm 12,60	74,25 \pm 4,99	66,25 \pm 14,36	76,0 \pm 6,16	79,5 \pm 3,41	64,75 \pm 8,5	63,0 \pm 22,25
Neutrófilos absolutos	T0	6,26 \pm 0,57	6,62 \pm 1,06	3,06 \pm 1,08	5,99 \pm 2,04	5,79 \pm 2,13	7,24 \pm 5,13	2,38 \pm 1,61a	5,64 \pm 2,84	13,0 \pm 3,22
	T12	4,89 \pm 0,63AB	5,51 \pm 1,75AB	3,74 \pm 1,58A	8,4 \pm 4, 1,15AB	5,72 \pm 1,78AB	10,27 \pm 3,83B	7,07 \pm 1,64AB	6,45 \pm 1,96AB	7,27 \pm 3,97AB
Linfócitos %	T0	20,0 \pm 5,78	23,0 \pm 10,42	46,25 \pm 12,58	30,0 \pm 13,73	27,5 \pm 14,47	27,0 \pm 18,22	65,5 \pm 16,74	27,75 \pm 14,38	6,75 \pm 2,5
	T12	40,75 \pm 14,17	36,5 \pm 15,37	41,25 \pm 16,31	24,0 \pm 6,27	30,0 \pm 13,39	23,0 \pm 6,37	16,5 \pm 2,88	31,0 \pm 8,60	33,25 \pm 22,8
Linfócitos absolutos	T0	1,79 \pm 0,59	2,35 \pm 1,78	2,83 \pm 0,74	2,59 \pm 1,03	2,12 \pm 0,73	2,24 \pm 1,79	4,44 \pm 0,98	1,98 \pm 0,97	0,92 \pm 0,23
	T12	3,91 \pm 1,6	3,58 \pm 1,79	2,95 \pm 1,34	2,75 \pm 0,89	2,51 \pm 0,98	2,90 \pm 0,36	1,46 \pm 0,40	3,01 \pm 0,91	2,94 \pm 0,66
Monócitos %	T0	900 \pm 4,3	5,00 \pm 2,1	4,00 \pm 1,2	4,00 \pm 1,0	4,00 \pm 2,1	1,66 \pm 0,57	2,66 \pm 1,5	2,75 \pm 1,25	2,50 \pm 1,0
	T12	5,25 \pm 2,5	5,5 \pm 3,41	3,0 \pm 1,0	3,5 \pm 0,7	3,75 \pm 1,5	2,0 \pm 0,0	4,0 \pm 1,82	4,5 \pm 3	3,77 \pm 3,59
Monócitos absolutos	T0	0,81 \pm 0,41	0,44 \pm 0,13	0,15 \pm 0,09	0,35 \pm 0,03	0,34 \pm 0,22	0,21 \pm 0,11	0,16 \pm 0,09	0,20 \pm 0,09	0,35 \pm 0,16
	T12	0,49 \pm 0,24	0,51 \pm 0,31	0,30 \pm 0,15	0,36 \pm 0,01	0,31 \pm 0,09	0,25 \pm 0,03	0,37 \pm 0,17	0,42 \pm 0,28	0,40 \pm 0,40
Eosinófilos %	T0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	T12	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Eosinófilos absolutos	T0	0,09	0,06	0	0	0	0	0	1	0
	T12	0,09	0,21	0	0	0	0	0	0	0

Letras diferentes, maiúsculas, no parâmetro avaliado na linha (grupo) diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey $p < 0,05$.

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com desmopressina; G3- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com soro antibotrópico; G4- grupo *B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%; G5- grupo *B. alternatus* tratado com ácido tranexâmico; G6- grupo *B. alternatus* tratado com desmopressina; G7- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico; G8- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + desmopressina.

5.5. EXAMES BIOQUÍMICOS

Glicose, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), α glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, potássio, sódio, proteína sérica total e fracionada, (Tab.7. valores de referência).

5.5.1. Glicose

Para o analito glicose (mg.dL^{-1}), dos seis grupos que receberam veneno de *B. alternatus*, cinco grupos (G4, G5, G6, G8 e G9) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) em seus valores no tempo final (T12). Somente o G7 (*B. alternatus* + soro antibotrópico) não apresentou aumento da glicemia, ficando claro o efeito benéfico do soro antibotrópico. E, ainda devendo ser postulado que os fármacos ATX e DDAVP prejudicam a ação do antiveneno, seja na sua distribuição excreção ou ação farmacológica.

Também deve ser ressaltado que os animais do G4 (veneno *B. alternatus*) apresentaram o maior valor médio, $168 \pm 34,1$ (mg.dL^{-1}) (Tab. 8 e Fig. 16).

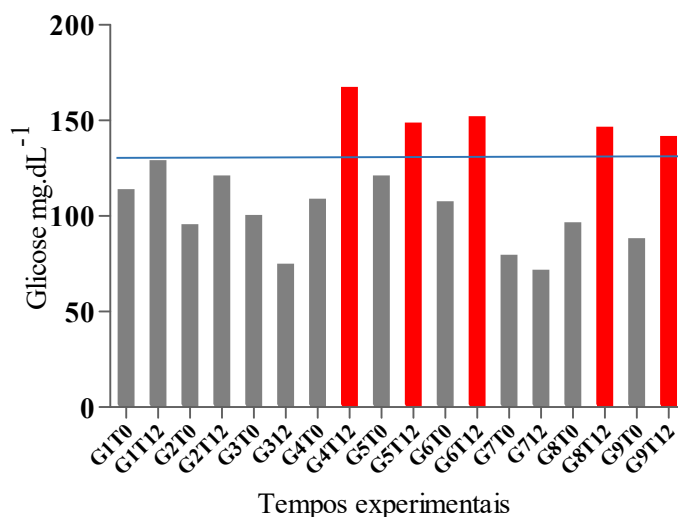


Figura 16. Valores médios de glicose (mg.dL^{-1}) entre os tempos experimentais iniciais (T0) e tempos finais (T12) nos diferentes grupos (G).

G1 = ácido tranexâmico; G2= desmopressina; G3 = soro antibotrópico; G4 = veneno *B. alternatus*; G5 = veneno *B. alternatus* + ácido tranexâmico; G6 = veneno *B. alternatus* + desmopressina; G7 = *B. alternatus* + soro antibotrópico; G8 = veneno *B. alternatus* + soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9 = veneno *B. alternatus* + soro antibotrópico + desmopressina

Tabela 7. Valores bioquímicos de referência para ureia, creatinina, ALT, AST, GGT, FA, glicose, triglicérides, proteína total e albumina de coelhos hípidos conforme Hewitt *et al.* (1989)a, Campbell (2007)b , Spinelli *et al.* (2012)c e Kaneko, (2008)d.

Parâmetro	Referência
Ureia mg.dL ⁻¹	47,3 – 57,7 ^c
Creatinina mg.dL ⁻¹	0,8 – 2,57 ^d
ALT U.L ⁻¹	< 100 ^a
AST U.L ⁻¹	< 100 ^a
GGT U.L ⁻¹	0-14 ^b
FA U.L ⁻¹	121 – 145 ^c
Glicose mg.dL ⁻¹	89 – 144 ^{ac}
Triglicerídeos mg.dL ⁻¹	72 - 90 ^c
Proteína total mg.dL ⁻¹	5 – 8,5 ^a
Albumina mg.dL ⁻¹	3 – 3,34 ^a

5.5.2. Triglicerídeos

Em relação aos triglicerídeos (mg.dL⁻¹), todos os grupos, exceto o G2, apresentaram valores médios basais (T0) acima do limite superior para a espécie (Tab. 7.), de acordo com Spinelli *et al.* (2012). Todavia, grupos com indução do envenenamento e tratados com DDAVP, G6 (veneno + DDAVP) e G9 (grupo *B. alternatus* + DDAVP + soro antitoxinogênico) foram os que apresentaram os maiores valores médios no tempo final, de 271 ± 93mg.dL⁻¹ e 198,0±61,8mg.dL⁻¹, respectivamente (Tab.8).

5.5.3. Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), α glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA)

Em relação as enzimas hepáticas ALT, AST, GGT e FA não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos e tempos experimentais (Tab. 9), devendo ser salientado que todos os valores encontrados se encontram dentro do limite de normalidade proposto por Hewitt *et al.* (1989), Campbell (2007) e Spinelli *et al.* (2012) (Tab. 8).

Tabela 8. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros glicose em (mg.dL^{-1}), triglicerídeos (mg.dL^{-1}), ALT, AST, GGT e FA (U.L^{-1}) de coelhos de todos os grupos experimentais nos tempos T0 e T12.

Parâmetro	Tempo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Glicose	T0	115,0 \pm 30,0	97,0 \pm 7,6	101,0 \pm 38,4	110,0 \pm 37,5a	122,0 \pm 24,9a	109 \pm 27,5a	81,0 \pm 44,6	98,0 \pm 5,4a	89,0 \pm 13,7a
	T12	130,0 \pm 13,0	122,0 \pm 7,6	76,0 \pm 33,2	168,0 \pm 34,1b	150,0 \pm 46,3b	153,0 \pm 6,5b	73,0 \pm 17,2	148,0 \pm 12,6b	143,0 \pm 13,5b
Triglicerídeos	T0	109,0 \pm 28,9	81,0 \pm 14,8	142,0 \pm 76,2	90,0 \pm 47,9a	149,0 \pm 80,8	108,0 \pm 15,0a	141,0 \pm 59,1	95,0 \pm 35,7a	122,0 \pm 51,5a
	T12	128,0 \pm 32,8AB	97,0 \pm 29,8A	143,0 \pm 69,2AB	169,0 \pm 59,5ABb	190 \pm 48,9AB	271,0 \pm 93,0Bb	88,0 \pm 64,3A	148,0 \pm 68,5ABb	198,0 \pm 61,8Bb
ALT	T0	42,76 \pm 11,95	42,79 \pm 10,77	43,65 \pm 4,55	47,54 \pm 13,56	47,50 \pm 15,68	41,85 \pm 14,99	45,53 \pm 3,69	42,01 \pm 23,32	42,91 \pm 4,60
	T12	49,95 \pm 16,16	39,10 \pm 12,43	42,0 \pm 4,0	48,37 \pm 9,15	44,88 \pm 10,77	49,65 \pm 2,54	42,98 \pm 1,37	43,95 \pm 32,15	48,14 \pm 4,56
AST	T0	74,3 \pm 41,0	79,2 \pm 31,6	71,16 \pm 11,30	71,1 \pm 34,5	65,6 \pm 43,3	40,7 \pm 7,6	64,90 \pm 6,80	60,1 \pm 43,6	52,6 \pm 39,3
	T12	67,9 \pm 49,9	63,2 \pm 41	71,11 \pm 4,48	69,1 \pm 35,1	75,2 \pm 46,2	69,5 \pm 48,1	54,68 \pm 3,00	69,7 \pm 76,4	56,8 \pm 24,3
GGT	T0	5,63 \pm 3,48	7,15 \pm 2,26	7,50 \pm 1,12	6,33 \pm 1,94	6,39 \pm 1,20	7,50 \pm 1,01	5,94 \pm 1,33	5,46 \pm 2,02	6,05 \pm 1,10
	T12	6,14 \pm 2,90	5,49 \pm 2,11	7,99 \pm 1,00	4,13 \pm 2,40	3,73 \pm 0,24	5,85 \pm 1,57	7,62 \pm 2,0	4,70 \pm 2,68	5,41 \pm 2,04
FA	T0	111,11 \pm 40,77	84,98 \pm 13,73	85 \pm 13,00	117,52 \pm 29,84	95,77 \pm 34,56	99,52 \pm 29,63	90,02 \pm 8,00	85,86 \pm 25,77	81,81 \pm 0,26
	T12	96,66 \pm 30,48	62,69 \pm 13,06	75 \pm 10,01	75,10 \pm 14,52	63,62 \pm 22,16	65,92 \pm 15,59	87,05 \pm 8,50	62,89 \pm 18,84	58,54 \pm 27,05

Letras diferentes, maiúsculas, no parâmetro avaliado na linha e minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre as médias do grupo pelo Teste de Tukey $p < 0,05$.

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com desmopressina; G3- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com soro antibotrópico; G4- grupo *B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%; G5- grupo *B. alternatus* tratado com ácido tranexâmico; G6- grupo *B. alternatus* tratado com desmopressina; G7- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico; G8- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + desmopressina.

5.5.4. Ureia

Para o analito ureia (mg.dL^{-1}), o grupo G4 (veneno de *B. alternatus* + NaCl 0,9%) apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) entre T0 e T12. Adicionalmente, o grupo G4 diferiu dos grupos G1(ATX) e G2 (DDAVP) que não receberam veneno de serpente (Tab. 9 e Fig. 17).

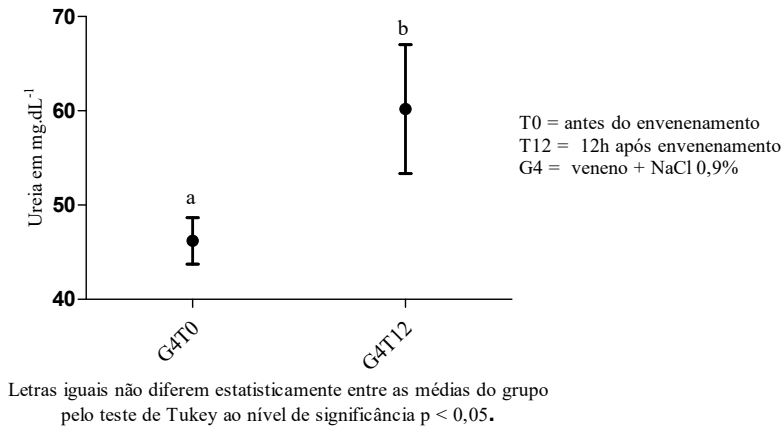


Figura 17. Valores médios \pm desvio padrão da ureia entre T0 e T12 no grupo G4 (veneno de *B. alternatus* + NaCl 0,9%).

5.5.5. Creatinina

Para o analito creatinina, somente no grupo G4 (veneno de *B. alternatus* + NaCl 0,9%) houve aumento significativo ($p < 0,05$) em T12 (Tab. 9 e Fig. 18). Todavia, deve ser ressaltado que, o valor médio apresentado pelo grupo G4 ($1,69 \pm 0,28 \text{ mg.dL}^{-1}$) encontra-se dentro do limite de referência proposto por Spinelli *et al.* (2012).

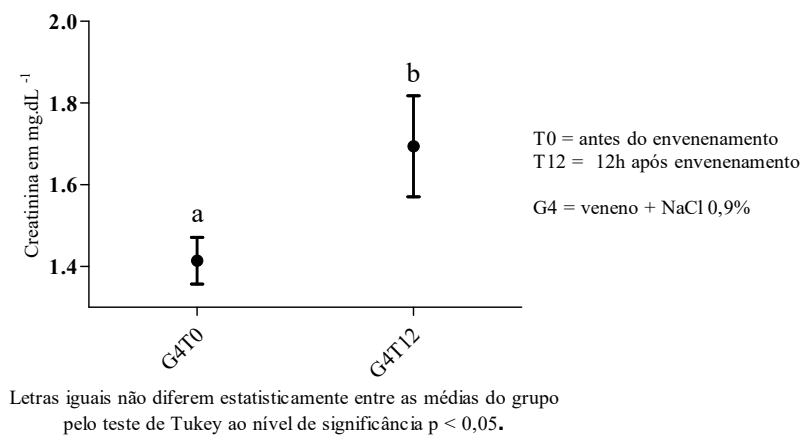


Figura 18. Valores médios e desvio padrão de creatinina nos tempos T0 (valores basais) e T12 (tempo final) no grupo G7 (*B. alternatus* + soro antibotrópico).

Tabela 9. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros ureia e creatinina em (mg.dL^{-1}), de coelhos de todos os grupos experimentais nos tempos T0 e T12.

Parâmetro	Tempo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Ureia	T0	35,9 \pm 5,4	36,5 \pm 4,7	50,4 \pm 14,3	46,2 \pm 5,5a	36,3 \pm 3,8	37,4 \pm 7,3	40,3 \pm 8,7	42,4 \pm 11,3	37,7 \pm 7,2
	T12	38,1 \pm 6,5B	38,4 \pm 5,4B	52,1 \pm 11,1AB	60,2 \pm 15,3Ab	42,9 \pm 13,2AB	44,5 \pm 16,3AB	43,4 \pm 10,3AB	49,5 \pm 8,3AB	41,4 \pm 12,1AB
Creatinina	T0	1,37 \pm 0,14	1,40 \pm 0,07	1,48 \pm 0,17	1,41 \pm 0,13a	1,36 \pm 0,13	1,34 \pm 0,20	1,32 \pm 0,25	1,43 \pm 0,25	1,30 \pm 0,25
	T12	1,47 \pm 0,16	1,46 \pm 0,14	1,39 \pm 0,34	1,69 \pm 0,28b	1,51 \pm 0,19	1,44 \pm 0,21	1,35 \pm 0,16	1,56 \pm 0,17	1,46 \pm 0,25

Letras diferentes, maiúsculas, no parâmetro avaliado na linha (grupo) e minúsculas na coluna diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey $p < 0,05$.

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com desmopressina; G3- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com soro antibotrópico; G4- grupo *B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%; G5- grupo *B. alternatus* tratado com ácido tranexâmico; G6- grupo *B. alternatus* tratado com desmopressina; G7- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico; G8- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + desmopressina.

5.5.6. Eletrólitos

5.5.6.1. Potássio

Em relação ao potássio, pode-se observar que, o maior valor foi visto no grupo G2 (sem indução de envenenamento + DDAVP), E, as maiores concentrações nos grupos G5 (veneno de *B. alternatus* + ATX) e G4 (veneno de *B. alternatus* + NaCl 0,9%), todavia, esses não ultrapassaram o limite superior de $5,8\text{mmol.L}^{-1}$, valor de referência para a espécie (Tab. 10 e Fig. 19).

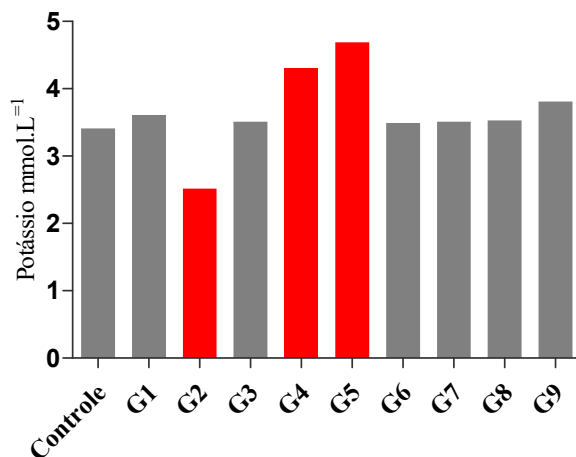


Figura 19. Valores de potássio entre os diferentes grupos experimentais no tempo T12.

Controle = nenhuma intervenção; G1 = ácido tranexâmico; G2= desmopressina; G3 = soro antiofídico; G4 = veneno; G5 = veneno + ácido tranexâmico; G6 = veneno + desmopressina; G7 = veneno + soro antiofídico; G8 = veneno + soro antiofídico + ácido tranexâmico; G9 = veneno + soro antiofídico + desmopressina.

5.5.6.2. Sódio

Em relação ao sódio, observa-se que o grupo G9 (*B. alternatus* + soro antibotrópico + DDAVP) apresentou o menor valor, abaixo do limite de referência para a espécie e menor que o *pool* de animais hígidos (controle). Os grupos, G1 (sem indução de envenenamento + ATX) e G6 (veneno *B. alternatus* + DDAVP) apresentaram os maiores níveis do íon sódio (Tab. 10 e Fig. 20).

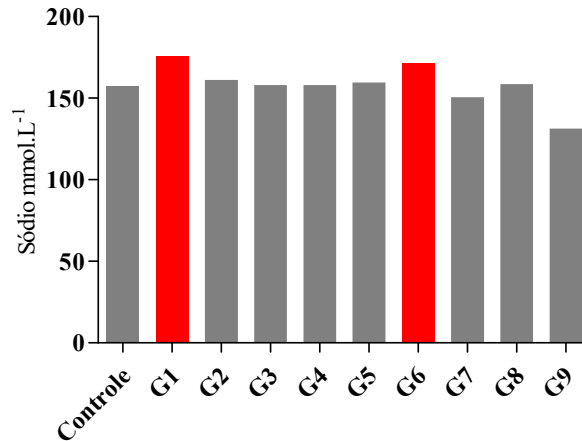


Figura 20. Valores médios do sódio entre os diferentes grupos experimentais no T12 e um grupo controle.

Controle = nenhuma intervenção; G1 = ácido tranexâmico; G2= desmopressina; G3 = soro antiofídico; G4 = veneno; G5 = veneno + ácido tranexâmico; G6 = veneno + desmopressina; G7 = veneno + soro antiofídico; G8 = veneno + soro antiofídico + ácido tranexâmico; G9 = veneno + soro antiofídico + desmopressina.

Tabela 10. Valores médios dos íons sódio e potássio em mmol.L⁻¹ provenientes de um *pool* de amostra de cada grupo e um grupo controle basal.

	Controle	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	Ref.
Potássio	3,41	3,61	2,52	3,51	4,3	4,69	3,49	3,51	3,53	3,81	4,3-5,8
Sódio	157,07	175,35	161,1	158	158,08	159,59	171,21	150,5	158,58	131,28	140-160

5.5.6.3. Proteína sérica total

Em relação a proteína total (PT), somente o G6 (*B. alternatus* + DDAVP) apresentou redução significativa no tempo final diferindo do grupo G1. Todos os grupos, exceto o G1 e G9 apresentou diferença estatística entre os tempos experimentais com menores valores no T12. Todavia, os grupos que receberam veneno, G4 (*B. alternatus* + NaCl 0,9%), G5 (*B. alternatus* + ATX) e G6 (*B. alternatus* + DDAVP) também apresentam abaixo do limite de referência para o coelho (5,0 a 8,5mg.dL⁻¹), conforme descrito por Hewitt *et al.* (1989).

5.5.6.4. Proteinograma fracionado

5.5.6.4.1. Albumina

A albumina diferiu com significância entre grupos, sendo os grupos G5, G6 e G8 diferentes do G1 (Tab. 11). Além do mais, os grupos, G2 (sem indução de envenenamento + DDAVP), G4 (somente veneno), G5 (*B. alternatus* + ATX), G6 (*B. alternatus* + DDAVP), G8 (*B. alternatus* + ATX + soro antibotrópico) e G9 (*B. alternatus* + DDAVP + soro antibotrópico) diferiram entre os tempos experimentais e os seguintes grupos também apresentaram valores abaixo da referência para a espécie (G2: 2,97±0,49; G5: 2,77±0,20; G6: 2,80± 0,22; G8: 2,82±0,31, respectivamente). Valores de referência para o coelho (3,0 a 3,34 mg.dL⁻¹) segundo Hewitt *et al.* (1989).

No proteinograma fracionado, não houve alterações significativas entre os grupos e tempos experimentais para os valores médios da relação albumina/globulina, alfa 1, alfa 2a, alfa 2b, beta 1, beta 2 globulinas e gamaglobulinas (Tab. 11).

Tabela 11. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros proteína sérica total e proteinograma fracionado dos grupos experimentais nos tempos iniciais (T0) e finais (T12).

Parâmetro	Tempo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Proteína total	T0	5,84 \pm 0,55	5,72 \pm 0,47a	5,51 \pm 0,40	5,54 \pm 0,47a	5,28 \pm 0,32a	5,50 \pm 0,25a	5,32 \pm 0,87	6,28 \pm 0,63a	5,93 \pm 0,81a
	T12	5,88 \pm 0,41A	5,13 \pm 0,60ABb	5,51 \pm 0,37AB	4,75 \pm 0,48ABb	4,70 \pm 0,26ABb	4,53 \pm 0,34Bb	5,12 \pm 0,13AB	5,41 \pm 0,79Bb	5,28 \pm 1,02ABb
Albumina	T0	3,49 \pm 0,41	3,56 \pm 0,41a	3,45 \pm 0,28	3,61 \pm 0,52a	3,33 \pm 0,25a	3,64 \pm 0,06a	3,56 \pm 0,25	3,48 \pm 0,29	3,17 \pm 0,27a
	T12	3,47 \pm 0,37B	2,97 \pm 0,49Bb	3,47 \pm 0,50AB	3,09 \pm 0,38Bb	2,77 \pm 0,20Ab	2,80 \pm 0,22Ab	3,25 \pm 0,30B	2,82 \pm 0,31A	3,30 \pm 0,52Bb
Relação Alb/Glob	T0	1,55 \pm 0,45	1,53 \pm 0,41	1,65 \pm 0,40	1,94 \pm 0,48	1,76 \pm 0,36	1,93 \pm 0,38	2,02 \pm 0,50	1,26 \pm 0,11	1,22 \pm 0,47
	T12	1,48 \pm 0,38	1,35 \pm 0,32	1,46 \pm 0,30	1,90 \pm 0,40	1,44 \pm 0,07	1,71 \pm 0,55	1,74 \pm 0,37	1,19 \pm 0,28	1,50 \pm 0,40
Alfa-1	T0	0,34 \pm 0,12	0,32 \pm 0,05	0,33 \pm 0,03	0,28 \pm 0,21	0,27 \pm 0,03	0,23 \pm 0,05	0,30 \pm 0,05	0,30 \pm 0,07	0,49 \pm 0,26
	T12	0,27 \pm 0,08	0,28 \pm 0,04	0,32 \pm 0,06	0,18 \pm 0,08	0,23 \pm 0,03	0,20 \pm 0,11	0,28 \pm 0,10	0,31 \pm 0,13	0,28 \pm 0,05
Alfa-2a	T0	0,28 \pm 0,12	0,34 \pm 0,13	0,34 \pm 0,08	0,28 \pm 0,07	0,31 \pm 0,13	0,25 \pm 0,06	0,36 \pm 0,06	0,29 \pm 0,05	0,45 \pm 0,26
	T12	0,35 \pm 0,06	0,39 \pm 0,13	0,34 \pm 0,05	0,22 \pm 0,06	0,26 \pm 0,05	0,25 \pm 0,14	0,25 \pm 0,012	0,43 \pm 0,07	0,43 \pm 0,26
Alfa-2b	T0	0,39 \pm 0,07	0,32 \pm 0,09	0,36 \pm 0,06	0,37 \pm 0,04	0,26 \pm 0,09	0,48 \pm 0,10	0,30 \pm 0,08	0,51 \pm 0,08	0,57 \pm 0,18
	T12	0,40 \pm 0,04	0,41 \pm 0,18	0,35 \pm 0,04	0,36 \pm 0,21	0,34 \pm 0,11	0,35 \pm 0,13	0,43 \pm 0,20	0,24 \pm 0,22	0,35 \pm 0,22
Beta-1	T0	0,48 \pm 0,08	0,60 \pm 0,14	0,45 \pm 0,08	0,45 \pm 0,07	0,54 \pm 0,22	0,46 \pm 0,04	0,50 \pm 0,13	0,60 \pm 0,09	0,61 \pm 0,15
	T12	0,53 \pm 0,07	0,53 \pm 0,13	0,50 \pm 0,08	0,44 \pm 0,10	0,51 \pm 0,15	0,44 \pm 0,09	0,50 \pm 0,17	0,64 \pm 0,35	0,50 \pm 0,15
Beta-2	T0	0,22 \pm 0,06	0,16 \pm 0,11	0,20 \pm 0,09	0,16 \pm 0,04	0,09 \pm 0,10	0,18 \pm 0,05	0,15 \pm 0,10	0,28 \pm 0,08	0,21 \pm 0,04
	T12	0,22 \pm 0,03	0,20 \pm 0,05	0,19 \pm 0,04	0,15 \pm 0,03	0,14 \pm 0,09	0,17 \pm 0,05	0,19 \pm 0,05	0,19 \pm 0,09	0,21 \pm 0,08
Gama	T0	0,64 \pm 0,23	0,63 \pm 0,09	0,67 \pm 0,25	0,39 \pm 0,09	0,48 \pm 0,19	0,32 \pm 0,04	0,33 \pm 0,08	0,83 \pm 0,48	0,61 \pm 0,16
	T12	0,66 \pm 0,22	0,44 \pm 0,25	0,55 \pm 0,20	0,31 \pm 0,05	0,45 \pm 0,07	0,30 \pm 0,11	0,45 \pm 0,23	0,66 \pm 0,38	0,51 \pm 0,27

Letras diferentes, maiúsculas, no parâmetro avaliado na linha e minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre as médias do grupo pelo Teste de Tukey $p < 0,05$.

G1- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com ácido tranexâmico; G2- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com desmopressina; G3- grupo sem indução de envenenamento (NaCl 0,9%) e tratado com soro antibotrópico; G4- grupo *B. alternatus* tratado com NaCl 0,9%; G5- grupo *B. alternatus* tratado com ácido tranexâmico; G6- grupo *B. alternatus* tratado com desmopressina; G7- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico; G8- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + ácido tranexâmico; G9- grupo *B. alternatus* tratado com soro antibotrópico + desmopressina.

5.6. EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

5.6.1. Exame macroscópico da musculatura estriada esquelética

Os animais que receberam veneno de *B. alternatus* independente do tratamento realizado apresentaram em sua totalidade hemorragia moderada a intensa, macroscopicamente, acometendo planos profundos da musculatura da coxa. Em grande parte dos animais, esta hemorragia atingiu a face medial do membro com petéquias na região inguinal (Figs. 17 e 18).



Figura 21. Coelho: musculatura do membro pélvico esquerdo de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus* + NaCl 0,9%) apresentando área hemorrágica no sítio de inoculação (setas vermelhas) da peçonha.

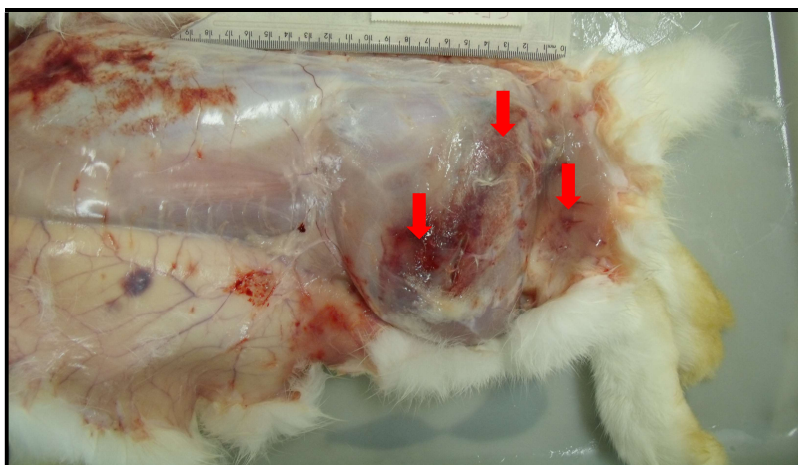


Figura 22. Coelho: musculatura do membro pélvico esquerdo de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus* + NaCl 0,9%) apresentando área hemorrágica no sítio de inoculação (setas vermelhas) da peçonha.

5.6.2. Histopatologia Musculatura Estriada Esquelética

À microscopia óptica, todos os animais que receberam veneno de serpente *B. alternatus*, independente do tratamento, apresentaram no local de injeção da peçonha (musculatura estriada esquelética da região da coxa), extensa área focal de necrose flocular, com extravasamento de hemácias. Expansão do endomísio por áreas de hemorragia e infiltrado de heterofilos, afastamento entre as fibras musculares com aumento de volume entre essas, presença de fibrina e edema, também foram visualizados. Além disso, houve aumento multifocal, de moderado à intenso, da eosinofilia das fibras musculares com perda de estriação e angulosidades, fragmentação citoplasmática e perda de fibras. Estes achados caracterizam uma acentuada miosite heterofilica necrohemorrágica multifocal a coalescente (Figs. 19, 20, 21 e 22). Adicionalmente, pela avaliação imunohistoquímica para caspase-3, houve marcação positiva (Figs. 23).

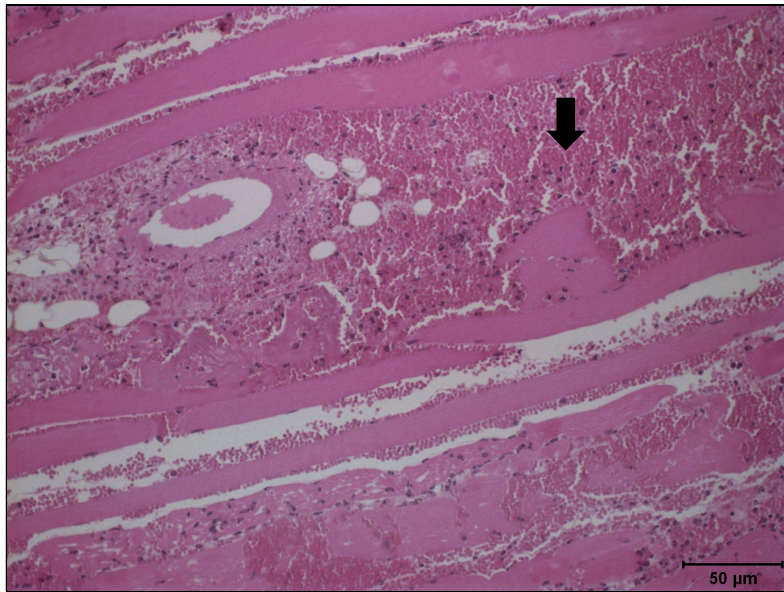


Figura 23. Coelho: secção histológica da musculatura de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando grande área de hemorragia (seta) no sítio de inoculação do veneno de serpente *B. alternatus*. Coloração HE, Bars 50μ.

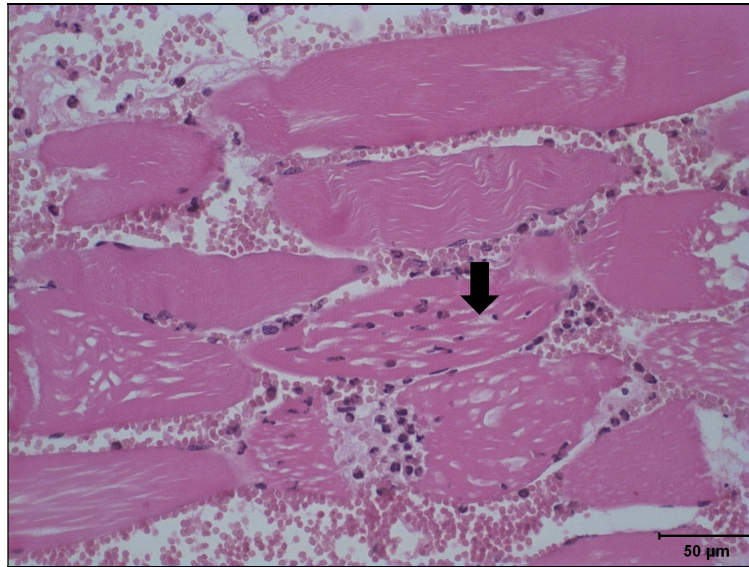


Figura 24. Coelho: secção histológica da musculatura de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando vacuolização da fibra muscular (seta) no sítio de inoculação do veneno de serpente *B. alternatus*. Coloração HE, Bars 50 μ .

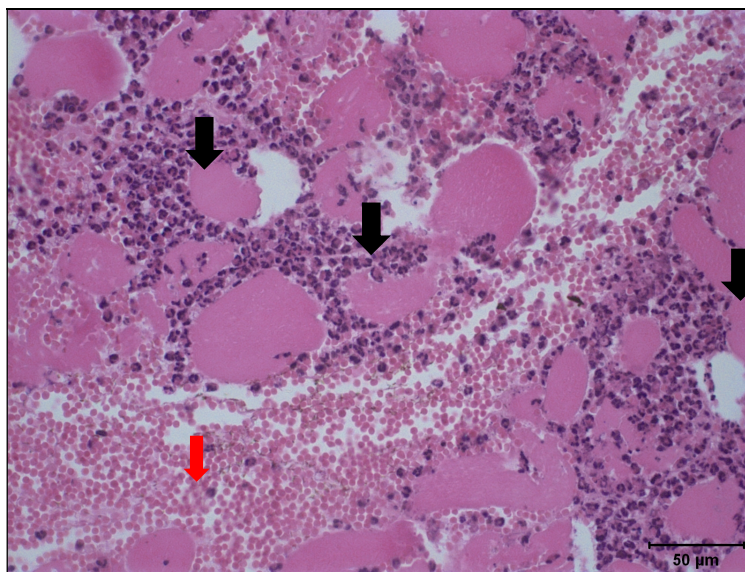


Figura 25. Coelho: secção histológica da musculatura de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando grande área de hemorragia (seta vermelha) e intenso infiltrado inflamatório heterofílico (setas pretas) no sítio de inoculação da peçonha. Coloração HE, Bars 50 μ .

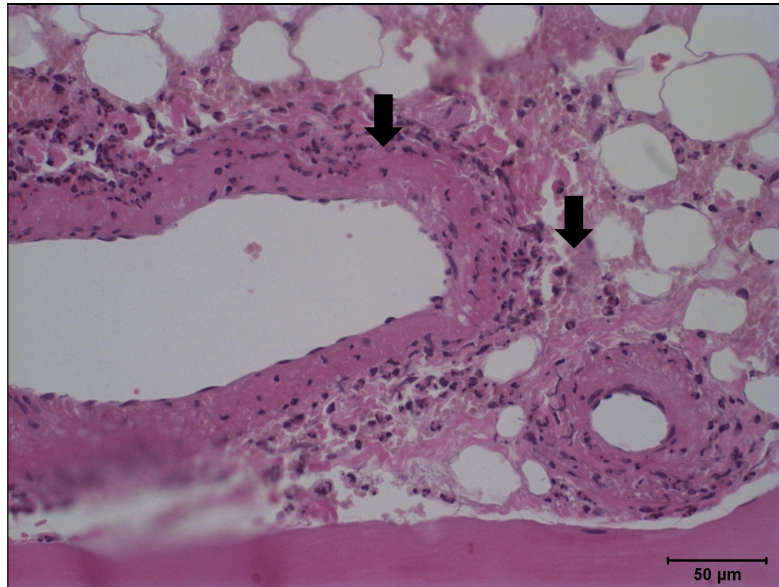


Figura 26. Coelho: secção histológica da musculatura estriada esquelética de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando intenso infiltrado inflamatório na parede vascular (setas pretas), revelando uma vasculite. Coloração HE, Bars 50μ.

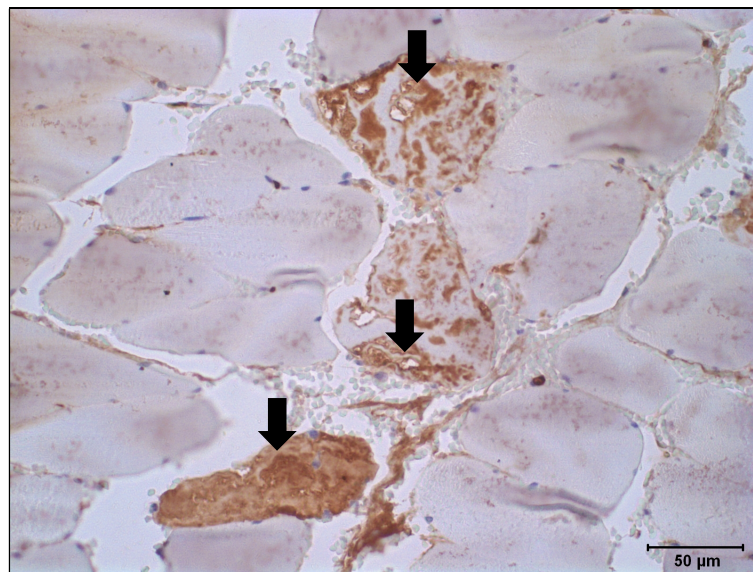


Figura 27. Coelho - secção histológica de musculatura estriada esquelética coradas por imunistoquímica para caspase-3. Marcação citoplasmática positiva em marron, compatível com células em apoptose (setas pretas). Aumento: Bars 50μ.

5.6.3. Exame macroscópico dos pulmões

A alteração macroscópica mais predominante foi a presença de hiperemia do parênquima pulmonar, ocorrendo em todos os grupos experimentais. Adicionalmente, três animais, dois animais do grupo G5 (veneno de *B. alternatus* + ATX), um do grupo G9 (veneno de *B. alternatus* + DDAVP + soro antiofídico) apresentaram hemorragia macroscópica multifocal a coalescente em lobos pulmonares de moderada a intensa (Figura 28).

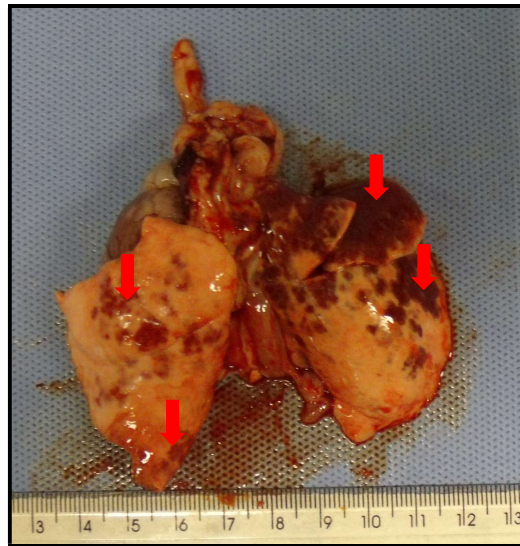


Figura 28. Coelho: áreas multifocais a coalescentes de hemorragia em lobos pulmonares (setas vermelhas) 12h após inoculação de veneno de serpente *B. alternatus* (grupo 4)

5.6.4. Histopatologia dos pulmões

À microscopia óptica, dois animais no grupo G4 (veneno *B. alternatus*) e dois animais no grupo G9 (veneno + DDAVP + soro antibotrópico) apresentaram hemorragia pulmonar discreta a moderada. Adicionalmente, no grupo G8 um animal e no grupo G5 um animal. Percebe-se uma maior ocorrência de hemorragia à análise microscópica do que ao exame necroscópico. Além da hemorragia, estes animais apresentavam infiltrados inflamatórios. Um animal no grupo G5 apresentou megacariócitos no pulmão. Fig. 29 e 30.

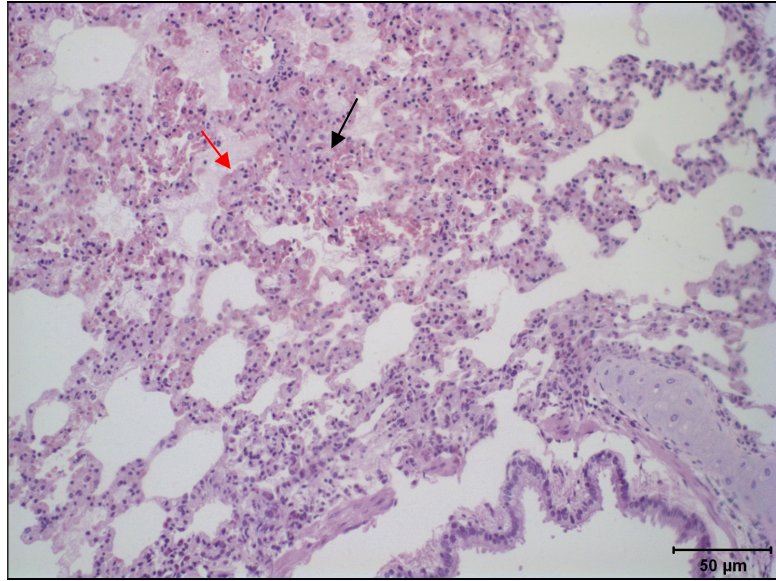


Figura 29. Coelho: Secção histológica dos pulmões de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando hemorragia pulmonar discreta (seta preta), edema (seta vermelha), 12h após inoculação de veneno de serpente *B. alternatus*. Coloração HE, Bars 50 μ .

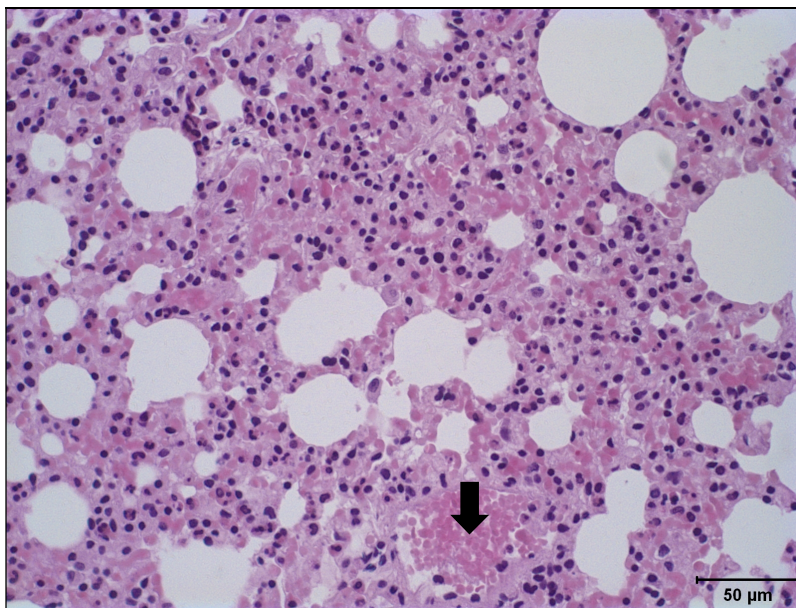


Figura 30. Coelho: Secção histológica dos pulmões de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando hemorragia pulmonar discreta (seta preta), 12h após inoculação de veneno de serpente *B. alternatus*. Coloração HE, Bars 50 μ .

5.6.5. Exame macroscópico hepático

Foi observado somente órgão hiperêmico em todos os animais de todos os grupos experimentais.

5.6.6. Histopatologia hepática

A alteração histopatológica mais frequente foi a microvacuolização citoplasmática, de discreta a moderada, que ocorreu na maior parte dos animais que receberam o veneno de *B. alternatus*, independente do tratamento realizado. Todavia, em outros animais dos grupos que não receberam veneno (G1, G2 e G3), também foi observada microvacuolização citoplasmática, de forma discreta.

Outra alteração foi a presença de discreto infiltrado periportal, tanto em animais que receberam veneno, quanto nos animais que não receberam.

Dois animais, um do grupo G5 (veneno de *B. alternatus* + ATX) e outro do G6 (veneno de *B. alternatus* + DDAVP) apresentaram necrose multifocal de hepatócito. E, por fim, intensa vacuolização citoplasmática com moderada presença de infiltrado linfoplasmocitário periportal, foram visualizados em dois animais grupo G6 (veneno de *B. alternatus* + DDAVP) e, em dois animais do G8 (veneno de *B. alternatus* + ATX + soro antibotrópico).

5.6.7. Exame macroscópico dos rins

A alteração macroscópica renal predominante foi a presença de hiperemia renal ocorrendo em todos os grupos experimentais independente do tratamento.

5.6.8. Histopatologia dos rins

Somente um animal do grupo G8 (veneno + ATX+ soro antibotrópico) apresentou sinais de hemorragia intensa na região medular dos rins. Somente, para salientar, este mesmo animal, também apresentou hemorragia pulmonar.

A alteração morfológica renal mais frequente observada no presente estudo foram cilindros proteináceos dentro da luz tubular em dois animais no grupo G4 (veneno de *B. alternatus*), em todos os animais dos grupos, G5 (veneno de *B. alternatus* + ATX), em dois animais no grupo G8 (veneno + ATX+ soro antibotrópico) e, em dois animais do grupo G9 (veneno + DDAVP+ soro antibotrópico). Estes mesmos animais apresentaram algum grau de NTA de discreta a moderada (figs. 28, 29, 30).

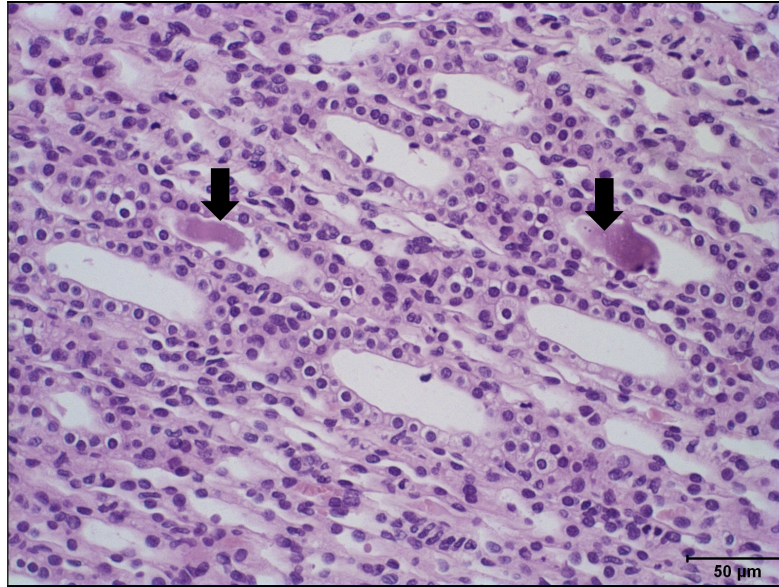


Figura 31. Coelho: Secção histológica dos rins de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando presença de conteúdo proteináceo intratubular (setas pretas), 12h após inoculação de veneno de serpente *B. alternatus*. Coloração HE, Bars 50μ.

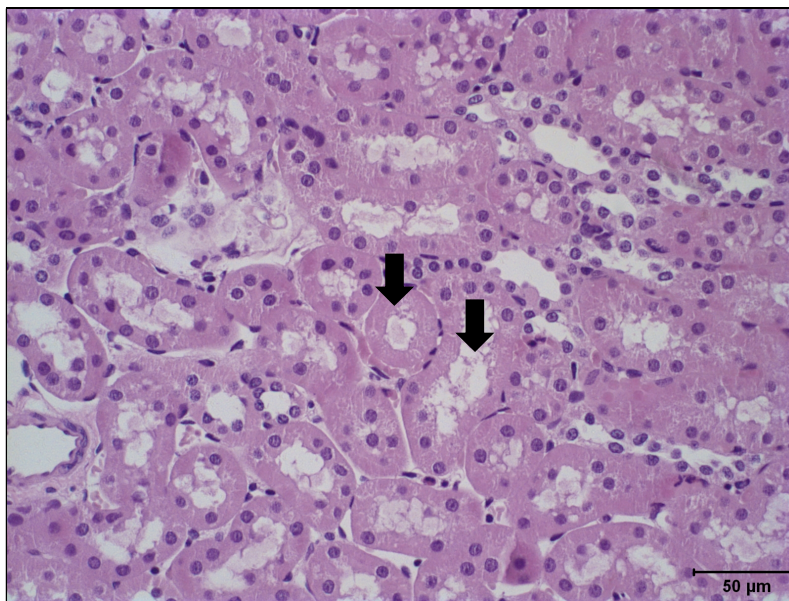


Figura 32. Coelho: Secção histológica dos rins de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando presença de necrose tubular aguda caracterizado pela ausência de núcleos no epitélio simpes, vacuolização citoplasmática (setas pretas), 12h após inoculação de veneno, Coloração HE, Bars 50μ.

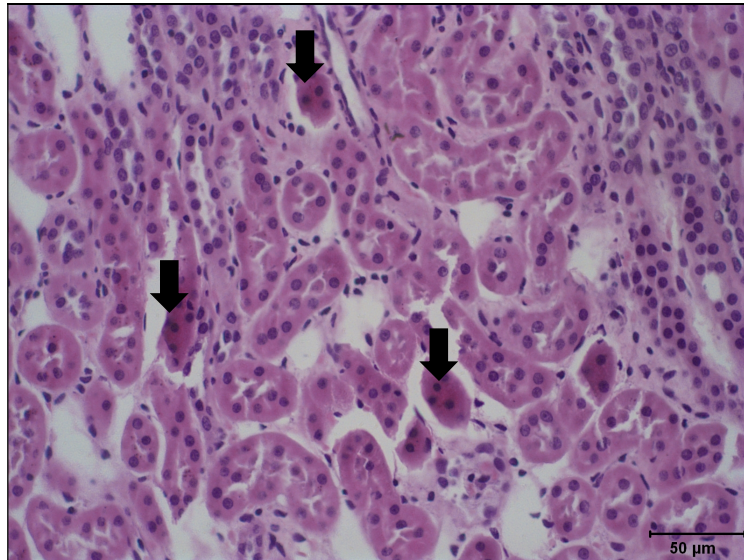


Figura 33. Secção histológica dos rins de um animal do grupo 4 (veneno de *B. alternatus*) demonstrando presença de núcleos picnóticos e aumento de basofilia (setas pretas), 12h após inoculação de veneno de serpente *B. alternatus*. Coloração HE, Bars 50 μ .

5.6.9. Exame macroscópico do coração

Dois animais, sendo um do grupo G5 e outro do grupo G6 apresentou durante o exame necroscópico área focal hemorrágica em epicárdio.

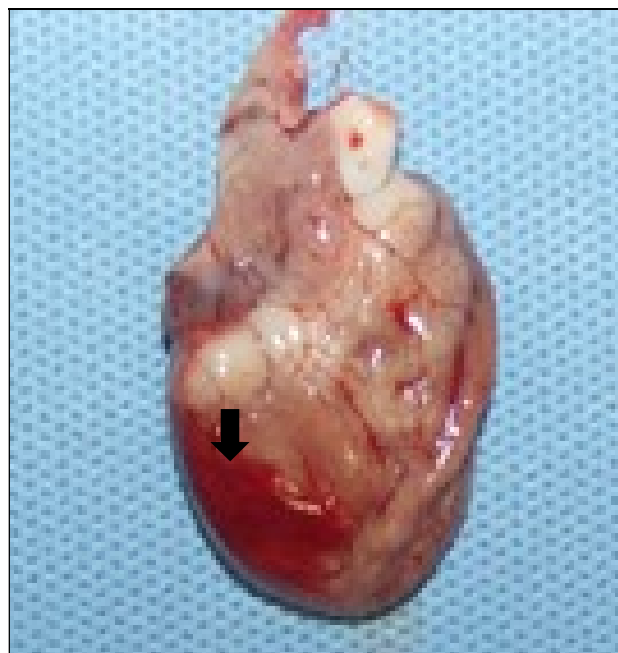


Figura 34. Coelho: área focal de hemorragia em epicárdio (seta preta) 12h após inoculação de veneno de serpente *B. alternatus* (grupo 5 veneno *B. alternatus* + desmopressina)

5.6.10. Histopatologia da musculatura estriada cardíaca

Dois animais, sendo um do grupo G5 e outro do grupo G6 apresentou durante o exame histopatológico área focal hemorrágica.

6. DISCUSSÃO

6.1. PROVAS DE COAGULAÇÃO

A utilização dos fármacos ATX e DDAVP na restauração das coagulopatias decorrentes do envenenamento causado pela peçonha de serpente *B. alternatus* foi avaliada nesta pesquisa por meio dos testes de geração de trombina e, dos clássicos testes da hemostasia.

No presente estudo, os testes TTPa, TP, TT e fibrinogênio utilizados rotineiramente como triagem da hemostasia e coagulação, não diferiram ($p > 0,05$) entre os tempos e grupos avaliados, embora os animais tivessem, macro e microscopicamente, sinais de hemorragia, tanto no sítio de inoculação do veneno como em outros órgãos (coração, pulmões e rins). É sabido, que estas provas de triagem somente são sensíveis na presença de graves incoagulabilidades (Ferreira *et al.*, 2010). É necessário apenas aproximadamente 5% de trombina gerada na amostra que o sangue pode coagular nos testes clássicos (Mann *et al.*, 2003; Wolberg, 2007). Como exemplo, a literatura reporta casos de hemofilia B moderada com valor de TTPa normal (Park *et al.*, 2010). Não existe um teste da hemostasia ideal e perfeito, pois este para ter tal característica, deveria ter incluído em sua marcha analítica, todos os componentes que fazem parte *in vivo* da hemostasia (Ninivaggi e Apitz-Castro, 2012). Estes testes de triagem mostram apenas que o paciente é capaz de iniciar a coagulação, mas não as demais etapas envolvidas (Mann *et al.*, 2003; Wolberg, 2007).

Foi observado que, as provas de triagem não conseguiram demonstrar a magnitude das alterações hemostáticas que os animais apresentaram recebendo dose de $150\mu\text{g.kg}^{-1}$ de veneno de *B. alternatus* (apesar de apresentarem hemorragia em diversos locais). Todavia, no teste de geração de trombina (TGT), 4h após a inoculação do veneno, já foi possível detectar uma redução de seus níveis em todos os grupos que receberam veneno de serpente *B. alternatus*, independente do tratamento realizado. Devido a esta incapacidade, de detecção de alterações que ocorrem no sistema hemostático, a algumas décadas vem se tentando padronizar a geração de trombina (Hemker *et al.*, 1993; Hemker *et al.*, 1995; Hemker *et al.*, 2003).

Caso esta pesquisa utilizasse apenas os testes de triagem (TTPa, TP, TT e fibrinogênio), não seria concluído se os fármacos utilizados no presente estudo, seriam benéficos ou não para a hemostasia, ou até mesmo inferindo que os mesmos seriam benéficos. Porém, quando se avalia o TGT, fica evidente que a utilização de ATX ou DDAVP de forma isolada ou em combinação com o soro antivenenoso é maléfica para a cascata de coagulação nos animais envenenados por peçonha da serpente *B. alternatus*. Diferentemente do que foi observado neste estudo, em modelo de hemorragia não controlada em coelhos, a associação de DDAVP e fator XIII aplicados via intravenosa, foram benéficas à hemostasia, com redução do sangramento (Carreiro *et al.*, 2015).

O diagnóstico e o monitoramento das coagulopatias são problemáticos, particularmente em países pobres, com poucos recursos e na medicina-veterinária, já que os testes de coagulação usados são os mais baratos. Apesar de os testes pré-clínicos demonstrarem a eficácia do antiveneno de se ligar nas toxinas, existem poucas evidências para apoiar a eficácia clínica do antiveneno na coagulopatia de consumo induzida pelo veneno ofídico (Maduwage e Isbister, 2014).

Este estudo é pioneiro em realizar as provas de geração de trombina pela metodologia *CAT* em envenenamento ofídico experimental. A escolha da utilização de doses baixas de fatores teciduais (*low tissue fator* 1pM) no ensaio em amostra com plasma pobre em plaquetas torna o exame mais sensível à detecção de deficiências dos fatores VIII, IX e XI, inibidores diretos da trombina e do fator Xa (Brinkman *et al.*, 2015).

Em relação à geração de trombina, os índices e curvas obtidos do TGT demonstram uma redução, mas ainda havia quantidades suficientes para a coagulação do sangue. Vale ressaltar que, a dose do veneno empregada nesta pesquisa foi, aproximadamente, 200 vezes menor que a dose estimada de um acidente natural com uma serpente adulta da espécie *B. alternatus*, em torno de 100mg de veneno. Deste modo, num envenenamento natural, a peçonha de *B. alternatus*, poderia provocar uma grave redução da geração de trombina.

A reduzida geração de trombina, observada neste protocolo experimental, demonstra a ocorrência de fenômenos de hipocoagulabilidade no envenenamento por serpente *B. alternatus* ao invés de trombose nestas primeiras 12h, ou seja, mesmo o veneno tendo componentes pró-coagulantes, predominam as forças anticoagulantes devido a menor geração da trombina (Tab. 3 e 4). Já foram descritos nos venenos de *B. jararaca* e *B. alternatus* inibidores da protrombina e da trombina (Arocas *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 1998; Assafim *et al.* 2016). Provavelmente, apesar de outras interferências das toxinas do veneno de *B. alternatus* sobre a hemostasia, esta ação sobre a geração de trombina como inibidor pode ser o fator mais determinante, e o TGT é sensível à detecção dos inibidores da trombina (Brinkman *et al.*, 2015).

Faz-se necessário determinar a correlação entre as menores quantidades de trombina gerada e a probabilidade de o paciente evoluir com sangramentos, pois para que o sangramento ocorra não basta somente que o sangue esteja incoagulável, mas que também ocorra perda de continuidade e lesões nas paredes dos vasos sanguíneos. Estas lesões na parede dos vasos sanguíneos, no envenenamento por serpentes *Bothrops* ocorrem principalmente ao redor dos vasos do sítio de inoculação do veneno, corroborando com os achados no presente estudo. Os focos hemorrágicos ocorreram predominantemente neste local, e em menor frequência nos pulmões, coração e rins dos coelhos deste experimento. As SVMPs degradam o colágeno tipo IV presente na membrana basal do subendotélio evoluindo com a ruptura do endotélio vascular (Bjarnason e FOX, 1994). Além da lesão na parede endotelial, as SVMPs podem induzir um alargamento de junções intercelulares, como nos pulmões permitindo o extravasamento de sangue (Gutiérrez *et al.* 2016).

O padrão de trombograma obtido no presente estudo leva a inferir que pode haver uma deficiência de fator VIII pela redução moderada do TGT mesmo com o emprego da DDAVP, que eleva a liberação a partir do endotélio, do fator de coagulação VIII e do seu carreador (Svensson *et al.* 2014). Outra característica do trombograma obtido, é a possibilidade da atuação direta dos inibidores da protrombina e trombina presentes no veneno de *B. alternatus*, como a botroalternina (Assafim *et al.* 2016). Em estudo de geração de trombina em plasmas com diferentes concentrações de cada fator de coagulação, a deficiência dos fatores II, V e X são os que mais interferem na geração de trombina, com índices praticamente nulos. A ausência do fator de coagulação VIII e IX interfere moderadamente na geração de trombina, pois mesmo no plasma deficiente desses fatores, ainda é gerada alguma quantidade de trombina (Zavjalova e Kopylov, 2016).

Foram relatados três estudos que utilizaram o ATX em envenenamento ofídico: o primeiro em 1998, no Paquistão (Zafar *et al.*, 1998) e o segundo no Oriente Médio em 2007 (Abdul-Kareem, 2007). Ambos recomendam a utilização do fármaco ATX nos envenenamentos como tratamento complementar. Todavia, devem ser ressaltados que, obviamente, as serpentes envolvidas são espécies diferentes das encontradas no Brasil, portanto apresentam outra composição de veneno. Abdul-Kareem (2007) reportou que é seguro a utilização do ATX nas coagulopatias do envenenamento ofídico, mas neste estudo não houve redução da mortalidade das vítimas após utilização do fármaco sem uso do antiveneno. E, por fim, um terceiro no qual se avaliou a fibrinólise em envenenamentos por *Trimeresurus albolabris* e *T. macrops*, os autores concluíram que não existem benefícios na utilização de antifibrinolíticos nestes envenenamentos (Rojnuckarin *et al.*, 1999). Além destes estudos supracitados, foi encontrado, fazendo parte do protocolo instituído em um paciente humano vítima de acidente ofídico por *Rhabdophis subminiatus* (família Colubridae), com coagulopatia devido ao envenenamento, a utilização de 1g de ácido tranexâmico a cada 8h (Nelwan *et al.*, 2016). Tal fato põe em evidência que tais medicamentos estão sendo utilizados no ofidismo, mesmo sem estudos, pondo em risco a vida do paciente.

Não foi encontrado relato na literatura com a utilização de DDAVP, no tratamento de coagulopatias decorrente de envenenamento ofídico. No presente estudo, ficou evidente que a utilização de DDAVP levou há uma menor geração de trombina nos animais envenenados e tratados com este fármaco, inclusive, piorando os índices, especialmente quando se comparam com o grupo que recebeu apenas veneno sem tratamentos. Fica claro que a DDAVP apresenta um sinergismo negativo com o soro antibotrópico. Deve-se ressaltar que além do fármaco DDAVP promover maior liberação do fator de coagulação VIII e seu carreador, o fator de von Willebrand, ele também pode aumentar a liberação de plasminogênio e assim, causar maior fibrinólise. Contudo, os animais não apresentaram sangue incoagulável. Uma hipótese levantada na literatura, por alguns pesquisadores, Tibballs (2005) e Jelinek *et al.* (2005), de que a administração precoce de fatores de coagulação na forma de plasma fresco congelado (rico em fatores principalmente o VIII), poderia servir como substrato para as toxinas ainda em circulação, piorando as coagulopatias. Esta hipótese induz à mesma ideia: será que a desmopressina aumentaria o Fator VIII e o de von Willebrand fornecendo mais substrato para o veneno circulante? Todavia, apesar dos questionamentos, sugere-se que a administração do plasma fresco congelado pode acelerar a recuperação de uma coagulopatia de consumo proveniente de envenenamento ofídico na Austrália (Maduwage e Isbister, 2014). Mas este fato não pode ser extrapolado para qualquer tipo de envenenamento ofídico devido às particularidades dos componentes tóxicos dos venenos de cada espécie.

No veneno empregado neste estudo, havia presença de proteína com massa molecular de aproximadamente 27 kDa demonstrado no SDS-PAGE. As proteínas com esta massa molecular, presentes nos venenos de serpentes *Bothrops* são as lecitinas tipo C e, proteínas semelhantes a lecitinas. Estas proteínas estão presentes nos venenos de diversas espécies de serpentes podendo apresentar atividade anticoagulante ou pró-coagulante; pró-agregante plaquetário ou antiagregante plaquetário por diversos mecanismos (Ogawa *et al.*, 2005). São proteínas presentes em torno de 10 a 15% no veneno das serpentes *Bothrops spp.* Cerca de 1% pode ser a botrojaracina e botroalternina, no caso da *B. alternatus* e apresentam aproximadamente 27 kDa (Arocas *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 1998; Monteiro e Zingali, 2000). Estas substâncias foram descritas respectivamente nos venenos de *B. jararaca* e posteriormente no

veneno de *B. alternatus* e são imunologicamente relacionadas. A Botrojaracina, forma uma ligação covalente tanto com a protrombina quanto com a trombina, reduzindo assim a formação da trombina (Arocas *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 1998; Assafim *et al.* 2016). A botroalternina também é um inibidor da trombina, tal qual a botrojaracina, porém possui um efeito parcial sobre a trombina e há estudos investigando esta toxina com intuito farmacológico, em doenças que cursam com hipercoagulabilidade (Assafim *et al.* 2016). Não foi avaliado no presente estudo à agregação plaquetária. A realização do TGT com plasma rico em plaquetas pode ser realizada com esta finalidade. Todavia, a agregação plaquetária no presente estudo pode ter sofrido influência da presença do cateter central nos animais.

6.2. HEMOGRAMA

6.2.1. Eritrograma

Como pode ser observado no eritrograma, os animais que receberam veneno de serpente *B. alternatus* e foram tratados com ATX (G5) apresentaram os menores valores para hemácias, hemoglobina e VG. Como os índices hematimétricos (VGM e CHGM) não se alteraram, estes resultados revelam uma anemia normocítica normocrômica. Diante deste contexto, postula-se que animais com envenenamento botrópico não devam ser tratados com ATX. Estes piores índices hematológicos podem estar atrelados à maior perda de sangue principalmente no local de inoculação do veneno. Também deve ser ressaltado que, em todos os grupos que receberam veneno de *B. alternatus*, exceto o tratado com soro antibotrópico houve redução dos valores do eritrograma, especialmente do VG. Melo *et al.* (2007), também demonstraram alterações no eritrograma de coelhos inoculados com 12,5µg de veneno de *B. alternatus*, sete dias após, relatando a presença de anemia microcítica hipocrômica, eritrócitos policromáticos e rubrócitos.

Santos *et al.* (2003), estudando o envenenamento experimental de *B. alternatus* em cães, relataram que mesmo após o tratamento com soro antibotrópico, os animais apresentaram redução de eritrócitos, hemoglobina e VG, resultando num quadro de anemia normocítica normocrômica. Estes resultados corroboram os resultados do presente estudo. Todavia, deve ser salientado que, neste estudo foram feitas cinco coletas sanguíneas reduzindo o volume circulante, semelhante ao reportado por Santos *et al.* (2007), fato este podendo ter contribuído para a redução destes parâmetros.

Em outro estudo com coelhos envenenados experimentalmente com *B. alternatus*, Melo *et al.* (2007), relataram que, os animais apresentaram contagens plaquetárias com discretas alterações, embora tivessem intensa lesão hemorrágica e necrótica no local de inoculação do veneno, além da presença de petéquias em alguns órgãos, fato também semelhante ao observado neste estudo.

6.2.2. Leucograma

Dois grupos apresentaram uma discreta leucocitose: grupo G4 (veneno *B. alternatus*) e G6 (veneno *B. alternatus* + desmopressina), sendo mais acentuada neste último grupo. Uma das hipóteses para a discreta alteração do leucograma é o curto tempo de avaliação (12h). Outro fato a ser considerado, que será discutido no exame histológico da musculatura estriada esquelética, é a cinética das células inflamatórias para o sítio de inoculação do veneno (Teixeira *et al.*, 2005; Mamede *et al.*, 2016).

Santos *et al.* (2003), 6h após a inoculação de veneno de *B. alternatus* em cães relataram uma leucocitose por neutrofilia, com pico em 24h após. Entretanto, deve ser salientado que, a dose de veneno empregada por Santos e colaboradores foi muito superior à utilizada no presente estudo.

Diante do exposto, fica evidente que, a desmopressina não deve ser usada em animais envenenados com peçonha de *B. alternatus*.

6.3. EXAMES BIOQUÍMICOS

6.3.1. Glicose e triglicerídeos

Em relação aos níveis glicêmicos, fatores tais como estresse e dor poderiam influenciar nas taxas glicêmicas. Este incremento ocorreu, nos grupos que receberam o veneno de serpente associado a outro tratamento (como observado na Fig. 15), exceto no grupo G7, que os animais foram tratados com soro antibotrópico, mostrando a eficácia deste antídoto.

Em envenenamento por *B. alternatus* experimental em bovinos também foi relatada hiperglicemia, porém este achado foi associado ao estresse (Caldas *et al.*, 2008). Tem sido reportada a elevação da glicose nos envenenamentos escorpionicos, sendo menos observados nos acidentes ofídicos. Estudos em modelos animais demonstram que no caso de envenenamento escorpionico pode haver grande liberação de catecolaminas, cortisol e glucagon, além de alterações na secreção de insulina e alterações de hormônios tireoidianos. Coelhos envenenados por escorpião apresentam redução da insulina, aumento da glicogenólise em órgãos como coração, fígado e musculatura estriada esquelética (Murthy e Hase, 1994; Murthy, 2000). Outros estudos investigaram a ocorrência de hiperglicemia nos envenenamentos botrópicos. Em estudo experimental por *B. alternatus* em cães segundo Dias (2009), não foi observada hiperglicemia. Mohamed *et al.* (1972) relatam hiperglicemia, redução da atividade da insulina, redução da utilização da glicose em cães envenenados por *Naja haje*. Tais alterações foram relacionadas não somente à liberação de epinefrina pelas adrenais, mas também a um possível efeito primário do veneno sobre a secreção de insulina bem como alterações no metabolismo hepático. Ressalta-se que, neste estudo não foram observadas alterações nas enzimas hepáticas. Embora, o veneno de *Naja* seja diferente do veneno de *Bothrops*, a hiperglicemia deveria ser mais estudada.

No presente estudo, além de alterações dos níveis de glicose, foram observadas alterações nas concentrações de triglicerídeos. Grupos com indução do envenenamento e tratados com DDAVP, G6 (*B. alternatus* + DDAVP) e G9 (*B. alternatus* + DDAVP + soro antibotrópico) foram os que apresentaram os maiores valores médios no tempo final. Melo *et al.* (2007) estudando o envenenamento experimental de coelhos por peçonha *B. alternatus* também relataram a ocorrência de elevação dos triglicerídeos nos animais. Tem sido reportada a elevação dos triglicerídeos em casos que possam cursar com lesão de musculatura estriada esquelética, devido à lesão da bicamada lipídica celular, sendo que estas injúrias, geralmente, são graves nos envenenamentos botrópicos (Gutiérrez *et al.*, 1980).

A elevação dos triglicerídeos e também a glicose pode sugerir ainda que envenenamentos por serpente *Bothrops* também poderiam cursar com uma alteração do metabolismo e descontrole de regulação de insulina, glucagon, catecolaminas tal qual, ocorre no escorpionismo. É digno de nota a ocorrência de distúrbios

endócrinos, embora incomum à raro, após envenenamento por serpentes na Índia como a *Daboia spp.* Foi reportado, três meses após acidente ofídico, um caso de tirotoxicose e hipopituitarismo, o qual foi relacionado como sequela deste envenenamento (Shetty *et al.*, 2014). Estas complicações endócrinas já haviam sido relatadas por Eapen *et al.* (1976). As alterações do metabolismo (elevação de glicose e TGs) aqui observadas e também já reportadas anteriormente por Melo *et al.* (2007) sinalizam a necessidade de outros estudos que avaliem eixos endócrinos nos envenenamentos ofídicos por serpentes *Bothrops* se tornam necessários.

6.3.2. Alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) e aspartato aminotransferase (AST)

No presente estudo não ocorreu indução de transaminases hepáticas, bem como enzimas de marcação de agressão do trato biliar como GGT e FA, fato que pode estar relacionado ao tempo curto de avaliação (12h após envenenamento), sendo o pico destas enzimas superiores a 12h. A redução dos valores de FA não há significado clínico (Kaneko, 2008). A AST, além de ser marcador de dano citoplasmático hepático, também pode indicar dano muscular. Os seus valores não alteraram no presente estudo apesar de grande lesão muscular no sítio de inoculação do veneno.

6.3.3. Ureia, creatinina e eletrólitos

Os parâmetros ureia e creatinina foram realizados com a finalidade de detectar uma possível lesão renal, fato que pode ocorrer nos envenenamentos botrópicos. Apesar de serem parâmetros tardios, ainda são frequentemente utilizados, mas há diversos marcadores mais precoces frequentemente utilizados (Peres *et al.*, 2013). De forma complementar, foi realizada a dosagem sérica de sódio e potássio. Observa-se que, os animais do grupo G4 (veneno de *B. alternatus*) apresentaram discretos aumentos dos níveis de uréia e creatinina em relação ao tempo zero (T0) e também diferindo dos grupos G1 e G2. Todavia, ressalta-se que, os valores encontram-se dentro do limite de referência para o coelho, e não existem índices, como os empregados para o ser humano e cães, tais como RIFLE, AKIN e estadiamento IRIS para as lesões renais agudas.

No grupo G4 houve um incremento entre os tempos T0 e T12 de 0,28 mg.dL⁻¹ nos níveis de creatinina. Com base nos valores de creatinina observados no presente estudo nenhum animal, se enquadra no conceito de IRA de acordo com os conceitos RIFLE e AKIN utilizados para o ser humano. A associação internacional *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), define IRA como um aumento da creatinina sérica $\geq 0,30$ mg.dL⁻¹ em 48h ou, um aumento $\geq 1,5$ ao valor basal da creatinina conhecida ou presumida até sete dias anteriormente, ou um volume urinário menor que 0,5 ml/kg/h em 6h (Bellomo *et al.*, 2004; KDIGO, 2012).

Apesar de as alterações laboratoriais observadas são iniciais (ureia e creatinina), as alterações morfológicas renais observadas corroboram a presença de dano renal de forma precoce (presença de NTA). Já são conhecidas que as toxinas presentes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* podem promover um quadro de IRA nas primeiras 24h por diversos mecanismos fisiopatológicos (Sitprija, 1998; Ross, 2011; Sitprija e Sitprija, 2012; Santos *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2013).

Segundo Andersson *et al.* (1978), devido a eliminação do ácido tranexâmico ocorrer pela excreção renal, deve ser utilizado com ressalvas em pacientes

nefropatas. Foi estudado em 28 pessoas com doença renal crônica de diferentes origens etiológicas após administração intravenosa do ATX a sua concentração plasmática e urinária. O fármaco pode ser utilizado nas situações com fibrinólise excessiva, contudo é recomendado aumentar os intervalos de administração do medicamento bem como redução das dosagens de acordo com determinados níveis de creatinina sérica. Os autores recomendaram não utilizar o fármaco em hematuria proveniente de doença do parênquima renal devido a possibilidade de precipitação de fibrina intravascular no interior dos rins. Outro risco, nos casos de hemorragia renal massiva é a retenção de coágulos na pelve renal. Para Alameel e West (2011), apesar desta contraindicação relativa do ATX em pacientes com doença renal crônica, os autores demonstraram ser altamente efetivo em uma paciente com doença renal policística autossômica dominante com hematuria grave. Esta paciente já havia utilizado inclusive DDAVP, porém a hematuria somente cessou após o uso do ATX 24h após a administração de três doses de 15 mg.kg⁻¹. Embora de ocorrência rara, a literatura humana reporta a ocorrência de necrose cortical aguda em um paciente com hemofilia A que fez o uso do ATX (Odabas *et al.*, 2001).

Em relação ao íon potássio, os valores do *pool* proveniente dos grupos G4 (veneno de *B. alternatus*) e o grupo G5 (veneno de *B. alternatus* + ATX) apresentaram os maiores valores em relação ao grupo controle (sem qualquer tratamento), embora estivessem dentro dos intervalos para o coelho. Tal fato pode ser indício da redução da excreção do potássio ou, pela miotoxicidade do veneno, já que ocorreram lesões musculares graves (Mushiyakh *et al.*, 2011). O veneno das espécies de *Bothrops* pode atuar em canais iônicos promovendo alterações cardiológicas e renais (Evangalista *et al.*, 2010). Em relação à DDAVP, o fármaco tem sido utilizado também na profilaxia de hemorragias e hematomas nas biópsias dos rins. Uma das possíveis complicações conforme relatado por Anandagoda *et al.* (2014) é a ocorrência de hiponatremia em virtude da maior reabsorção de água livre nos ductos coletores e também sinais neurológicos discretos a graves. Por outro lado, Agerød *et al.* (2004) reportaram que a administração de DDAVP tanto em pessoas híidas quanto com alterações renais, o *clearance* de creatinina pode estar reduzido, sendo ainda pior nos pacientes com danos renais.

6.3.4. Proteína sérica total e proteinograma fracionado

Houve redução da proteína sérica total e da albumina, sobretudo nos grupos que receberam veneno de serpente *B. alternatus*, exceto no G7 (veneno + soro antibotrópico) e G1 (somente ácido tranexâmico). Houve redução da albumina no grupo G2 que recebeu apenas desmopressina, fato que pode ser atribuído a uma hemodiluição por retenção hídrica decorrente do fármaco DDAVP como previamente reportado (Horstman *et al.*, 1995).

As PLA₂ de veneno de serpentes apresentam efeito inflamatório principalmente local e também sistêmico contribuindo para a alteração do nível das proteínas plasmáticas e albumina (Nunes *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2016). Segundo Telles *et al.* (2014), o veneno de serpente *B. alternatus* promoveu redução da proteína plasmática total e albumina em ratos, corroborando com o presente estudo. Contudo estas reduções ocorreram de forma mais tardia do que o observado no presente estudo, que em apenas 12h já apresentou alteração desses níveis. As citocinas pró-inflamatórias que são intensamente induzidas no envenenamento por serpentes *Bothrops* como a IL6 e TNF- α , causam inflamação, principalmente no local de inoculação do veneno, geram uma redução da secreção hepática da albumina. Nos processos inflamatórios, a

albumina é reduzida tanto por redução de sua síntese pelo fígado bem como aumento do catabolismo e evasão desta para o compartimento extravascular (Naoum, 1990). Segundo Barraviera *et al.*, (1995), nos acidentes ofídicos por serpentes *Bothrops spp* e *Crotalus durissus*, os níveis de proteína total e albumina se reduzem 24h após os envenenamentos no ser humano.

No presente estudo, não houve alterações das proteínas de fase aguda, exceto para a albumina, demonstrando que a cinética destas proteínas de fase aguda no envenenamento por *B. alternatus* são mais tardias. Corroborando com Mackiewicz *et al.*, (1988), o tempo decorrido do estímulo inflamatório até o tempo do exame pode não ter sido o suficiente para observar possíveis alterações da cinética das proteínas de fase aguda no coelho. Os autores relataram que, no coelho, 48h após estímulo inflamatório com turpentina, houve alterações de proteína C reativa, haptoglobina e amiloide sérica e 72 após, alterações de albumina, transferrina e ceruloplasmina.

Em estudo onde se avaliou as proteínas de fase aguda após a inoculação de veneno de *B. alternatus* em ratos no 12º dia foram observados aumento de α -1 e α -2 globulinas, e a partir do terceiro dia, houve aumento de β -globulina. As gamaglobulinas somente se elevaram no sexto dia após envenenamento. Houve discreta redução de albumina de forma tardia e no terceiro dia após o envenenamento uma elevação da proteína total, devido ao aumento das globulinas (Telles *et al.*, 2014).

6.4. AVALIAÇÕES ANATOMOHISTOPATOLÓGICAS

6.4.1. Musculatura estriada esquelética

Foram observadas macroscopicamente nos animais hemorragias e microscopicamente graves alterações no local de inoculação do veneno, tais como hemorragia, edema, inflamação e necrose. Os efeitos inflamatórios e mionecrosante do veneno de serpentes *Bothrops* têm sido amplamente estudados há muitas décadas. Queiroz e Petta, (1984), demonstraram que há intensa atividade fagocitária no sítio de inoculação do veneno de serpente *B. alternatus* similarmente ao que ocorreu na musculatura estriada esquelética, no presente estudo.

No veneno de *B. alternatus* utilizado neste estudo experimental havia grande quantidade de SVMPs que foram demonstradas no SDS-PAGE, contudo bandas de aproximadamente 14 kDa que são PLA₂ foram marcadas fracamente neste *pool* de veneno. Para Mamede *et al.* (2016), tanto as SVMPs do veneno de serpentes quanto as PLA₂ são responsáveis pelos efeitos locais provenientes do veneno de serpente *B. alternatus*. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que as reações inflamatórias provenientes do veneno de *B. moojeni* são mediadas por eicosanoides, histamina, óxido nítrico e bradicinina induzindo miotoxicidade e hiperalgesia. Por outro lado, a histamina, óxido nítrico e leucotrienos, apesar de também induzirem os mesmos efeitos no caso de envenenamento por serpente *Bothrops alternatus* têm menor papel no edema e miotoxicidade. As interleucinas IL-1, IL-6 e TNF- α induzem efeitos locais, tais como aumento expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos, conforme demonstrado na fig. 25, a intensa presença de células inflamatórias no sítio de inoculação do veneno (Barraviera *et al.* 1995; Bilate, 2007; Declue *et al.*, 2012).

Neste protocolo experimental, pode-se inferir que os efeitos locais tiveram maior contribuição dos componentes do veneno que não são PLA₂ devido sua menor

concentração neste veneno utilizado. Além da necrose e hemorragia evidente nas colorações por HE aqui observadas, houve expressão de marcação positiva para caspase-3 na imunoistoquímica indicando *in vivo* uma provável indução de mecanismos de apoptose nas fibras musculares lesadas pelo veneno de *B. alternatus*. A intensidade e tipo do estímulo lesivo que determina se a morte celular será por apoptose e ou necrose, sendo observado no presente estudo a ocorrência dos dois fenômenos simultaneamente (Elmore, 2007). Outros estudos avaliaram *in vitro* o efeito citotóxico e apoptose induzida por toxinas de venenos de serpentes. Segundo Prinholato da Silva *et al.* (2015), uma miotoxina BthTX-I que é uma PLA₂ isolada do veneno de *B. jararacussu* teve ação citotóxica principalmente por apoptose sobre culturas de células de leucemia promielocítica, carcinoma hepatocelular humano, feocromocitoma murino e melanoma murino reduzindo a viabilidade destas células entre 40% a 50%. Adicionalmente, Burin *et al.* (2013) também demonstraram que uma L-amino oxidase ácida do veneno de *B. pirajai* induz *in vitro* apoptose em culturas de células neoplásicas. Outro estudo avaliou também em cultura de células muscular murina C2C12, a indução de citotoxicidade por venenos de serpentes *B. alternatus* e *B. diporus*, espécimes da Argentina. Ambos os venenos apresentaram mecanismos de citotoxicidade por apoptose (Bustillo *et al.*, 2009). Também foi reportado, *in vitro*, o envolvimento de mecanismos de apoptose via caspase-3 na citotoxicidade sobre a musculatura estriada esquelética de camundongos o envolvimento da baltergina, uma metaloproteinsase da classe P-III que pode ser a responsável por este mecanismo no veneno de *B. alternatus* (Bustillo *et al.*, 2017).

6.4.2. Pulmões

Foi observada hemorragia pulmonar, macro e microscopicamente indicando que os tratamentos utilizados não foram capazes de prevenir a hemorragia pulmonar, inclusive nos grupos que receberam o soro antibotrópico associado aos fármacos. De acordo com o protocolo da FUNED, cada 1,0ml de soro antibotrópico é capaz de neutralizar 5mg de veneno. No presente estudo, foi administrada nos animais 0,25ml de soro por animal, dose essa, capaz de neutralizar a quantidade de veneno inoculada. Segundo Maduwage e Isbister (2015) o soro antiveneno é capaz de prevenir as coagulopatias de consumo por determinadas espécies de serpentes e outras não.

A baltergina também é capaz de atuar tanto sobre o sistema hemostático gerando hemorragia pulmonar quanto sobre a integridade capilar (Gay *et al.*, 2009). No SDS-PAGE realizado do veneno utilizado nesta pesquisa, havia predominantemente uma grande quantidade de bandas que são SVMPS. Também havia bandas que são serinoproteases e lecitinas tipo C que, provavelmente, em conjunto, promoveram as alterações da hemostasia e coagulação aqui identificadas incluindo, as hemorragias pulmonares. Em estudo experimental realizado em camundongos, foi administrada por via intravenosa uma metaloproteinase PIII (jararragina) sendo relatada apenas hemorragia pulmonar (Escalante *et al.*, 2003). Apesar de os pulmões e a musculatura estriada esquelética serem os locais que ocorrem predominantemente as hemorragias, tem descrito na literatura, embora incomum, um caso de acidente vascular encefálico hemorrágico em uma mulher vítima de acidente botrópico (Machado *et al.*, 2010).

6.4.3. Fígado

Os exames das transaminases do trato hepatobiliar seguem em consonância com os exames histopatológicos, ou seja, ausência de intensas lesões. A presença de hiperemia do fígado foi observada macro e microscopicamente, semelhante aos demais órgãos avaliados no estudo. Este fato que pode ser relacionado à

administração do tiopental para a eutanásia dos animais (Petroianu *et al.*, 2011). A presença de alterações de maior gravidade não ocorreu, pois apenas um animal no grupo G6 (veneno + DDAVP) apresentou necrose de hepatócito multifocal aleatória e, outro animal do grupo G5 (veneno +ATX) mostraram tais alterações. A degeneração microvacuolar (degeneração hidrópica), acontece frequentemente em casos de intoxicações e envenenamentos, contudo, no presente estudo, os animais não envenenados também apresentaram tais achados. Animais bem nutridos com restrição alimentar também podem cursar com degeneração microvacuolar, que frequentemente é devido à deposição de água. Os animais devido ao estado de prostração, não se alimentaram durante a execução do protocolo (Serakides e Guedes, 2006). Também não houve a presença de hemorragia hepática na avaliação macroscópica e microscópica. A hemorragia hepática no envenenamento botrópico é considerada incomum (Cunha *et al.*, 2015).

6.4.4. Rins

Apenas um animal apresentou sinais de hemorragia discreta nos rins. Tal fato é corroborado pela literatura, sendo os pulmões e a musculatura estriada esquelética mais acometidas pelas hemorragias (Escalante *et al.*, 2003).

Doses de veneno inferiores à empregada neste protocolo experimental, como as utilizadas por Melo *et al.* (2007), promoveram discreta alteração renal. Doses de 1,25 µg de veneno em coelhos também utilizadas numa pesquisa de Melo *et al.* (2005), não causaram alterações renais, demonstrando o efeito dose-dependente. Fato notável, que neste experimento foram administradas quantidades muito aquém do que uma serpente inocula de veneno e, mesmo assim foram observadas lesões renais ao exame histopatológico em curto tempo, como NTA. Apesar de, os mecanismos ainda não estarem totalmente esclarecidos, todas estas lesões, teoricamente, podem ser evitadas com a administração do soro antibotrópico (Castro *et al.*, 2004). Contudo, no presente estudo, três animais nos grupos G7 e quatro animais no grupo G3 apresentaram indícios de alterações tubulares. Ou seja, o soro antiofídico não preveniu tais alterações e inclusive pode ter precipitado alterações tubulares. Em estudos da toxicocinética renal do veneno de *B. alternatus* após a administração IV de 0,8 mg.kg⁻¹, foi detectado circulante até sete dias após. Nos glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais, tecidos perivascular e vascular, o veneno foi identificado 30 minutos após a inoculação (Mello *et al.*, 2010). Este fato corrobora as alterações morfológicas dos rins precoces encontradas no presente estudo.

A hipotensão que ocorre nos envenenamentos botrópicos demonstrado por Rabelo *et al.*, (2005) e Evangelista *et al.* (2010), podem provocar hipoxemia renal, associado com hipovolemia persistentes e redução da TFG podendo gerar NTA sendo essa, frequentemente, a causa de IRA nos envenenamentos (Albuquerque *et al.*, 2013). Apesar de os mecanismos ainda não estarem totalmente esclarecidos, todas estas lesões teoricamente, podem ser evitadas com a administração do soro antibotrópico (Castro *et al.*, 2004). Contudo, no presente estudo, animais do grupo G7 que receberam veneno de serpente e soro antiofídico também tiveram lesões tubulares. Dias (2009), reportou em cães após envenenamento por *B. alternatus* experimental a descamação da parede tubular de modo similar ao ocorrido no presente estudo. Evangelista *et al.* (2010), reportou redução da TFG relacionada à um desequilíbrio do transporte iônico nos rins devido ação das PLA₂.

6.4.5. Musculatura estriada cardíaca

Foi observada na necropsia e no exame histopatológico, em dois animais a presença de área focal hemorrágica em epicárdio. Este achado, não tem sido observado em envenenamentos por *Bothrops*, apesar de ter sido reportado alterações cardiológicas decorrente do veneno bruto de *B. marajoensis*, em ratos, devido às alterações do ritmo cardíaco por interferência em canais iônicos (Evangelista *et al.*, 2010). Pode-se inferir que, devido o quadro de alteração da hemostasia presente nos animais, semelhantemente ao ocorrido na musculatura estriada esquelética devido à atuação dos diferentes componentes do veneno, também pode ocorrer na musculatura estriada cardíaca, porém em menor intensidade. O cateter central implantado nos animais passava pelo átrio direito migrando até a veia cava caudal dos animais. Este fato pode, de certo modo, induzir nos animais alguma alteração no endocárdio pela maior proximidade e contato com o cateter e não na camada mais externa do coração.

7. CONCLUSÕES

O veneno de serpente *B. alternatus* promove menor geração de trombina e há um predomínio da anticoagulação.

Os fármacos utilizados, ATX e DDAVP, não foram capazes de prevenir as alterações da hemostasia, sendo o melhor tratamento para restaurar a geração de trombina o soro antitotrópico.

O teste de geração de trombina é mais sensível que as provas de TP, TTPa e fibrinogênio para diagnosticar um quadro de hipocoagulabilidade em decorrência de veneno de serpente.

As toxinas presentes no veneno de serpente *B. alternatus* promovem graves alterações no sítio de inoculação mesmo em concentrações muito ínfimas em relação à dose inoculada por uma serpente e de forma muito precoce. Dentre tais alterações no sítio de inoculação destaca-se intensa inflamação, necrose, hemorragia com sinais macroscópicos e microscópicos. Os fármacos utilizados no presente estudo não tiveram qualquer benefício em relação à instalação destas lesões.

Pode-se inferir que o veneno de serpente *B. alternatus* utilizado além de induzir necrose também provoca morte celular por apoptose na musculatura estriada esquelética.

O veneno induz NTA e apoptose evidenciado nos rins.

8. REFERÊNCIAS

ABDUL-KAREEM, H.K. Study of snake bite clinical signs, complication and management. *Qatar Medical Journal*, v.1, n.3, p. 98-106, 2007.

AGERSO H.; LARSEN, L.S.; RIIS, A. *et al.* Pharmacokinetics and renal excretion of desmopressin after intravenous administration to healthy subjects and renally impaired patients. *Brazilian Journal of Clinical Pharmacology*, v. 58, n. 4, p. 352–358, 2004.

ALAMEEL, T.; WEST, M. Tranexamic acid treatment of life-threatening hematuria in polycystic kidney disease. *International Journal of Nephrology*, online 2011 Jun 1. doi: 10.4061/2011/203579

ALBUQUERQUE, P. L.M.M.; JACINTO, C.N.; SILVA JÚNIOR, G. *et al.* Lesão renal aguda causada pelo veneno das cobras *Crotalus* e *Bothrops*: revisão da epidemiologia, das manifestações clínicas e do tratamento. *Revista do Instituto de Medicina tropical*, v. 55, n. 5, 2013.

AMARAL, C.F.S.; SILVA, O.A.; GODOY, P. *et al.* Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon*, v. 23, n. 6, p. 877– 885, 1985.

AMORA, D.N.; SOUSA, T.N.; MARTINS, A.M.C. *et al.* Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon*, v. 47, p. 260–264, 2006.

ANANDAGODA, N.; JAYAWARDENE, S.; MACDOUGALL, L.C. *et al.* Desmopressin use prior to renal transplant biopsy—does it fit? *Clinical kidney Journal*, v. 7, n. 6, p. 602-604, 2014.

ANDERSSON, L.; ERIKSON, O.; HEDLUND, P.O. *et al.* Special Considerations with regard to the dosage of tranexamic acid in patients with chronic renal diseases. *Urology Research*, v. 6, n. 83, 1978.

ANDRADE FILHO, A. *In: Toxicologia na Prática Clínica*. 2ª ed., Belo Horizonte: Folium, 2013. 675p.

ARAÚJO, P.; BELLUOMINI, E. Toxicidade de venenos ofídicos. I sensibilidade específica de animais domésticos e de laboratório. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 30, p. 133-142, 1960-62.

ARCE-BEJARANO, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Intravascular hemolysis induced by the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*, in a mouse model: identification of directly hemolytic phospholipases A₂. *Toxicon*, v. 90, p. 26-35, 2014.

ARMENTANO, R.A.; BANDT, C.; SHAER, M. *et al.* Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs treated for crotalid snake envenomation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 24, n.2, p. 144-153, 2014.

- AROCAS, V.; ZINGALI, R.; GUILLIN, M.C. *et al.* Bothrojaracin: a potent bivalent thrombin inhibitor. *Toxicon*, v.34, n.10, p. 1077-1099, 1996.
- ASSAFIM, M.; FRATANI, F.S.; FERREIRA, M.S. *et al.* Exploiting the antithrombotic effect of the (pro) thrombin inhibitor bothrojaracin. *Toxicon*, v.119, p. 46-51, 2016.
- BARBOSA, P.S.F.; HAVT, A.; FACÓ, P.E.G. *et al.* Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. *Toxicon*, v.40, p. 1427-1435, 2002.
- BARONE, J.M.; ALPONTI, R.F.; FREZZATTI, R. *et al.* Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice. *Toxicon*, v.57, p. 148-156, 2011.
- BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWISK, A. *et al.* Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by bothrops and crotalus snakes in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease*, v. 1, n. 1, p. 11-22, 1995.
- BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A. *et al.* Acute renal failure definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: The second international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI) group. *Critical Care*, v.8, p. 204-212, 2004.
- BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. Disponível em: < <http://www.cerir.org.br/pdf/TReuma2-07-Inflama%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso em: 11 de Abr. 2016.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 62, p. 325-372, 1994.
- BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, v. 23, n. 4, p. 177-189, 2009.
- BLAIR, P.; FLAUMENHANFT, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, v.23, n. 4, p. 177-189, 2009.
- BLAYA, C.; PRATI, C.; BONET, C. *et al.* Análise da utilização dos novos inibidores da trombina na prática médica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 71, n. 2, p. 163-167, 1998.
- BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.; CRUZ-HOFLING, M.A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.67, p. 217-222, 2002.
- BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.; CRUZ-HOFLING, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, p. 698-706, 1999.
- BOUDREAUX, M.K. *Platelet structure*. In Weiss, D.; Wardrop, J. eds.: Schalm's Veterinary Hematology 6th Edition. Cap. 75, p. 561-568, 2010.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. p. 248-254, 1976.
- BRAINARD, B.M.; BROWN, A.J. Defects in coagulation encountered in small animal critical care. *Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice*, 2011.
- BRAZIL, V. *Do emprego da peçonha em terapeutica / Vital Brazil*. [Rio de Janeiro] : [s.n.], 1935. 18p.
- BRINKMAN, H.J. Global assays and the management of oral anticoagulation. *Thrombosis Journal*, v.13, n.9, 2015. 2015.
- BURIN, S.M.; AYRES, L.R.; NEVES, R.P. *et al.* L-Amino Acid Oxidase isolated from *Bothrops pirajai* induces apoptosis in BCR-ABL-Positive cells and potentiates imatinib mesylate effect. *Basic e Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 113, p. 103–112, 2013.
- BUSTILLO, S.; LUCERO, H.; LEIVA, L.C. *et al.* Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease*, v. 15, n. 1, p. 28-42, 2009.
- BUSTILLO, S.; VAN DE VELDE, A.C.; PERFUMO, M. *et al.* Apoptosis induced by a snake venom metalloproteinase from *Bothrops alternatus* venom in C2C12 muscle cells. *Apoptosis*, p. 1-11, 2017.
- CALDAS, S. A.; TOKARNIA, C.H.; FRANÇA, T.N. *et al.* Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento experimental por *Bothrops alternatus* em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 6, p. 303-312, 2008.
- CAMPBELL, T. W. *Bioquímica Clínica de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas*. In: THRALL, M. A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1a Edição. São Paulo: Roca, 2007. p. 433-434, 439-440.b
- CAMPBELL, T. W. *Hematologia de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas*. In: THRALL, M. A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1a Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.201-206, 208-210.a
- CARREIRO, P.R.; REZENDE-NETO, J.B.; LISBOA, T.A. *et al.* Clotting Factor XIII and desmopressin improve hemostasis in uncontrolled bleeding. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 30, n.3, p. 170-177, 2015.
- CASTOLDI, E.; ROSING, J. Thrombin generation tests. *Thrombosis Research*, v. 127, p. 21–25, 2011.
- CASTRO, H.C.; DUTRA, D.L.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L. *et al.* Bothroaltermnin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*, v.36, p. 1903-1912, 1998.

- CASTRO, I.; BURDMANN, E.A.; SEGURO, A.C. *et al.* *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: Role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon*, v. 43, p. 833–839, 2004.
- CHAIYABUTR, N.; SITPRIJA, V. Pathophysiological effects of Russell's viper venom on renal function. *Journal of Natural Toxins*, v. 8, p.351–358, 1999.
- CHENG, Q.; TUCKER, E.I.; PINE, M.S. *et al.* A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood*, v.116, n.19, p. 3981-3989, 2010.
- CHIPPAUX JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*. v. 76, n. 5, p. 515–524, 1998.
- COLE, E.; DAVENPORT, R. Early tranexamic acid use in trauma haemorrhage: Why do we give it and which patients benefit most? *International Emergency Nursing*, 2014.
- COSTA, J. O.; PETRI, C.B.; HAMAGUCHI, A. *et al.* Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease*, v. 13, n. 3, p. 640-654, 2007.
- CRASH-2 TRIAL *et al.* Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*, v. 376, n. 9734, p. 23-32, 2010.
- CUNHA, F.C.; HEERDT, M.; TORREZ, P.P.Q. *et al.* First report of hepatic hematoma after presumed *Bothrops* envenomation. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 5, p. 633-635, 2015.
- DANCKWARDT, S.; HENTZE, M. W.; KULOZIK, A.E. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *Journal of Molecular Medicine*, v. 91, p. 1257–1271, 2013.
- DAVIE, E.W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, v.145, p.1310–1312, 1964.
- De ANDA, A.; SPIESS, B. Aprotinin revisited. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v.144, p. 998-1002, 2012.
- DeCLUE, A.E.; SHARP, C.R.; HARMON, M. Plasma inflammatory mediator concentrations at ICU admission in dogs with naturally developing sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 26, p. 644-630, 2012.
- DESBOROUGH, M.J.; SMETHURST, P.A.; ESTCOURT, L.J. *et al.* Alternatives to allogeneic platelet transfusion. *British Journal of Haematology*, v. 175, n.3, p. 381-392, 2016.
- Di CERA, E. Thrombin. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 29, n. 4, p. 203–254, 2008.

DI MAURO, F.M.; HOLOWAYCHUCK, M.K. Intravenous administration of desmopressin acetate to reverse acetylsalicylic acid-induced coagulopathy in three dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 23, n. 4, p. 455-458, 2013.

DIAS, L. Avaliação das alterações cardiovasculares causadas pela peçonha de *Bothrops alternatus*: estudos *in vivo* e *in vitro*. 2009. 146pags. Tese, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas.

EAPEN, C.K.; CHANDY, N.; KOCHUVARKEY, K.L. *et al.* Unusual complication of snake bite: hypopituitarism after viper bites. In: OHSAKA, A, HAYASHI, K, SAWAI, Y. eds. Animal, plant and microbial toxins. V. 2. New York, NY, Plenum Press, 1976, p. 467-73.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ESCALANTE, T.; NUÑES, J.; MOURA DA SILVA, A.M. *et al.* Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 15, n. 193, n.1, p. 17-28, 2003.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTI, A.S. *et al.* *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by α_2 macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. *Toxicon*, v.43, n.2, p. 213-217, 2004.

ESMON, C.T.; OWEN, W.G. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proceedings of Natitonal Academy of Science*, v. 78, p. 2249-2252, 1981.

ESPITIA, O.; FOUASSIER, M. Le test de génération de thrombine. *La Revue de Médecine Interne*, v.36, p. 690-693, 2015.

EVANGELISTA, I.L.; MARTINS, A.M.C.; NASCIMENTO, N.R.F. *et al.* Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. *Toxicon*, v. 55, p. 1061-1070, 2010.

FERREIRA, C.N.; SOUZA, M.O.; DUSSE, L.M.S. *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FERREIRA, S.H. Do fator de potenciação da bradicinina (BPF) aos inibidores da ECA. *HiperAtivo*, v.5, n.1, 1998.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: Multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*, v. 8, n.4, p. 909-920, 2008.

FRANCO, R.F. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. *Medicina*, v. 34, p. 229-237, 2001.

FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P.F. Allopurinol reduces the lethality associated with acute renal failure induced by *Crotalus durissus terrificus* snake. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 5, p.1-8, 2011.

- FRITZ, H.; WUNDERER, G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittelforschung*, v. 33, n. 4, p. 479-494, 1983.
- FULCHER, C.A.; GARDINER, J.E; GRIFFIN, J.H. *et al.* Proteolytic inactivation of activated human factor VIII procoagulant protein by activated protein C and its analogy to factor V. *Blood*, v. 63, p. 486-489, 1984.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 299, p. 373-6, 1980.
- GAILANI, D.; RENNÉ, T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.5, n.6, p. 1106-1112, 2007.
- GARCIA DENEGRI, M.E.; TEIBLER, G.P.; MARUÑAK, S.L. *et al.* Efficient muscle regeneration after highly haemorrhagic *Bothrops alternatus* venom injection, *Toxicon* (2016), doi: 10.1016/j.toxicon.2016.10.005.
- GATT, A.; van VEEN, J.J.; WOOLEY, AM. *et al.* Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal *in vitro*. *Thrombosis and haemostasis*, v.100, n.2, p.350-355, 2008.
- GAY, C.C.; MARUÑAK, S.L.; TEIBLER, P. *et al.* Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. *Toxicon*, v.53, p. 53-59, 2009.
- GHOSHAL, K.; BHATTACHARYYA, M. Overview of platelet physiology: Its hemostatic and non hemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal*, 2014.
- GIORGI, R.; CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, v. 31, p. 1257-65, 1993.
- GUINTO, E. R.; ESMON, C.T. Loss of prothrombin and of factor Xa-factor Va interactions upon inactivation of factor Va by activated protein C. *Journal of Biological Chemistry*, v. 259, p. 13986-13992, 1984.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia Y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* em ratón blanco. *Toxicon*, v. 18, p. 603-610, 1980.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. *et al.* Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A Journey of discovery and understanding. *Toxins*, v. 8, n.4, p. 1- 19, 2016.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

- GUTIÉRREZ, J.M.; NUÑES, J.; CINTRA, A.C.O. *et al.* Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 55, p. 217-229, 1991.
- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Experimental and Molecular Pathology*, v.40, p. 367-379, 1984.
- HADLEY, G.P.; MCGARR, P.; MARS, M. The role of thromboelastography in the management of children with snake-bite in southern Africa. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, v. 93, p. 177-179, 1999.
- HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). *Toxicon*, v. 30, n. 5, p. 573-579, 1992.
- HEMKER, H.C.; BEGUIN, S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thrombosis and Haemostasis*, 74, 134–138, 1995.
- HEMKER, H.C.; GIESEN, P.; AI DIERI, R. *et al.* Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, v. 33, p. 4-15, 2003.
- HEMKER, H.C.; WIELDERS, S.; KESSELS, H. *et al.* Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 70, p. 617–624, 1993.
- HEWITT, C.D.; INNES, D.J.; SAVORY, J. *et al.* Normal biochemical and hematological values in New Zealand White rabbits. *Clinical Chemistry*, v.35, n.8, p.1777- 1779, 1989.
- HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews*, v. 17, p. 51-55, 2003.
- HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, v. 16 (1/2), p. 17-20, 2003b.
- HOFFMAN, M. Some things I thought I knew about tissue factor that turn out to be wrong. *Thrombosis Research*, v.1, n. 122, p. 573-577, 2008.
- HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: A Modern view of hemostasis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 21, p. 1-11, 2007.
- HOFFMAN, M.; MONROE, D.M 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 85, p. 958-965, 2001.
- HORSTMAN, L.L; VALLE-RIESTRA, B.J; JY, W. *et al.* Desmopressin (DDAVP) acts on platelets to generate platelet microparticles and enhanced procoagulant activity. *Thrombosis Research*, v. 79, n. 2, p. 163-174, 1995.
- IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of Natitonal Academy of Science*, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. *Grading of acute kidney injury*. Disponível em: <[http://iris-kidney.com/pdf/iris-grading-of-acute-kidney-injury-\(final\).pdf](http://iris-kidney.com/pdf/iris-grading-of-acute-kidney-injury-(final).pdf)>. Acesso em: 04 Nov. 2016.

JELINEK, G.A.; SMITH, A.; LYNCH, D. *et al.* The effect of adjunctive fresh frozen plasma administration on coagulation parameters and survival in a canine model of antivenom-treated brown snake envenoming. *Anesthesia and Intensive Care*, 33 p 36–40, 2005.

KAHN, M.L.; ZHENG, Y.W.; HUANG, W. *et al.* A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, v.13, p. 690-694, 1998.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v.45, p.1041-1049, 2005.

KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; DESMOND, H. *et al.* Systemic haemorrhage in rats Induced by haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v.29, n.9, p. 1097-1105, 1991.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.; THEAKSTON, R.D. *et al.* Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 34, n.6, p. 627-642, 1996.

KANEKO, J. J; HARVEY, J. W; BRUSS, M. L. (Eds). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5a ed. Academic Press, 2008, 916p.

KASHUK, J.L.; MOORE, E.E.; SABEL, A. *et al.* Rapid thrombelastography (r-TEG) identifies hypercoagulability and predicts thromboembolic events in surgical patients. *Surgery*, v.146, n. 4, p. 764–72, 2009.

KAUSHANSKY, K. *et al.* Williams Hematology. 8a edição, 2010.

KAWANO, J.; ANAI, K.; SUGIKI, M. *et al.* Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; non-significance of hemorrhagic metalloproteinase. *Toxicon*, v.40, n. 11, p. 1553– 1562, 2002.

KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes). Acute Kidney Injury Work Group. Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supplements*, v.2, p.1–138, 2012.

KINI, R.M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon*, v. 45, p. 1133–1145, 2005.

KORTENOEVER, M.L.A.; FENTON, L.A. Renal aquaporin and water balance disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1840, p. 1533–1549, 2014.

KRISTENSEN, A.T.; EDWARDS, M.L.; DEVEY, J. Potential uses of recombinant human factor VIIa in veterinary medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.33, n.6, p. 1437-1451, 2003.

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

- LECKER, I.; WANG, D.S.; ROMASCHIN, A.D. *et al.* Tranexamic acid concentrations associated with human seizures inhibit glycine receptors. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 12, p. 4654-4666, 2012.
- LEÓN, G.; HERRERA, M.; SEGURA, A. *et al.* Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*, v.76, p.63–76, 2013.
- LIMA, M.E.; FORTES-DIAS, C.L.; CARLINI, C.R. *et al.* Toxinology in Brazil: A big challenge for a rich biodiversity. *Toxicon*, v. 56, p. 1084-1091, 2010.
- LINARD, A. ROCHA e SILVA, T.A.A.; MIYABARA, E.H. *et al.* Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: Expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1810, p. 895–906, 2011.
- LOPES, H.E. Alterações locais induzidas pela secreção tóxica de *Phylodrias patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae). Dissertação, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, USP. Departamento de fisiologia, 2008.
- LUNA, K.P.O.; XAVIER, E.M.; PASCOAL, V.P.M. *et al.* Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 6, p. 731-732, 2010.
- MACCORMACK, P.L. Tranexamic acid. A review of its use in the treatment hyperfibrinolysis. *Drugs*, v. 72, n. 5, p. 585-617, 2012.
- MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature*, v.202, p.498–499, 1964.
- MACFARLANE, R.G.; BIGGS, R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *Journal of Clinical Pathology*, v. 6, n.1, p. 3–8, 1953.
- MACHADO, A.S.; BARBOSA, F.B.; MELLO, G.S. *et al.* Acidente vascular cerebral hemorrágico associado à acidente ofídico por serpente do gênero *Bothrops*: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 5, p. 602-604, 2010 .
- MACKIEWICZ, A.; GANAPATHI, M.K.; SHULTZ, D. *et al.* Regulation of rabbit acute phase protein biosynthesis by monokines. *Biochemical Journal*, v. 253, p. 851-857, 1988.
- MADUWAGE, K.; BUCKLEY, N.A.; de SILVA, H.J. *et al.* Snake antivenom for snake venom induced consumption coagulopathy. *Cochrane Database Systematic Review*, v. 9, n. 6, 2015.
- MADUWAGE, K.; ISBISTER, G.K. Current Treatment for venom-induced consumption coagulopathy resulting from snakebite. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 8, n.10, 2014.

- MAINERO, A.; AQUILAR, A.; RODARTE, B. *et al.* Rabbit ceruloplasmin: purification and partial characterization. *Preparative biochemic e biotechnology*, v. 26, p. 217-228, 1996.
- MAMEDE, C. C. N.; SOUSA, B.B.; PEREIRA, D.F.C. *et al.* Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*, v. 117, p. 37-45, 2016.
- MANGUS, R.S.; KINSELA, S.B.; FRIDEL, J.A. *et al.* Aminocaproic Acid (Amicar) as an alternative to aprotinin (Trasylol) in liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, v. 46, p. 1393-1399, 2014.
- MANN, K.G.; BUTENAS, S.; BRUMMEL, K. The dynamics of thrombin formation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v.23, n.1, p. 17-25, 2003.
- MANNUCCI, P.M.; RUGGERI, Z.M.; PARETI, F.I. *et al.* 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. *Lancet*, v. 1, n. 8017, p. 869-872, 1977.
- MARKLAND, F.S.Jr.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 3-18, 2013.
- MARTINS, L.C.; SABHA, M.; PAGANELI, M.O. *et al.* Vasopressin intravenous infusion causes dose dependent adverse cardiovascular effects in anesthetized dogs. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.94, n.2, p. 213-218, 2010.
- MATHIJSSSEN, N.C.J.; MASEREEUW, R.; HOLME, P.A. *et al.* Increased volume of distribution for recombinant activated factor VII and longer plasma-derived factor VII half-life may explain their long lasting prophylactic effect. *Thrombosis Research*, v.132, p. 256-262, 2013.
- MELLO, S.M.; LINARDI, A.; RENNÓ, A.L. *et al.* Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in rats. *Toxicon*, v. 55, p. 470-480, 2010.
- MELO, M.M.; LÚCIA, M.; HABERMEHL, G.G. *et al.* Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2007.
- MISCHKE, R. Acute haemostatic changes in accidentally traumatised dogs. *Veterinary Journal*, v. 169, p. 60-64, 2005.
- MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K. *et al.* Inflamação aguda e crônica. In: Robbins e Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p.29-54.
- MOHAMED, A. H. MERVAT, A.B.; NABIL, A.D. *et al.* Effects of cobra (*Naja haje*) venom on blood glucose, blood phosphate and plasma insulin-like activity in dogs. *Toxicon*, v. 10: p. 385- 391, 1972.
- MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common

aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.65, p. 2897-2912, 2008.

MONTEIRO, R.Q.; ZINGALI, R. Inhibition of prothrombin activation by bothrojaracin, a C-type lectin from *Bothrops jararaca* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 382, n.1, p. 123-128, 2000.

MURRAY, R. K.; CONNELL G. E. Elevation of serum haptoglobin in rabbits in response to experimental inflammation. *Nature*, v. 186, n. 86, 1960.

MURTHY, K.R.K. "The scorpion envenoming syndrome: a different perspective. The physiological basis of the role of insulin in scorpion envenoming". *Journal of Venomous Animals and Toxins*, vol. 6, p. 4–51, 2000.

MURTHY, K.R.K.; HASE, N.K. "Scorpion envenoming and the role of insulin". *Toxicon*, v. 32, n. 9, p. 1041–1044, 1994.

MUSHIYAKH, Y.; DANGARIA, H.; QAVI, S. *et al.* Treatment and pathogenesis of acute hyperkalemia. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspective*, v. 1, n.4, 2011.

NAKANISH-MATSUI, M.; ZHENG, Y.W.; SULCINER, D.J. *et al.* PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, v. 404, p. 609-613, 2000.

NAOUM, P.C. *Eletroforese: técnicas e diagnósticos*. São Paulo: Livraria Santos. 1990. 174p.

NAVES, L.A.; VILAR, L.; COSTA, A.C.F. *et al.* Distúrbios na secreção e ação do hormônio antidiurético. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 47, n.4, p. 467-481, 2003.

NELWAN, E.J.; ADIWINATA, R.; HANDAYANI, S. *et al.* Severe coagulopathy and transient hypertension following a Rhabdophis subminiatus bite: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 4, p. 520-522, 2016.

NINIVAGGI, M.; APITZ-CASTRO, R. Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clinical Chemistry*, v.58, n.8, p.1252-1259, 2012.

NUNES, D.C.; RODRIGUES, R.S.; LUCENA, M.N. *et al.* Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 154, n.3, p.226-33, 2011.

ODABAS, A.R.; CETINKAYA, R.; SELÇUK, Y. *et al.* Tranexamic-acid-induced acute cortical necrosis in a patient with haemophilia A. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 16, n.1, p. 189-90. 2001.

OLIVEIRA, L.M.F.; ULLAH, A.; MASOOD, R. *et al.* Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. *Toxicon*, v.15, n. 76, p. 282-290, 2013.

PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. G. *et al.* Purification, cloning, and molecular characterization of a high-molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom – insights into the disintegrin gene family. *Journal of Biologic Chemistry*, v. 267, p. 22869–22876, 1992.

PALMER, R. M.; ASHTON, D.S.; MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v. 333, p. 664-666, 1988.

PATRÃO-NETO, F.C. Dexamethasone antagonizes the *in vivo* myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. *Toxicon*, v. 69, p. 55–64, 2013.

PEA, L.; RODA, L.; BOUSSAUD, V. *et al.* Desmopressin therapy for massive hemoptysis associated with severe leptospirosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 167, p. 726–728, 2003.

PELLEGRINI, A.; GIARETTA, D.; CHEMELLO, R. *et al.* Feline generalized epilepsy induced by tranexamic acid (AMCA). *Epilepsia*, v. 23, n.1, p. 35-45, 1982.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. In: FILHO, G. B.; PEREIRA, F. E. L.;

PITTELLA, J. E. H.; BAMBIRRA, E. A.; BARBOSA, A. J. A. *Patologia geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap. 7, p. 111-143.

PERES, L.A.B.; CUNHA, A.D.; SCHÄFER, A.J. *et al.* Biomarcadores da injúria renal aguda. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 35, n. 3, p. 229-236, 2013.

PETROIANU, A. Esplenomegalia induzida por drogas. *Acta Medica Portuguesa*, v. 24(S4), p. 977-982, 2011.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. *et al.* Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, n. 4, , p. 585–593, 2007.

PRINHOLATO DA SILVA, C.; COSTA, P.R.; PAIVA, R.M. *et al.* Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease*, v. 21, n. 44, p. 01-08, 2015.

PRINS, M.; SCHELLENS, C.J.M.M.; VAN LEEUWEN, M.W. *et al.* Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *The Veterinary Journal*, v.185, p. 163–168, 2010.

QUEIROZ, L. S.; PETTA, C. A. Estudo histopatológico das lesões causadas pelo veneno de urutu (*Bothrops alternatus*) em músculo esquelético de camundongos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 26, n. 5, p. 247-253, 1984.

RABELO, R.C.; MELO, M.M.; SILVA JÚNIOR, P.G. *et al.* Avaliação das pressões venosa e arterial em cães submetidos a diferentes tipos de hipotensão. *Arquivos Brasileiros De Medicina-veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 6, p. 741-748, 2005.

RATNOFF, O. D.; COLOPY, J. E. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *Journal of Clinical Investigation*, v.34, n. 4, p. 602–613, 1955.

RIDDEL Jr, J.P. *et al.* Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

ROCHA e SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released by plasma globulin from snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology*, v. 156, p. 261-273, 1949.

ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron e Duméril) em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 2, p. 383-393, 2005.

RODRIGUES, B.R.; FRANÇA, G.S.; FERRO, M.C. *et al.* Venous catheterization experimental model in rabbits: Histological alterations in the catheter region. *Surgical Science*, v.6, p. 532-540, 2015.

RODRÍGUEZ-SERRANO, D.A.; LEAL-MICHARET, A.; RAJAS, O. *et al.* Utilización del factor VII activado en lavado broncoalveolar en un caso de hemorragia pulmonar. *Medicina Intensiva*, 2014.

ROJNUCKARIN, P.; INTRAGUMTOMCHAI, T.; SATTAPIBOON, R. *et al.* The effects of green pit viper (*Trimeresurus albolabris* and *Trimeresurus macrops*) venom on the fibrinolytic system in human. *Toxicon*, v. 37, n. 5, p. 743-755, 1999.

ROSS, L. Acute kidney injury in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.41, p. 1–14, 2011.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C.F.P. *et al.* Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators of Inflammation*, v. 11, n. 2, p. 121-128, 2002.

RUHA, A.M.; CURRY, S.C. Recombinant factor VIIa for treatment of gastrointestinal hemorrhage following rattlesnake envenomation. *Wilderness and Environmental Medicine*, v. 20, p. 156-160, 2009.

SAMBRANO, G.R.; WEISS, E.J.; ZHENG, Y.W. *et al.* Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*, v. 6, n.413, p. 74-78, 2001.

SANTOS, M.F.I.; FARANI, M.C.; ROCHA, P.N. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops sp.* and *Crotalus sp.*: revisão e análise crítica da literatura. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v.31, n.2, p. 132–138, 2009.

SANTOS, M.M.B.; MELO, M.M.; JACOME, D.O. *et al.* Hemograma de cães envenenados experimentalmente com *Bothrops alternatus* após diferentes tratamentos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.4, n.1, p. 1-11, 2003.

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

SCAZZIOTA, A.; ALTMAN, R. El mecanismo de la hemostasia normal. *Revista Iberoamericana Thromb Hemostasia*, 1:9-26, 1996.

SERAKIDES, R.; GUEDES, R.M.C. *Patologias do fígado* In: Cadernos didáticos, Patologia Veterinária. Ed. FEPMVZ, BH, 2006.

SERRANO, S.M.T The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 19-26, 2013.

SIGRIST, N.E. Use of dopamine in acute renal failure. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 17, n. 2, p. 117–126, 2007.

SITPRIJA, V. Snake bite, rhabdomyolysis, and renal failure. *American Journal of Kidney Diseases*, v.31, n. 6, p. 1-3, 1998.

SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins, *Toxicon*, v. 60, p. 943–953, 2012.

SMITH, S.A. *Hemostasis*. In Weiss, D.; Wardrop, J. eds.: Schalm's Veterinary Hematology 6th Edition. Cap. 84, p. 635-653, 2010.

SPINELLI, M.O.; MOTA, M.C.; CRUZ, R.J. *et al.* Estudo dos analitos bioquímicos no plasma de coelhos (Nova Zelândia) mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v.1, n.2, p.163-168, 2012.

STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B. *et al.* Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic e Medicinal Chemistry*. v. 12, p. 2881–2886, 2004.

STOKES, K.Y.; GRANGER, D.N. Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction. *Journal of Physiology*, v. 590, n. 5, p. 1023–1034, 2012.

SULAIMAN, O.M.; PABÓN, G.A.; CORTÉS, C.C, *et al.* An overview of thrombelastography research. *Revista Colombiana de Anestesiología*, v.42, n.4, p. 302-308, 2014.

SVENSSON, P.J.; BERGQVIST, P.B.F; JUUL, K.V. *et al.* Desmopressin in treatment of haematological disorders and in prevention of surgical bleeding. *Blood Reviews*, v. 28, n. 95-102, 2014.

SVENSSON, P.J.; LJUNGSTROM, K.G. Effects of desmopressin and dextran on coagulation and fibrinolysis in healthy volunteers. *Thrombosis Research*, v. 65, p. 355-364, 1991.

Tabnet. Disponível em:
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>> Acesso em:
15 de Novembro, 2016.

- TEIXEIRA, C.F.P.; FERNANDEZ, C.M.; ZULIANI, J.P. *et al.* Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100 (Suppl. I), p. 181-184, 2005.
- TELLES, T.C.; MICHEL, A.F.R.M.; LÚCIA, M. *et al.* Evaluation of rat plasma proteins after bothropic venom inoculation and treatment with Mesenquimal stem cells. *Brazilian archives of biology and technology*, v. 57, n. 1, p. 29-36, 2014.
- TIBBALLS J. Fresh frozen plasma after brown snake bite—helpful or harmful? *Anesthesia and Intensive Care*, v. 33, p. 13–15, 2005.
- VENDRAMIN, F.S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C.M. *et al.* Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de obtenção e utilização em cirurgia plástica. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v.33, n.1, p. 24-28, 2006.
- VILHARDI, H.; BARTH, T; FALC, J. *et al.* Plasma concentrations of factor VIII after administration of DDAVP to conscious dogs. *Thrombosis Research*, v. 47, n. 5, p. 585-591, 1987.
- VINCE, F.A.H.; BRANDAO, M.J.N. Uso de fator VII recombinante ativado para tratamento e profilaxia de grandes sangramentos. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, v. 22, n. 3, 2009.
- WEISEL, J.W. Fibrinogen and fibrin. *Advances in Protein Chemistry*, v.70, p. 247, 249, 2005.
- WOLBERG, A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews*, v.21, n.3, p. 131-142, 2007.
- WOODRUFF, R.S.; SULLENGER, B.; BECKER, R.C. The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v.32, n.1, p. 9–20, 2011.
- ZAFAR, J.; AZIS, S.; HAMID, B. *et al.* Snake Bite Experience at Pakistan Institute of Medical Sciences. *Journal of Pakistan Medical Association*, 1998. Disponível em: <http://jpma.org.pk/full_article_text.php?article_id=3893>.
- ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. *Tratado de Hematologia*. Ed. Atheneu, São Paulo, 2013. 899p.
- ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M. *et al.* Inflammation induced by Bothrops asper venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*, v. 46, p. 806–813, 2005.
- ZAVYALOVA, E.; KOPYLOV, A. Exploring potential anticoagulant drug formulations using thrombin generation test. *Biochemistry and Biophysic Reports*, v. 5, p. 111-119, 2016.

ANEXOS

Procedimento Operacional Padrão da metodologia do Teste de Geração de Trombina do Departamento de Hematologia da Escola de Farmácia, UFMG.

TESTE DE GERAÇÃO DE TROMBINA (GT) – MÉTODO CAT[®]

Dia anterior ao experimento

1. Definir a planilha do experimento em Excel, a qual deve conter o propósito do experimento, os reagentes utilizados e as amostras de plasma.
2. Calcular os volumes dos reagentes e verificar as amostras que serão utilizadas, no intuito de não faltar qualquer reagente ou material no tempo do experimento.
3. Organizar as caixas de ponteiras: as ponteiras a serem utilizadas na pipeta multicanal devem ser organizadas no suporte de acordo com o layout da placa (preencher uma caixa de ponteiras para cada condição de GT que se pretende realizar) facilitando e dinamizando o processo de pipetagem e dispensação dos reagentes na placa, de tal forma que isso ocorra o mais rápido possível para não comprometer a temperatura de 37°C da placa (a temperaturas é crítica);
4. Preparar o tampão HN.

Para preparar 1 litro de HN → Pesar 5,957 g de Hepes e 10,227 g de NaCl. Misturar o Hepes e o NaCl em 1 litro de água destilada. Ajustar o pH para 7,7 (utilizando solução de HCl e NaOH). Este tampão dura em média 2 meses, a não ser que haja crescimento de microrganismos antes. Se isso acontecer, este deve ser desprezado.

5. Preparar o tampão HNBSA

Para preparar o HNBSA, pegar uma proveta de 50 mL e colocar 50 mL de tampão HN. Pesar 250 mg de BSA e adicionar ao tampão HN na proveta. Deixar em torno de 10 minutos para dissolver (dissolve espontaneamente). Pegar uma seringa de plástico de 60 mL, tirar o êmbolo, adaptar um filtro de 0,2 µM à seringa. Encher a seringa com o material a ser filtrado. Colocar o êmbolo e apertá-lo obrigando a filtração do tampão HNBSA. Após a adição do BSA a validade deste tampão é em torno de uma semana, pois pode crescer microrganismos.

Dia do experimento

1. Ligar todos os equipamentos (fluorímetro, computador, banho-maria a 37^oC e o agitador tipo vórtex). Clicar no ícone do software Thrombinoscope e abri-lo.
2. Checar a temperatura do banho-maria que deve estar a 37^oC.
3. Checar se o “dispenser” está dispensando corretamente utilizando H₂O morna (dispensar corretamente significa que o jato dispensado deve estar em linha reta e em feixe único e não inclinado ou com feixes múltiplos). Caso o jato sair inclinado ou com feixes múltiplos, abrir o “dispenser”, tirar a ponteira deste e passar uma agulha muito fina para tirar qualquer obstrução da mesma. Repetir o procedimento inicial para ver se o jato está reto, ou seja, perpendicular ao equipamento. **NÃO INICIAR QUALQUER PROCEDIMENTO ANTES DE FAZER ESSA CHECAGEM, POIS ESTÁ ARRISCANDO A PERDER SEU EXPERIMENTO!!!**

Para checar o “dispenser”:

- Colocar o “dispenser” direcionado para um pequeno béquer vazio (não deixar encostar a ponta do “dispenser” em qualquer lugar). O tubo de aspiração deve estar inserido em um tubo Falcon de 50mL com água MilliQ nova e morna, de preferência (aquecida previamente em BM a 37° C).

- Usando o software Thrombinoscope, clicar em “Instrument” → clicar em “Prime dispenser” → clicar em 5000 µl → clicar em “Prime”.

8. Usando o software *Thrombinoscope*, fazer o layout da placa de 96 wells segundo definição prévia do experimento contido na planilha do Excel (item 1).

Layout da placa

- O software *Thrombinoscope* possui um item denominado “Plate Setup”, onde será possível fazer o *layout* da placa, indicando quais são os *wells* relativos ao plasma teste, *fake* e ao calibrador. Este item possui um desenho de uma placa de 96 *wells*, para que seja adicionada a localização de cada amostra de plasma teste e dos calibradores. Além disso, na tela há um botão vermelho, utilizado para adicionar as amostras de plasma teste e o *fake*, e um botão amarelo, utilizado para adicionar os calibradores. A partir daí, será possível criar um grupo para cada amostra (s) adicionada (s) e seus respectivos calibradores.

- Verificar no “Plate setup” se os seguintes itens estão mostrando os valores adequados de temperatura (*Target T: 37°C*), concentração do calibrador (*TC Act: 670nM*) e volume a ser dispensado (*Disp. vol.: 20µL*).

- Inicialmente, devem ser adicionados os dois *wells* correspondentes ao *Fake* (estes devem ser sempre reservados na placa para evitar erro de pipetagem do Fluca (20µL) pelo “dispenser” nos *wells* subsequentes, sabendo-se que a liberação do volume exato de 20 µL pode não ser ocorrer nos dois primeiros *wells*). Clicar no botão vermelho e, em seguida, nos dois *wells*, onde serão localizados o *Fake*. Em seguida, clicar no botão amarelo para adicionar o *well* correspondente ao calibrador do *Fake*. Por fim, clicar em “Add Group” e nomear esse grupo.

- Em seguida identificar as amostras testes. Para isso, clicar no botão vermelho e, em seguida, no *well* onde a amostra será adicionada. Clicar no botão amarelo para adicionar o calibrador. Em seguida, clicar em “Add Group” para nomear o grupo criado. Preencher um *well* para o calibrador para cada amostra de plasma a ser testada.

- Para conferir se o *layout* da placa está correto basta clicar nos grupos de amostras criados em “Group list” e verificar a localização da amostra teste e do seu calibrador correspondente (a visualização é a alteração da cor do *well* da amostra e simultaneamente do *well* do seu calibrador).

4. Procedimento técnico:

- Tirar da geladeira o tampão HN (preparado anteriormente), o *Fluo-Buffer*, o *Low TF*, *High TF* e o calibrador (tirar a quantidade necessária de cada reagente de acordo com o cálculo feito no dia anterior). O *Low TF*, o *High TF* e o calibrador devem ficar em temperatura ambiente (TA). Colocar o *Fluo-Buffer* no banho-maria a 37°C até o tempo de uso.

- Colocar um tubo Falcon com água MilliQ no banho-maria a 37°C até o tempo de uso.

- Ressuspender o *Low TF*, o *High TF* e o calibrador com 1 mL de água MilliQ. Após adicionar a água MilliQ, esperar 10 minutos e homogeneizar cuidadosamente. Não colocar no vórtex e manter os reagentes em TA. Se sobrar reagentes, fazer alíquotas de 100µL dos mesmos e congelar à -80°C.

- Tirar as amostras de plasma do freezer a -80°C, as quais devem ser descongeladas no banho-maria a 37°C por exatamente 10 minutos. Após o descongelamento agitar em agitador tipo vórtex.

- Adicionar 80 µL de cada plasma nos *wells* da placa (tipo ELISA, com wells com fundo em U) correspondentes às amostras teste e ao calibrador.

- Com o auxílio da pipeta multicanal pipetar 5 µL do HNBSA (volume suficiente de HNBSA já deve estar em uma canaleta e pipetar a partir desse volume) e adicionar em todos os *wells* das amostras teste e dos calibradores.
- Adicionar 20 µL de calibrador nos *wells* correspondentes. Se a quantidade de *wells* de calibradores for grande, utilizar pipeta multicanal (o volume necessário de calibrador deve ser colocado em *wells* de uma outra placa de 96 *wells* (tipo ELISA) para facilitar a pipetagem deste reagente).
- O volume necessário de *Low TF* e/ou *High TF* (cálculo feito no dia anterior de acordo com o *layout* da placa) deve ser colocado também em *wells* de uma outra placa de 96 *wells* (tipo ELISA), para facilitar a pipetagem destes reagentes e a transferência dos mesmos para a placa que será incubada a 37°C, com auxílio de pipeta multicanal.
- Uma vez preenchida a placa com as amostras de plasma a serem testadas e seus respectivos calibradores, pressionar o botão no fluorímetro “Plate out” e colocar a placa no fluorímetro para incubação a 37° C. Após colocar a placa no fluorímetro, no software *Thrombinoscope* clicar em “Start” para iniciar a incubação. Abrirá uma tela “Dispenser preparation”. Clicar em “Next” para iniciar a incubação da placa por exatamente 10 minutos (a tela “Dispenser preparation” mostrará a sequência de “steps” desde a incubação até o preenchimento dos *wells* da placa com o Fluca, pelo “dispenser”. Enquanto a placa é incubada no fluorímetro, preparar o FLUCA. Para isso, retirar o Fluo-Buffer do banho-maria, adicionar o volume de Fluo-Substrate (este fica armazenado em temperatura ambiente e ao abrigo da luz) de acordo com a tabela abaixo e vortexar imediatamente. Envolver o tubo em papel alumínio e manter em banho-maria a 37°C até o tempo do uso, preferencialmente no escuro. Não esquecer de diluir o FLUCA de acordo com a tabela fornecida na bula do kit de FLUCA. Para isso consultar tabela abaixo:

Nº wells	Fluo-Buffer (µl)	Fluo-Substrate (µl)
	1600	
≤ 48	(1 frasco)	40
58	1800	45
68	2000	50
78	2200	55
88	2400	60
96	2600	65

- Após a incubação da placa por 10 minutos, pressionar no fluorímetro “Plate Out”. A placa será ejetada e neste tempo, com auxílio de uma pipeta multicanal, adicionar rapidamente 20 µL do Low TF e/ou High TF (ou outro reagente como “trigger”, de acordo com o propósito do experimento), cujos reagentes já devem estar na outra placa de ELISA à parte, em TA, contendo o volume necessário para o devido preenchimento dos *wells* da placa incubada. Pressionar no fluorímetro “Plate In”.
Obs.: o tempo de adição do Low e/ou High TF deve ser o menor possível para que a placa ainda mantenha a temperatura de 37°C, já que a temperatura é um parâmetro crítico desta reação.

- Em seguida, retirar a água morna que está no banho-maria a 37°C e com esta fazer a lavagem do fluorímetro. Para isso, colocar o tubo de aspiração dentro do tubo Falcon contendo a água aquecida e colocar o *dispenser* dentro de um béquer vazio e clicar em “Next”. A água quente será aspirada e dispensada no béquer vazio (“waste”). Uma vez terminada a lavagem do fluorímetro com água quente, o próprio sistema do aparelho interromperá o procedimento. Retirar o tubo de aspiração do

frasco contendo a água morna e apertar novamente “Next” para coletar no frasco “waste” o restante de água morna que ainda permanece no fluorímetro.

- Em seguida, fazer ambiente no fluorímetro com o FLUCA. Para isso, inserir o tubo de aspiração no tubo contendo o FLUCA e colocar também o *dispenser* dentro do tubo do FLUCA sem tocar o líquido. Clicar em “Next”. O FLUCA será aspirado e devolvido para o mesmo tubo. Uma vez feito o ambiente do sistema do aparelho com o FLUCA, este interromperá o procedimento. Neste tempo, o *dispenser* deve ser introduzido em um pequeno orifício, escrito “M”, no aparelho, enquanto o tubo de aspiração deve ser mantido dentro do reagente FLUCA sem tocar o fundo do tubo.

ATENÇÃO: a ponta do *dispenser* não poderá nunca tocar o fundo ou as paredes do recipiente para que não ocorra dano nesta ponta (extremamente sensível).

- Pressionar “Next”. Nesse tempo, o *dispenser* dispensará 20 µL de FLUCA em cada *well* de acordo com o *layout* da placa, perfazendo um volume final de 125 µL por *well*.

- Após a dispensação deste volume, seguir as instruções do *software*: retirar o *dispenser* do orifício escrito “M” e colocá-lo em um béquer contendo água destilada, enquanto o tubo aspirador deve ser colocado em outro béquer também contendo água. Fechar a tampa do fluorímetro. A leitura da placa será feita por 60 minutos e os perfis de geração de trombina poderão ser observados cineticamente na tela do computador.

- Após os 60 minutos, o aparelho ejetará a placa. Retirar a placa do mesmo e pressionar “Plate in”.

- Salvar o experimento: clicar em “File” → *Export to “xls”* → ao aparecer a tela para salvar, dar nome ao arquivo (por exemplo: HT020331A03 – 23-09-2015) → salvar em “Meus documentos” → pasta Geração de Trombina → clicar em “Salvar”.

ATENÇÃO: salvar antes de fechar o arquivo, pois a leitura não fica registrada no software.

- Fazer a limpeza do fluorímetro da seguinte maneira: Clicar em “Instrument” → clicar em “Prime dispenser” → clicar em 5000 µl. O tubo de aspiração já deve estar em um tubo contendo água e o *dispenser* em um béquer vazio onde será dispensado o produto da limpeza (lixo). Clicar em “Prime”. Esse procedimento deve ser efetuado duas vezes para limpar bem o fluorímetro. Para isso clicar em “Prime” outra vez. Esperar até que se conclua a limpeza. Antes de fechar o fluorímetro, colocar o tubo de aspiração em um pequeno recipiente contendo água destilada e o *dispenser* em outro recipiente também com água destilada.

Exemplo da planilha de um experimento

Para realização desse experimento, foi utilizado um *pool* de PPP de jovens saudáveis e foram realizadas seis replicatas com o *Low TF* e seis replicatas com o *High TF* (Total de 12 *wells*).

Objetivo: Fazer o teste de GT em um pool de plasma usando *Low TF* e *High TF*

Tampão HNBSA: HN + 5 mg/ml de BSA.

Calibrador: Retirar o frasco da geladeira e reconstituir o reagente com 1 ml de água deionizada. Deixar em TA.

Proteínas

Low TF e High TF → Retirar o frasco da geladeira e reconstituir o reagente com 1 ml de água deionizada. Deixar em TA.

Substrato (FLUCA)

Fluo-Buffer: retirar um frasco da geladeira e colocar em banho-maria a 37°C. Bem próximo ao uso, adicionar 40 µl de Fluo-Substrate e vortexar imediatamente. Envolver o tubo em papel alumínio e manter em banho-maria a 37°C até o tempo do uso.

Amostra

MIX (15 vezes)*

Set up	80 μ L Pool PPP	1440 μ L Pool PPP
	5 μ L HNBSA	90 μ L HNBSA
Após 10 min	20 μ L High TF ou Low TF 20 μ L FLUCA	Vol total- 1530 μ L

O mix deve ser feito sempre com um volume extra de plasma e demais reagentes para possibilitar a pipetagem de 85 μ L para cada well (vide *set up* da placa a seguir):

Calibrador	
Set up	80 μ L Pool PPP 20 μ L calibrador 5 μ L HNBSA
Após 10 min	20 μ L FLUCA

Layout da placa

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>
<i>12</i>											
A	Fake	High TF	Low TF								
B	Fake	High TF	Low TF								
C	Calibrador	High TF	Low TF								
D		High TF	Low TF								
E		High TF	Low TF								
F		High TF	Low TF								
G		Calibrador**									

** Reservar um volume extra de plasma suficiente para o calibrador. **Para cada amostra de plasma, um calibrador deve ser feito.**

Grupos

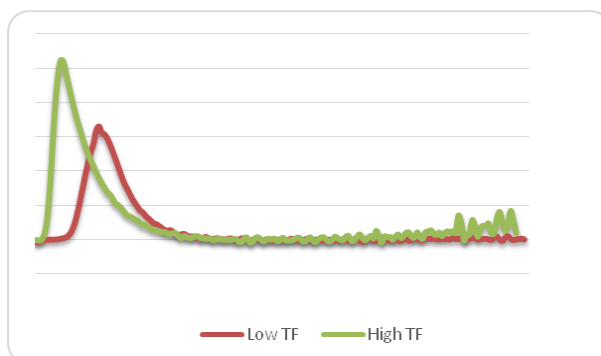
Fake → wells A1, B1 e C1

Replicatas com High TF → wells A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2

Replicatas com Low TF → wells A3, B3, C3, D3, E3, F3

Após 60 min foram obtidos os valores de concentração de trombina ao longo do tempo para cada *well* e o gráfico Trombina (nM) x Tempo (min) com os seguintes parâmetros: *Lag time*, *Peak Height*, *ETP* e *Time to peak*.

	Low TF	High TF
Lagtime (min)	5,18	1,62
ETP (nM•min)	1871,05	2727
Peak (nM)	322,28	527,84
ttPeak (min)	8,41	3,63



Preparo da solução estoque da Proteína C ativada (PCA)

1. Dados fornecidos pelo fabricante para *Human Activated Protein C (Haematologic Technologies Inc., código HCAPC-0080)*:

Molecular weight: 56200

Concentration: 3,2 mg/mL

Recommended storage: -20°C

Amount shipped: 1 x 0,05mg

2.

Massa		molecular	=			Cálculo:
Concentração	=	3.2	mg/mL	=	3200	56200 g/L
Quantidade	de	PCA	no	frasco	=	50 μg

Então:

56200	g/L	1		M
56200	mg/mL.....		1		M
56200000	ug/mL.....		1		M

56,2μg/mL 1 uM

Dividindo 3200 μg/mL / 50 μg = **64μL** (volume contido no frasco *ependorf* do fabricante).

É possível determinar a molaridade do volume de 64μL da seguinte forma:

56,2 ug/mL	1 uM
3200 μg/mL.....		x
x=56,9μM		

Então a concentração, em termos de molaridade, para o volume de 64 μL que veio diretamente do fabricante é **56.9 μM**.

Adicionar um volume do tampão HN para o frasco do fabricante (que contém 50 μg em 64μL) suficiente para perfazer um volume final de 1 mL, então uma **solução estoque de PCA aproximadamente de 1 uM será obtida.**

Em outras palavras, adicionar ao conteúdo do frasco eppendorf o volume de 936 µL de tampão HN, perfazendo um total de 1 mL (**solução estoque, cuja concentração é aproximadamente 1 uM**).

Aliquotar a solução estoque de PCA 1 uM acima em 10 alíquotas de 100 µL e guardar em freezer a -80°C.

Na hora do uso tirar uma alíquota de 100 µL do freezer, descongelar e diluir 5x com tampão HNBSA (solução de trabalho) perfazendo um volume total de 500 µL, cuja concentração final será de **200 nM**.

Usar **5 µL** da solução de trabalho de PCA em cada *well* da placa, cujo conteúdo será:

80 µL de plasma paciente/controle

20 µL de High TF

5 µL de PCA

20 µL de Fluca

125 µL = volume total do *well*

Aplicando a fórmula $V_i \times C_i = V_f \times C_f$, teremos:

$5 \mu\text{L} \times 200 \text{ nM} = 125 \mu\text{L} \times C_f$

$C_f = 1000 / 125 = 8 \text{ nM}$

Obs.: Para concentrações finais menores, diluir a solução de trabalho de PCA.

Preparo da solução estoque de *Corn Trypsin inhibitor* (CTI)

1. Dados fornecidos pelo fabricante para Corn Trypsin Inhibitor (**Haematologic Technologies Inc.**, código CTI-01):

Molecular weight: 12500

Concentration: 2,0 mg/mL

Recommended storage: At or below -70°C

Amount shipped: 1 x 1,0 mg

2.

Massa molecular = 12500 g/L Cálculo:

Concentração inicial = 2,0 mg/mL = 2000 µg/mL

Concentração final = 30 µg/mL

Quantidade de PCA no frasco = 1000µg

Então:

12500 g/L 1 M

12500 mg/mL..... 1 M

12500000 ug/mL..... 1 M

12,5 ug/mL 1 uM

Cálculo da concentração inicial (C_i) do CTI em µM:

12,5 µg/mL _____ 1 µM

2000 µg/mL _____ X

X = C_i = 160 µM

Cálculo da concentração final (C_f) do CTI em µM:

12,5 µg/mL _____ 1 µM

30 µg/mL _____ X

X = C_f = 2,4 µM

Cálculo do volume de CTI que deve ser adicionado em cada well:

$C_i \times V_i = C_f \times V_f$

160 µM x V_i = 2,4 µM x 125 µL

V_i = 1,875 µL → 2,0 µL de CTI

Portanto, deve-se adicionar em cada well:

80 µL de plasma paciente/controle

2,0 µL de CTI

3,0 µL de HNBSA

20 µL de Low/High TF

20 µL de Fluca

Volume total do *well* (V_f) → 125 µL

Estudo do sistema da anticoagulação natural por meio da adição ou não da PCA aos *wells*.

Para estudar o sistema da anticoagulação natural por meio do teste de GT, deve-se correr *wells* com e sem 5µL de PCA. A PCA deve ser adicionada imediatamente após a adição dos 20µL de High TF. A concentração de PCA utilizada deverá ser determinada em pool de plasmas “controle” para cada projeto. A concentração de PCA que deverá ser utilizada será aquela capaz de inibir cerca de 90% da geração de trombina, mantendo-se apenas 10% da atividade residual. Veja exemplo abaixo:

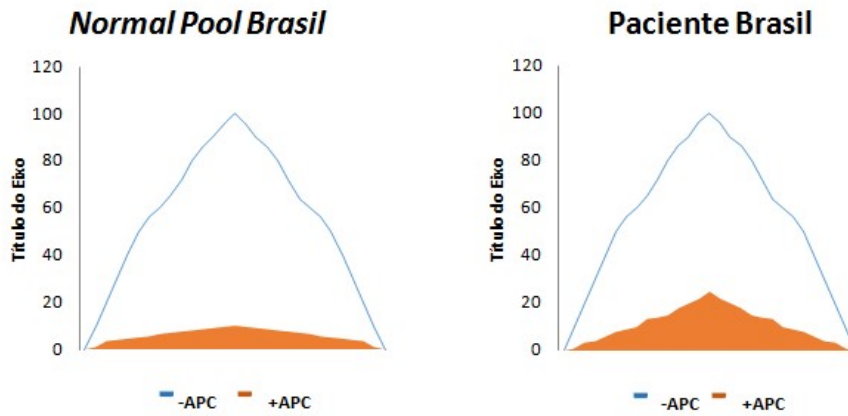
Set up		80 µL Pool PPP
Após min	10	20 µL High TF 5 µL PCA 20 µL FLUCA

Obs.: Uma vez obtidos os resultados de GT com e sem PCA, aplicar a fórmula:

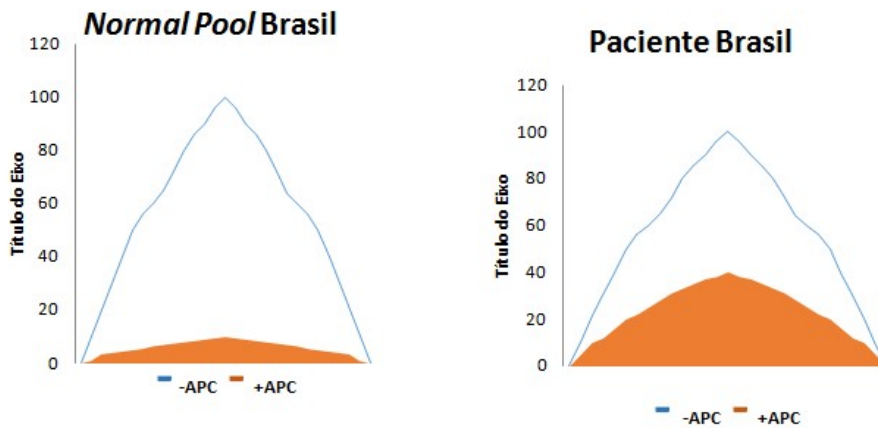
$$nAPC_{sr} = \frac{ETP+PCA / ETP-PCA \text{ (paciente)}}{ETP+PCA / ETP-PCA \text{ (Controle)}}$$

nAPC_{sr} vai de 0 (nenhuma resistência) a 10 (resistência total).

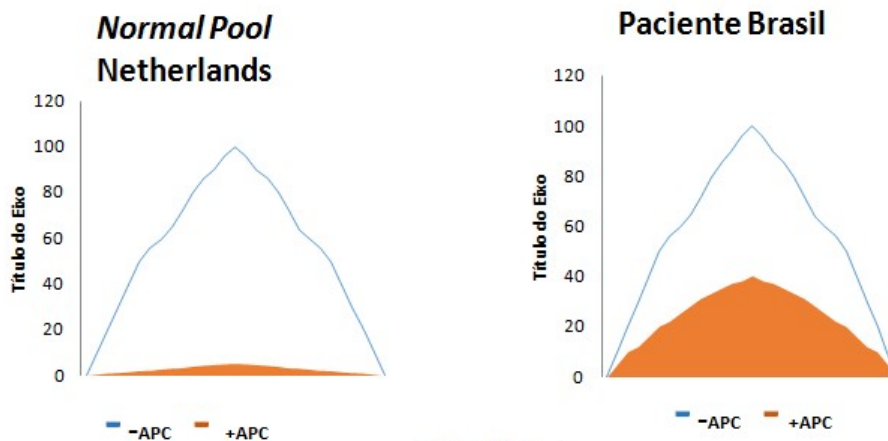
Veja abaixo porque é importante estabelecer qual a concentração de PCA que será capaz de inibir 90% da GT, mantendo-se apenas 10% da atividade residual. Uma vez determinada esta concentração ideal em um pool de plasma controle (em outras palavras, seu grupo controle), usar esta mesma concentração de PCA para as amostras dos pacientes de seu projeto de pesquisa.



$$n = APCsr = \frac{\frac{ETP + APC(Pac)}{ETP - APC}}{\frac{ETP + APC(NP)}{ETP - APC}} = \frac{0,25}{0,1} = 2,5$$



$$n = APCsr = \frac{\frac{ETP + APC(Pac)}{ETP - APC}}{\frac{ETP + APC(NP)}{ETP - APC}} = \frac{0,4}{0,1} = 4,0$$



$$n = APCsr = \frac{\frac{ETP + APC(Pac)}{ETP - APC}}{\frac{ETP + APC(NP)}{ETP - APC}} = \frac{0,4}{0,05} = 8,0$$

As três figuras acima ilustram a necessidade de se utilizar um *pool* controle de acordo com as características das amostras do projeto de pesquisa. Dessa forma, pode-se observar que um *pool* de amostras de indivíduos controles brasileiros

forneceu uma nAPC sr de 4,0; enquanto um *pool* de plasmas da Holanda (Netherlands) forneceu uma nAPCsr de 8,0. Dessa forma, a concentração de PCA deve ser determinada em um *pool* de plasma “controle” de acordo com as amostras do projeto de pesquisa. Ex.: Se a concentração de PCA para inibir 90% da atividade de geração de trombina de um *pool* de plasmas normais (controle) for 6 nM, então esta mesma concentração terá que ser usada para inibir todas as amostras dos pacientes, para em seguida, ser calculado o nAPCsr.

Ao pipetar 5 μL de PCA (solução de trabalho, cuja concentração é de 200nM) para um well que terá volume total de 125 μL , a concentração final de PCA será de 8nM. Para fazer a titulação, usar para os *wells* concentrações finais de 8, 6, 4, 2, 1 e 0, fazendo as diluições de forma apropriada a partir da solução de trabalho (200nM, item 8.0).

Observações importantes de caráter prático, antes de iniciar os testes de geração de trombina:

- a) Treinar pipetagem com a pipeta automática multicanal para verificar se todos os canais estão aspirando e dispensando adequadamente;
- b) Não esquecer de fazer o cálculo do volume de cada reagente e do plasma a ser testado para tirar o volume adequado do *freezer* (ou da geladeira), sem que ocorra falta ou sobra dos mesmos;
- c) Os reagentes *Low e High TF*, e outros reagentes tais como PCA devem ser mantidos a temperatura ambiente;
- d) Ter disponível e à mão placas de 96 wells (fundo em V) para facilitar a pipetagem, com pipeta multicanal, de pequenos volumes tais com 5 μL , 20 μL e outros;
- e) Ao usar uma pipeta multicanal para pipetar diferentes reagentes, não se esquecer de mudar o volume a ser pipetado, no caso de volume diferente.
- f) Todo o POP foi feito para acrescentar CTI à reação. No entanto, a comparação entre os resultados usando ou não CTI não mostrou diferença significativa. Dessa forma, as reações estão sendo realizadas sem adição de CTI.
- g) Não esquecer que o volume final de cada *well* deve ser exatamente 125 μL .

Comitê de Ética



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 274 / 2015, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE FÁRMACOS E SORO ANTIOFÍDICO NA PREVENÇÃO DE DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS NO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL BOTRÓPICO”, que tem como responsável MARILIA MARTINS MELO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 29/09/2015. Este certificado expira-se em 29/09/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 274 / 2015, related to the Project entitled “Assessment of drug association and antivenom in the snake disorders hemostatics prevention in the experimental envenomation bothropic”, under the supervision of MARILIA MARTINS MELO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 29/09/2015. This certificates expires in 29/09/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMGBelo Horizonte, 29/09/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br