

Lilian de Paula Gonçalves Reis

**Estudo clínico do envenenamento experimental por *Micrurus surinamensis* em cobaias (*Cavia porcellus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Medicina e Cirurgia Veterinárias. Orientadora: Marília Martins Melo. Co-orientador: Benito Soto Blanco

**Belo Horizonte- MG  
Escola de Veterinária - UFMG  
2017**

R375e Reis, Lilian de Paula Gonçalves, 1988-  
Estudo clínico do envenenamento experimental por *Micrurus surinamensis* em cobaias  
(*Cavia porcellus*) / Lilian de Paula Gonçalves Reis. – 2017.  
98 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo

Co-orientador: Benito Soto Blanco

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Porquinho-da-índia – Teses. 2. Envenenamento – Teses. 3. *Micrurus* – Veneno – Teses.  
4. Toxicologia veterinária – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Soto-Blanco, Benito.  
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 615.9

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LILIAN DE PAULA GONÇALVES REIS**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Toxicologia.

Aprovada em 05 de Janeiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

*Marília W. Melo*

Prof<sup>ª</sup>. Marília Martins Melo  
Presidente - Orientador

*Clara Guerra Duarte*

Prof<sup>ª</sup>. Clara Guerra Duarte  
Bioquímica e Imunologia - FUNED

*Marina*

Prof<sup>ª</sup>. Marina Guimarães Ferreira  
Toxicologia Veterinária - UFLA

*“Tenha sempre bons pensamentos  
porque os seus pensamentos se transformam em suas palavras  
Tenha boas palavras  
porque as suas palavras se transformam em suas ações  
Tenha boas ações  
porque as suas ações se transformam em seus hábitos.  
Tenha bons hábitos  
porque os seus hábitos se transformam em seus valores  
Tenha bons valores  
porque os seus valores se transformam no seu próprio destino.”*

Mahatma Gandhi

## Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas conquistas, por me guiar e me permitir lutar pelos meus sonhos.

Agradeço a minha mãe Maria que é para mim um exemplo de mulher, forte e guerreira, que esteve ao meu lado para ouvir e aconselhar. Agradeço ao meu pai Ademar e minhas irmãs, Eliane e Aline pelo amparo, sempre!

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Marília Martins Melo pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Toxicologia, por todos os ensinamentos, apoio e paciência ao longo de todos esses anos.

Quero agradecer também ao Prof. Dr. Benito Soto Blanco pela constante contribuição ao longo do projeto, pela realização da análise estatística e pelos momentos divertidos no laboratório.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui e à Dra. Clara Guerra Duarte pela doação do veneno de *Micrurus surinamensis*, disponibilidade e auxílio no delineamento experimental.

Agradeço ao Prof. Dr. Felipe Pierezan pela leitura das lâminas e pelos valiosos ensinamentos.

Agradeço a Dra. Maira Souza Oliveira pelo grande auxílio na interpretação dos eletrocardiogramas e pelos seus brilhantes ensinamentos.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Toxicologia: Gabriella, Jessica, Heloisa, Luisa Cangussu, Ana Flávia, Stephanie e Warley, por toda assistência. Em especial quero agradecer a Marina Ferreira, Tati Fiúza e Clara Rojo, sem vocês não conseguiria executar esse projeto, obrigada pelo suporte, ajuda e amizade!

Aos animais que foram utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

Agradeço ao Centro de Microscopia da UFMG pelo processamento das amostras.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## Sumário

LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	13
RESUMO .....	16
ABSTRACT .....	17
1 - INTRODUÇÃO.....	18
2 – OBJETIVOS .....	20
2.1 - Geral.....	20
2.2 - Específicos.....	20
3 - REVISÃO DE LITERATURA .....	21
3.1 - Família Elapidae .....	21
3.2 - <i>Micrurus sp.</i> .....	21
3.2.1 – Veneno .....	22
3.3 – <i>Micrurus surinamensis</i> .....	24
3.4- Sistema nervoso e ação neurotóxica do veneno das cobras-corais .....	26
3.5- Musculatura esquelética e ação miotóxica do veneno das cobras-corais .....	30
3.6 – Funcionamento cardíaco e ação cardiotoxica do veneno das cobras-corais .....	32
3.7 - Efeitos clínicos.....	35
3.8 –Alterações sanguíneas.....	35
3.8.1– Hemostasia e ação hemolítica e hemorrágica do veneno das cobras-corais.....	35
3.8.2. Hematologia .....	38
3.8.3 - Bioquímica sérica.....	38
3.8.3.1 - Proteinograma .....	38
3.9 – Tratamento .....	39
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 – Veneno.....	41
4.2 - Animais .....	41
4.3 - Grupos experimentais.....	42
4.4 - Exame físico .....	42
4.5 – Eletrocardiograma .....	44

4.6 - Exames laboratoriais .....	44
4.7 – Eutanásia.....	45
4.8 – Alterações macro e microscópicas .....	45
4.9 - Análises Estatísticas .....	45
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 - Exame físico .....	46
5.1.1 – Geral .....	46
5.1.2 - Exame neurológico.....	47
5.2 – Eletrocardiograma .....	52
5.3 -Alterações laboratoriais.....	61
5.3.1 – Eritrograma .....	61
5.3.2 – Leucograma.....	63
5.3.3 – Coagulação.....	65
5.3.3.1 - Plaquetas .....	65
5.3.3.2. TTPa, TP e fibrinogênio.....	66
5.4 - Bioquímica sanguínea .....	68
5.4.1 - Avaliação muscular .....	69
5.4.2 - Avaliação hepática .....	72
5.4.3 - Avaliação renal .....	73
5.4.4 – Proteinograma fracionado .....	78
5.5 - Avaliação Macroscópica e Histológica .....	80
5.5.1. Microscopia óptica .....	80
5.5.2 - Microscopia eletrônica.....	84
6 – CONCLUSÕES .....	87
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
8 - ANEXO.....	98
8.1 – Certificado do CEUA .....	98

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1.	Exame clínico neurológico em cobaias.	43
Tabela 2.	Resultados médios e desvio padrão das avaliações clínicas correspondentes à temperatura retal (TR - °C), frequência respiratória (FR - mpm) e frequência cardíaca (FC - bpm) nos animais dos grupos veneno e controle.	46
Tabela 3.	Pontuação neurológica por animal e valor médio dos animais inoculados com veneno de <i>M. surinamensis</i> , nos diferentes tempos de avaliação (Tempo zero, Tempo 1, Tempo 2 e Tempo Final - TF).	48
Tabela 4.	Frequência de alterações ao exame neurológico de cobaias do grupo veneno.	48
Tabela 5.	Média e desvio padrão de medidas das ondas P (ms e mV), R (mV) e T (mV); intervalos PR (ms), QT (ms); complexo QRS (ms) e frequência cardíaca (bpm) obtidos a partir do exame eletrocardiográfico de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h (Tempo Final) após a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	52
Tabela 6.	Alterações eletrocardiográficas encontradas em cobaias, antes (Tempo zero) e em 2h (Tempo Final) após a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	53
Tabela 7.	Valores médios e desvio padrão do eritrograma de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	62
Tabela 8.	Valores hematológicos de referência para cobaias.	62
Tabela 9.	Valores médios e desvio padrão do leucograma de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	64
Tabela 10.	Valores de referência do leucograma para cobaias.	64
Tabela 11.	Valores médios e desvio padrão do número de plaquetas/ $\mu$ l de sangue de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	66
Tabela 12.	Valores médios e desvio padrão de TTPa (seg), TP (seg) e concentração de fibrinogênio (mg/dl) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	67
Tabela 13.	Valores séricos médios em U/L e desvio padrão de CK, CK-MB, AST, LDH, ALT, GGT e FA de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	69



Tabela 14.	Valores séricos médios e desvio padrão dos metabólitos ureia (mg/dl), creatinina (mg/dl), e ácido úrico (mg/dl) e dos eletrólitos, cálcio (mg/dl), fósforo (mg/dl), potássio (mmol/L) e sódio (mmol/L) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	74
Tabela 15.	Valores médios e desvio padrão de proteína total (g/dl) e fracionada (g/dl) mensuradas no soro de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	78

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1.	Dentição proteróglifa presente nas serpentes do gênero <i>Micrurus</i> , com ilustração do sulco por onde passa o veneno para a inoculação na presa.	21
Figura 2.	Distribuição das espécies de <i>Micrurus</i> de acordo com a predominância de PLA <sub>2</sub> (roxo) ou 3FTx (laranja) na composição do veneno, determinada por análise proteômica.	23
Figura 3.	Regiões da América do Sul (a) e, em detalhe, do Brasil (b) onde são encontradas as serpentes do gênero <i>M. surinamensis</i> .	24
Figura 4.	<i>M. surinamensis</i> , com detalhe da cabeça de cor vermelha e escamas de contornos negros.	25
Figura 5.	Divisão do SNC. 1- prosencéfalo; 2 – cerebelo; 3 – tronco encefálico; 4 – medula espinhal; 5 - intumescência braquial; 6 - intumescência lombosacral. As intumescências formam os nervos espinhais que fazem parte do SNP.	26
Figura 6.	Representação da transmissão impulso pelo sistema nervoso autônomo.	28
Figura 7.	Fenda sináptica onde ocorre a transmissão do impulso nervoso para a contração muscular. O potencial de ação (1); influxo de cálcio (2); adesão das vesículas sinápticas na membrana no axônio e liberação de acetilcolina (Ach) na fenda sináptica (3); receptores de Ach bloqueados na membrana pós-sináptica (4).	29
Figura 8.	Estrutura morfológica da fibra muscular esquelética.	31
Figura 9.	Esquema do sistema de condução cardíaco. SA – nodo sinoatrial; VD – ventrículo direito; AV – nodo atrioventricular; AE – átrio esquerdo.	33
Figura 10.	Ilustração eletrocardiográfica representando os principais parâmetros de análise e os valores que correspondem a cada medida da grade do traçado. Derivação II e velocidade de 50 mm/s. Os intervalos de tempo (segundos) são medidos da esquerda para a direita e as amplitudes (milivolts) são medidas como positiva ou negativas, a partir da linha base.	34
Figura 11.	Modelo clássico da cascata de coagulação.	36
Figura 12.	Evolução clínica dos animais envenenados. Na foto da esquerda (a), animal extremamente prostrado. Foto da direita (b): animal em decúbito lateral esquerdo com paralisia total, oftalmoplegia e dificuldade respiratória.	50
Figura 13.	Animal do grupo veneno com paralisia total e espasticidade dos membros anteriores e secreção nasal.	50
Figuras 14.	Cobaia do grupo veneno sendo submetido ao exame eletrocardiográfico, duas horas após a injeção de veneno de <i>M. surinamensis</i> .	54
Figura 15.	Traçado eletrocardiográfico normal de cobaia (animal 6) do grupo veneno	55

	(Tempo zero). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.	
Figura 16.	Arritmia sinusal (azul), parada sinusal (verde), escape juncional (seta marrom), extrassístole supraventricular (seta vermelha), apresentadas pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final de avaliação (2h após o envenenamento). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.	56
Figura 17.	Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) apresentado pelo animal 1 do grupo veneno após 1h e 30min após a injeção do veneno de <i>M. surinamensis</i> . Derivação D2, 50 mm/s, 2N.	57
Figura 18.	BAV 1° (seta azul), extrassístole supraventricular (seta vermelha) apresentada pelo animal 2 do grupo veneno ao tempo final de avaliação (2h após o envenenamento). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.	57
Figura 19.	BAV 2° apresentado pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final (2h) após injeção do veneno. São visualizadas ondas P isoladas, sem o complexo QRS (setas amarelas). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.	58
Figura 20 -	BAV 3° apresentado pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final (2h) após inoculação do veneno. As setas mostram ondas P sem conexão com complexos QRS, que nestes casos apresentam formato bizarro. Derivação D2, 25 mm/s, 2N.	58
Figura 21.	Evolução de um BAV de 2° (espaço em amarelo) para um BAV 3° (espaço em roxo), apresentado pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final (2h) após inoculação do veneno. Derivação D2, 25 mm/s, 2N.	59
Figura 22.	Valores médios de CK (UI/L) (a) e CK-MB (UI/L) (b) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	70
Figura 23.	Valores médios de AST (UI/L) (a) e LDH (UI/L) (b) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo final) a injeção de veneno <i>Micrurus surinamensis</i> (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).	71
Figura 24.	Gel de agarose demonstrando o fracionamento eletroforético das proteínas séricas de cobaias (grupo controle). Notar a formação de seis bandas distintas.	79
Figura 25.	Perfil eletroforético demonstrando as seis frações proteicas do soro de cobaias (animal do grupo controle).	79
Figura 26.	Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 2) após injeção de veneno da serpente <i>Micrurus surinamensis</i> apresentando fibras musculares normais (seta verde), fibras com degeneração hialina (seta azul) e necrose (setas vermelhas). Coloração HE, Bars = 100µm.	81
Figura 27.	Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 4) após injeção de veneno da serpente <i>Micrurus surinamensis</i> apresentando fibras musculares com necrose caracterizada por segmentação e floclulação do sarcoplasma com múltiplos vacúolos, perda dos limites celulares (seta	81

	vermelha) e extravasamento de hemácias no endomísio (hemorragia) (seta branca). Coloração HE, Bars = 100µm.	
Figura 28.	Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 2) após injeção de veneno da serpente <i>Micrurus surinamensis</i> mostrando a distribuição do veneno marcado por áreas de fibras com degeneração hialina (seta azul) e necrose (seta vermelha) miosite heterofílica (seta laranja) na musculatura esquelética. Coloração HE, Bars = 200µm.	82
Figura 29.	Secção histológica de tecido muscular estriado cardíaco de cobaia (animal 6) após injeção de veneno da serpente <i>Micrurus surinamensis</i> apresentando edema multifocal discreto (setas amarelas) e fibras musculares cardíacas normais (seta branca). Coloração HE, Bars = 100µm.	83
Figura 30.	Secção histológica de tecido muscular estriado cardíaco e fragmentos de músculo papilar de cobaia (animal 6) após injeção de veneno da serpente <i>Micrurus surinamensis</i> mostrando agregados de heterófilos, eritrócitos e fibrina (seta azul). Coloração HE, Bars = 100µm.	83
Figura 31.	Secção histológica de tecido muscular esquelético normal (animal 8 do grupo controle) (a) e após injeção de veneno de serpente <i>Micrurus surinamensis</i> (animal 2) (b) em visão microestrutural a 500nm mostrando perda de continuidade e grandes espaços entre as fibras. Em detalhe, uma mitocôndria com vacuolizações.	84
Figura 32.	Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 2) após injeção de veneno da serpente <i>Micrurus surinamensis</i> , mostrando perda de continuidade, grandes espaços entre as fibras e em detalhe, uma mitocôndria com vacuolizações em visão microestrutural a 500nm.	85
Figura 33.	Secção histológica de tecido muscular cardíaco normal (animal 7 do grupo controle) (a) e após injeção da veneno de serpente <i>Micrurus surinamensis</i> (animal 6) (b) mostrando as perdas de continuidade das fibras musculares, em visão microestrutural a 500nm.	85
Figura 34.	Secção histológica de tecido muscular cardíaco de cobaia (animal 6) após injeção de veneno da serpente <i>Micrurus surinamensis</i> em visão microestrutural a 500nm mostrando as perdas de continuidade das fibras musculares.	86

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

3FTx	<i>Three finger toxin</i>
A/G	Relação albumina/globulina
Ach	Acetilcolina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AV	Nodo atrioventricular
BAV	Bloqueios atrioventriculares
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CK	Cretina quinase
CK-MB	Creatina quinase isoenzima MB
Com	Conotoxinas
Crisp	Proteína secretora rica em cisteína
CTL	Lectinas tipo C
ECC	Eletrocardiograma
FA	Fosfatase alcalina
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
GGT	Gama-glutamilttransferase
GPx	Glutathiona peroxidase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HGB	Hemoglobina
Hya	Hialuronidase
IM	Intramuscular

IP	Intraperitoneal
Kun	Inibidor de serinoprotease do tipo Kunitz
LAO	Aminoácido oxidase
LDH	Lactato desidrogenase
Lip	Lípase A de ácido lisossomal
MP	Metaloproteases
Ms	<i>M. Surinamensis</i>
NGF	Fator de crescimento nervoso
NMG	Glicoproteína de membrana neuronal
NMI	Neurônio motor superior
NMS	Neurônio motor superior
Nuc	Nucleotidase
PDE	Fosfodiesterases
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipases A <sub>2</sub>
PLB	Fosfolipase B
PLT	Plaquetas
RBC	Número de hemácias
RDW	Amplitude de distribuição de hemácias
AS	Nodo sinoatrial
SAN	Proteínas inibidoras de canais de sódio
SARA	Sistema ativador reticular ascendente
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Serinoproteases
SSC	Proteínas inibidoras de canais de cloro

TP	Tempo de protrombina
TR	Temperatura retal
TTPa	Tempo de Tromboplastina parcial ativada
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular

---

## RESUMO

*Micrurus surinamensis* é uma espécie serpente peçonhenta encontrada na América do Sul, região da Amazônia, conhecida popularmente como coral verdadeira ou cobra-coral. Esta serpente, que difere das demais principalmente por seu hábito semi-aquático e alimentação baseada em peixes, possui veneno pouco estudado, especialmente em relação aos seus efeitos em mamíferos. Acidentes envolvendo corais verdadeiras são sempre graves pela composição do veneno que possuem, tais como toxinas de estrutura *three finger toxin* (3FTx) e fosfolipases (PLA<sub>2</sub>) em diferentes proporções. Não existem estudos que retratam o quadro clínico neurológico, os efeitos cardíacos, as alterações sanguíneas e as lesões microscópicas que podem ser provocadas pela peçonha de *M. surinamensis*. Desse modo, esta pesquisa teve como objetivo a avaliação de cobaias (*Cavia porcellus*) envenenadas experimentalmente com veneno da serpente *M. surinamensis*, enfatizando os sistemas nervoso e cardíaco (eletrocardiográfico), além da avaliação de exames laboratoriais sanguíneos e teciduais (microscopia óptica e eletrônica). Para tal, foram utilizados 12 animais machos distribuídos em dois grupos (n=6), denominados grupo veneno e grupo controle. Cada animal do grupo veneno recebeu 0,75 µg/g de peso vivo de veneno de *M. surinamensis* diluídos em 0,2 ml de PBS/BSA, injetado via intramuscular (IM). O grupo controle, que serviu como testemunha, recebeu 0,2 ml de PBS/BSA via IM. Os exames, físico geral e especificamente neurológico, foram realizados antes (Tempo zero – T0) e após a inoculação do veneno ou PBS/BSA aos 30 minutos (Tempo 1 - T1), uma hora (Tempo 2 - T2) e duas horas (Tempo Final – TF), aproximadamente. Eletrocardiogramas e exames hematológicos foram realizados nos tempos T0 e TF. Após 2h do envenenamento (TF), os animais que não foram a óbito foram eutanasiados, realizadas necropsia e coleta de órgãos para análise microscópica. Os animais que receberam veneno de *M. surinamensis* apresentaram alterações neurológicas com comprometimento do sistema nervoso central, periférico e autônomo, marcados por dificuldade respiratória progressiva, alterações motoras e no estado mental, quadriplegia flácida, paralisia muscular total e morte. O eletrocardiograma revelou graves alterações arrítmicas, como bloqueios atrioventriculares de 1º, 2º e 3º graus, extrassístoles supra e ventricular. No exame hematológico, o leucograma mostrou aumento na contagem de leucócitos totais causado especificamente por aumento de heterófilos e monócitos, além da diminuição de linfócitos. Os exames bioquímicos séricos revelaram aumento significativo das enzimas creatina quinase e sua fração MB, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase indicando lesão muscular esquelética e cardíaca. Na microscopia óptica e eletrônica foi visualizada necrose no músculo esquelético em dois animais que receberam veneno de *M. surinamensis*, todavia, ruptura das fibras musculares esqueléticas e cardíacas, somente foram visualizadas na microscopia eletrônica. Conclui-se que, o veneno de *M. surinamensis* em cobaias possui atividade neurotóxica e miotóxica super-aguda (até 2h) capaz de causar graves alterações neurológicas e elétricas cardíacas, culminando com o óbito dos animais.

**Palavras chave:** *Micrurus surinamensis*, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, miotoxicidade, arritmias, cobaias.



## ABSTRACT

*Micrurus surinamensis* is a species of poisonous snake found in South America, in the Amazon region and popularly known as true coral or coral snake. This serpent differs from the others mainly due to its semi-aquatic nature and fish-based feeding and there is a lack of studies on its venom especially in relation to its effects on mammals. Accidents involving corals are always severe because of the composition of its venom, which has *three finger toxins (3FTx)* and phospholipases (PLA<sub>2</sub>) in different proportions. There are no studies involving the neurological clinical condition, the cardiac effects, the blood alterations and the microscopic lesions that may be caused by the venom of *M. surinamensis*. Thus, the aim of this study was to evaluate guinea pigs (*Cavia porcellus*) experimentally poisoned with *M. surinamensis* venom, emphasizing the nervous and the cardiac (electrocardiographic) systems, in addition to evaluating blood tests and tissue exams (optical and electron microscopy). In order to perform the trial, twelve male animals were randomly divided into two groups (n = 6): control group and venom group. Each animal in the venom group received 0.75 µg/g of *M. surinamensis* venom diluted in 0.2 ml PBS / BSA, inoculated intramuscularly (IM). The control group received 0.2 ml of PSA / BSA intramuscularly (IM). All animals underwent general physical examination, more specifically neurological exam, which was performed prior to venom or PBS/BSA inoculation (Time zero -T0), 30 minutes after inoculation (Time 1 - T1), one hour after inoculation (Time 2 - T2) and approximately two hours after inoculation (Final Time - TF). Electrocardiogram and hematological tests were performed at T0 and TF. The animals *which did not die* two hours after the poisoning (TF), were euthanized and their corpses underwent necropsy and organ collection for microscopic analysis. The animals that received *M. surinamensis* venom presented neurological alterations with central, peripheral and autonomic nervous system involvement, marked by progressive respiratory difficulty, motor and mental state alterations, flaccid quadriplegia, total muscle paralysis and death. The electrocardiogram revealed severe arrhythmic alterations, such as 1st, 2nd and 3rd degree atrioventricular block, supra and ventricular extrasystoles. The leukogram showed an increase in total leukocytes count, specifically due to an increase in heterophils and monocytes, in addition to a decrease in lymphocytes. Serum biochemistry revealed a significant increase in creatine kinase enzyme and its MB fraction, aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase, indicating skeletal and cardiac muscle injury. Optical microscopy and transmission electron microscopy showed skeletal muscle necrosis in two animals of the venom group, however, rupture of skeletal and cardiac muscle fibers were observed only in electron microscopy. In conclusion, the *M. surinamensis* venom has neurotoxic and super-acute myotoxic activity (2h) in guinea pigs and is capable of causing severe neurological and cardiac electrical changes culminating in the death of the animals.

**Keywords:** *Micrurus surinamensis*, neurotoxic, cardiac electrical changes, myotoxic, arrhythmic alterations, Guinea pig.

## 1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) registrou 24.467 acidentes ofídicos em 2015, com uma taxa de incidência de 13,3 casos para cada 100.000 habitantes e 107 óbitos (taxa de letalidade de 0,43%). Os três estados com maiores números de acidentes foram Pará (18,4%), Minas Gerais (10,3%) e Bahia (9,8%). A região onde ocorreu a maioria dos acidentes por serpentes foi a Norte (33,5%), seguida das regiões Nordeste (27,3%), Sudeste (21,2%), Centro-Oeste (9,2%) e Sul (8,8%). O número de acidentes por gênero de serpente, neste mesmo ano foi: 13.490 de *Bothrops*; 1.438 de *Crotalus*; 529 de *Lachesis*; 139 de *Micrurus* e 908 de serpentes não peçonhentas. Também foram classificados como ignorados, 7.963 casos, pela não identificação da espécie animal causadora do acidente (Ministério da Saúde, 2016). Cabe ressaltar que esses números podem ser ainda maiores, devido à subnotificação, principalmente em algumas regiões do país, como a região norte.

Acidente elapídico é o nome dado aos envenenamentos causados por serpentes do gênero *Micrurus* (coral verdadeira ou cobra-coral) e apesar da baixa ocorrência humana (menos de 1% ao ano), estes são sempre considerados graves, devido à alta toxicidade do veneno dessas serpentes (Vital Brazil, 1980). Ressalta-se que na medicina veterinária existem apenas dois relatos publicados, um caso em cão e outro em gato (Moreira *et al.*, 2004). Todavia, a epidemiologia dos envenenamentos ofídicos pode variar grandemente dentro do território nacional, necessitando maiores investigações. Nos últimos dois anos (2015 e 2016), a equipe de Toxicologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) teve acesso a diversos casos de cães envenenados por serpentes da espécie *Micrurus ibiboboca*, na Unidade Federativa de Pernambuco (dados não publicados), o que demonstra a variabilidade e a subnotificação na medicina veterinária. Ainda deve ser salientada a ampla distribuição das serpentes do gênero *Micrurus*, por todo o território nacional.

As serpentes corais verdadeiras são reconhecidas por suas cores características, em geral com anéis vermelhos, branco (ou amarelo) e negros. O gênero *Micrurus* é o principal representante da família Elapidae, pelo número de espécies conhecidas e sua distribuição geográfica nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. A baixa ocorrência humana de acidentes se deve principalmente a não agressividade dessas serpentes que possuem dentes inoculadores de veneno muito pequenos e pouca abertura de boca para morder a presa (Melgarejo, 2003; Morais *et al.*, 2011).

Os sinais clínicos registrados nos acidentes e em pesquisas relacionadas demonstraram a ação principalmente neurotóxica do veneno. O veneno pode ter ação pré-sináptica na junção neuromuscular, interferindo na liberação de acetilcolina ou ação pós-sináptica se ligando de forma reversível ou irreversivelmente aos receptores nicotínicos da acetilcolina. A morte geralmente ocorre por insuficiência respiratória (Amaral, 2009). Experimentalmente, miotoxicidade, cardiotoxicidade e alterações hemostáticas, foram relatadas apenas em algumas espécies. O veneno da espécie *M. surinamensis* é pouco estudado e são relatadas, principalmente, as alterações neurológicas (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Roodt *et al.*, 2012).

O tratamento é feito com a utilização do soro antielapídico, que não está disponível na medicina veterinária. O soro antielapídico para uso humano possui apenas anticorpos contra o veneno da *Micrurus corallinus* e *M. frontalis*. Na maioria dos casos se utiliza a neostigmina (droga anticolinesterásica) pós prévia atropinização e o paciente é mantido em terapia intensiva durante todo o tratamento (Vital Brazil, 1987; Sakate *et al.*, 2008).

A não produção de soro antielapídico na medicina veterinária é um fator limitante para um atendimento adequado aos animais envenenados. Os poucos relatos publicados levam ao desconhecimento a respeito dos sinais clínicos e do tratamento emergencial, devendo ser ressaltado que não existe notificação obrigatória para acidentes ofídicos na medicina veterinária, como existe na medicina humana.

Existe uma alta variabilidade, em composição de veneno, entre as espécies de *Micrurus*, o que torna importante o conhecimento dos efeitos clínicos das principais espécies, para melhor atendimento aos pacientes envenenados. As espécies de maior importância médica no Brasil são: *Micrurus frontalis*, *Micrurus corallinus*, *Micrurus ibiboboca*, *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus ipixii* e *Micrurus surinamensis* (Andrade Filho *et al.*, 2013).

A avaliação clínica mais detalhada das alterações neurológicas e cardíacas causadas pelo veneno da serpente *M. surinamensis* não está bem esclarecida. As crescentes pesquisas sobre cobras-coraais avaliam principalmente a composição do veneno nas diferentes espécies, mas não se sabe os efeitos destes venenos sobre diferentes sistemas orgânicos.

Existem pouquíssimos estudos sobre a toxicidade do veneno de *M. surinamensis*, que possui uma composição diferente das demais serpentes do gênero, principalmente, por seu hábito semi-aquático e alimentação baseada em peixes (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). E, por se tratar de uma das espécies de *Micrurus* de maior importância médica no Brasil, é imperativo o estudo dos efeitos tóxicos do veneno para melhor esclarecimento do quadro clínico e direcionamento do tratamento.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 - Geral**

Investigar os efeitos tóxicos do veneno de *M. surinamensis* utilizando a cobaia (*Cavia porcellus*) como modelo experimental.

### **2.2 - Específicos**

- Avaliar o quadro clínico, em especial as alterações neurológicas de cobaias após o envenenamento experimental por *M. surinamensis* (coral verdadeira).
- Analisar as alterações cardíacas por meio de exames eletrocardiográficos, de cobaias após o envenenamento experimental por *M. surinamensis* (coral verdadeira).
- Estudar o perfil sanguíneo (hematológico, bioquímico e coagulograma) de cobaias após o envenenamento experimental por *M. surinamensis* (coral verdadeira).
- Pesquisar as alterações macro e microscópicas (microscopia óptica e eletrônica) de diferentes tecidos de cobaias após o envenenamento experimental por *M. surinamensis* (coral verdadeira).

### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 - Família Elapidae

A Família Elapidae é composta por 250 espécies de serpentes encontradas em todo o mundo (Cardoso *et al.*, 2003). Incluem serpentes muito conhecidas como as Najas, na Ásia e África e nas Américas é representada por cerca de 85 espécies distribuídas em três gêneros, *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides*. A grande maioria dessas espécies americanas pertence ao gênero *Micrurus*, popularmente chamada de coral-verdadeira ou cobra-coral (Lomonte *et al.*, 2016).

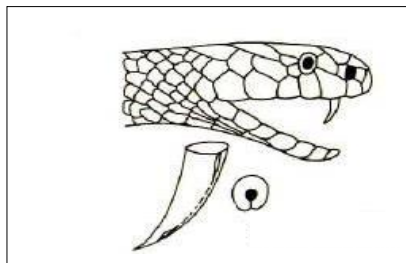
#### 3.2 - *Micrurus* sp.

O gênero *Micrurus* (*Micro*= pequeno e *urus*=cauda) se destaca entre os demais gêneros da família Elapidae pelo grande número de espécies conhecidas, com distribuição nas Américas, desde o sudeste dos Estados Unidos ao Sul da América do Sul (Campbell e Lamar, 2004; Di-Bernardo *et al.*, 2007) e principalmente pela gravidade dos acidentes provocados.

No Brasil, existem 19 espécies conhecidas de *Micrurus*: *M. albicinctus*, *M. altirostris*, *M. averyi*, *M. brasiliensis*, *M. corallinus*, *M. decoratus*, *M. filiformis*, *M. frontalis*, *M. hemprichii*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. ornatissimus*, *M. paraenses*, *M. putumayensis*, *M. spixii*, *M. surinamensis*, *M. tricolor*, *M. waehnerorum* (Cardoso *et al.*, 2003). Destas, as serpentes responsáveis pela maioria dos acidentes na medicina humana são: *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca* e *M. surinamensis* (Andrade Filho, *et al.*, 2013).

As serpentes deste gênero possuem dentição proteróglifa ou proteroglifodonte (*Protero* = anterior e *glifa*= sulco), com dentes inoculadores fixos, localizados na região anterior da boca. Esses dentes apresentam um sulco profundo através do qual o veneno penetra no local da mordida (Cardoso *et al.*, 2003). A abertura de boca é bem limitada, com amplitude de cerca de 30°, o que limita o tipo de presa e a defesa desses animais (Cardoso *et al.*, 2003).

**Figura 1.** Dentição proteróglifa presente nas serpentes do gênero *Micrurus*, com ilustração do sulco por onde passa o veneno para a inoculação na presa.



Fonte: <http://biologiaeterna.blogspot.com.br/>.

Possuem cabeça arredondada, olhos pequenos com pupilas arredondadas e ausência de fosseta loreal. São animais de pequeno e médio porte, medindo de 300 a 1200 mm, ovíparas, pondo de 2 a 10 ovos em buracos no chão, formigueiros ou troncos. Suas cores tradicionais são compostas por anéis vermelhos, pretos, amarelos, brancos e marrom escura (quase negra), esta última vista em espécies Amazônicas (Funasa, 2001).

Não são agressivas e atacam quando se sentem ameaçadas levantando a cauda, de forma semienrolada (engodo caudal), enganando as presas para conseguir morder e inocular seu veneno (Melgarejo, 2008). São em maioria, animais de hábitos semi-subterrâneos e que se alimentam de pequenas serpentes e répteis serpentiformes (Cardoso, 2003).

### 3.2.1 – Veneno

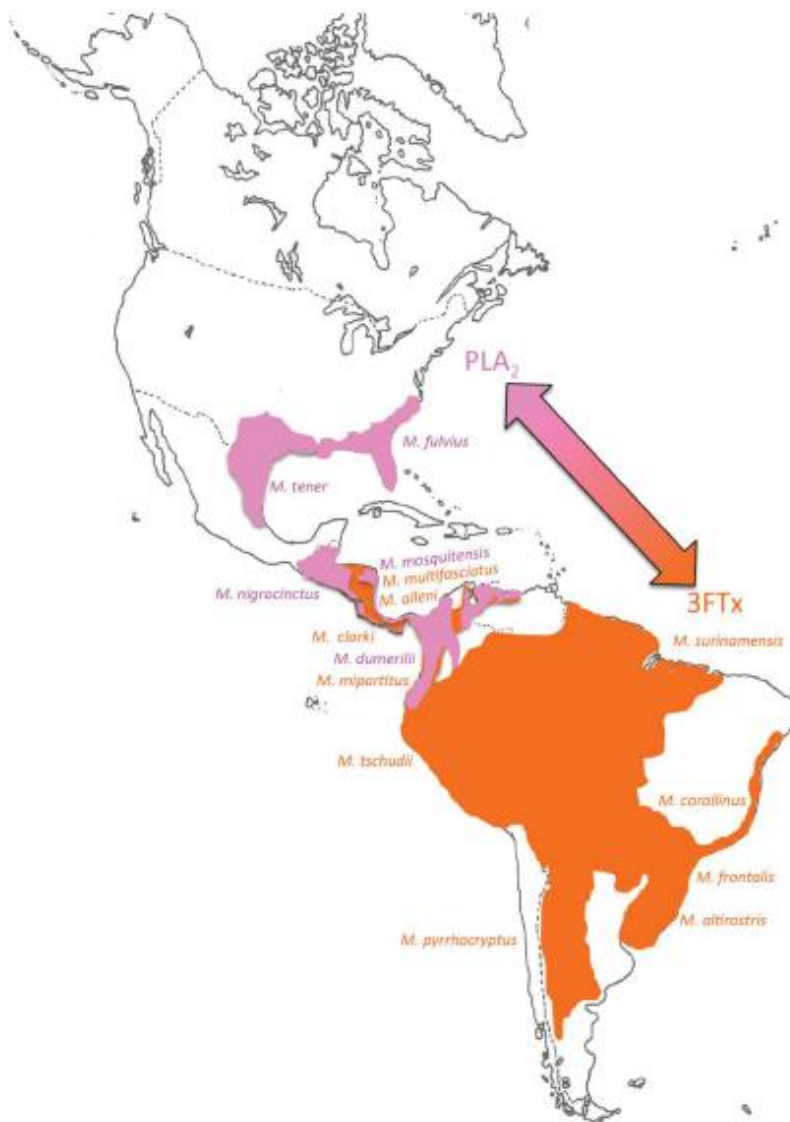
O veneno das cobras-corais apresenta toxicidade elevada, compostos por uma grande variedade de proteínas, peptídeos e outras moléculas orgânicas e inorgânicas com diversas atividades biológicas. Tais moléculas atuam em conjunto para promover a imobilização, a morte e a digestão de presas, ou como mecanismo de defesa contra predadores. A variabilidade na composição dos venenos de serpentes é resultado de múltiplos fatores, tais como dieta, idade, sexo e região onde se encontra a serpente (Ciscotto *et al.*, 2011).

A gravidade de um acidente por cobra-coral está relacionada com o volume de veneno injetado no momento da mordida, a espécie animal e a idade da vítima. Devido à dentição dessas serpentes, há certa dificuldade na inoculação do veneno (Cardoso *et al.*, 2003). Segundo Peterson (2006), 60% das mordidas de cobras-corais não causam envenenamento grave, possivelmente devido ao aparelho de inoculação de veneno, que é relativamente primitivo.

As peçonhas elapídicas apresentam grande quantidade de componentes tóxicos e são caracterizadas por causarem paralisia flácida, podendo levar a óbito por parada respiratória (Bolaños, 1984) e exercem pequena atividade proteolítica (Vital Brazil, 1984). Possuem ação neurotóxica, em todas espécies, sendo a ação miotóxica, hemorrágica e cardiotóxica, evidenciadas em algumas espécies de coral de forma experimental (Weis e McIsaac, 1971; Gutiérrez, 1983; Cecchini *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2010; Roodt *et al.*, 2012; Arce-Bejarano, 2014).

As mais importantes e abundantes toxinas elapídicas se classificam principalmente como toxinas de estrutura conhecida como *three finger toxin* (3FTx) e às fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). A proporção dessas duas proteínas varia muito entre as espécies e acredita-se que, a concentração majoritária, de uma ou outra, pode estar diretamente relacionada com a história evolutiva dos elapídeos nas Américas (Lomonte *et al.*, 2016). A Figura 2 mostra a distribuição das espécies de *Micrurus* nas Américas de acordo com a composição do veneno.

**Figura 2.** Distribuição das espécies de *Micrurus* de acordo com a predominância de PLA<sub>2</sub> (roxo) ou 3FTx (laranja) na composição do veneno, determinada por análise proteômica.



Extraído de Lomonte *et al.* (2016).

Além das toxinas 3FTx e PLA<sub>2</sub>, são descritas outras frações como, serinoproteases (SP), metaloproteases (MP), lectinas tipo C (CTL), aminoácido oxidase (LAO), inibidor de serinoprotease do tipo Kunitz (Kun), proteína secretora rica em cisteína (Crisp), lipase A de ácido lisossomal (Lip), nucleotidase (Nuc), acetilcolinesterase, fosfodiesterases (PDE), hialuronidase (Hya), fator de crescimento nervoso (NGF), fosfolipase B (PLB), glutathione peroxidase (GPx), glicoproteína de membrana neuronal (NMG), conotoxinas (Con), proteínas inibidoras de canais de cloro (SSC) e sódio (SAN) (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2010; Corrêa-Netto *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2011; Rey-Suárez *et al.*, 2011; Ciscotto *et al.*, 2011; Vergara *et al.*, 2014; Bérnard-Valle *et al.*, 2014; Lomonte *et al.*, 2016; Sanz *et al.*, 2016). Essas proteínas representam apenas de 0,1 a 1% do proteoma total do veneno, e até 10%

no caso da proteína Kun. Algumas dessas proteínas podem ser contaminantes celulares sem função tóxica, por isso mais estudos acerca do veneno das cobras-corais são extremamente relevantes (Lomonte *et al.*, 2016).

A ação conjunta das 3FTx e PLA<sub>2</sub> e todas as proteínas descritas anteriormente, tornam o veneno elapídico altamente tóxico e letal. A proporção desses componentes é variável no proteoma dos venenos das diversas espécies de *Micrurus* (Francis, 1997; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Moreira *et al.* 2010; Lomonte *et al.*, 2016).

As toxinas de estrutura conhecida como 3FTx, são as principais responsáveis pela ação letal do veneno. Possuem baixa massa molecular e podem atuar em receptores na fenda sináptica, sendo rapidamente absorvidas para a circulação e difundidas para os tecidos, o que explica a precocidade dos sintomas neurológicos no envenenamento (Vital Brazil, 1987; Leão, 2009). Podem despolarizar membranas excitáveis de cardiomiócitos, desregular a atividade de enzimas e receptores ligados à membrana celular, induzir hemólise e citotoxicidade, inibir a agregação plaquetária e provocar parada cardíaca. Essas toxinas 3FTx, interagem eletrostaticamente com lipídios aniônicos na membrana afetando a estrutura e organização da bicamada fosfolipídica através de sua desidratação, podendo gerar poros, o que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática com consequente lise das células (Gasarov *et al.*, 2015).

As PLA<sub>2</sub> atuam diretamente causando mudanças na permeabilidade das membranas celulares por clivagem dos lipídios estruturais, liberando lisofosfolídeos como produto. Essas toxinas são responsáveis pela neurotoxicidade, miotoxicidade e atividade edematogênica (Castro *et al.*, 2015). Em algumas espécies de *Micrurus*, agem sobre a coagulação do sangue, desempenhando um papel importante em mudanças homeostáticas (Cecchini *et al.*, 2005). A ação da PLA<sub>2</sub> é dependente de Ca<sup>2+</sup> mesmo que em concentração micromolar (Cecchini *et al.*, 2005).

### 3.3 – *Micrurus surinamensis*

A serpente *M. surinamensis* é encontrada na América do sul na região Amazônica, principalmente na Guiana, Venezuela, Colômbia, leste do Equador, Peru, Bolívia e Brasil. No Brasil, ela pode ser encontrada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Roraima, Rondônia, Pará, Maranhão, Tocantins e Mato Grosso (Cardoso, 2003; Morais *et al.*, 2011), como mostra a Figura 3.

**Figura 3 (a e b).** Regiões da América do Sul (a) e, em detalhe, do Brasil (b) onde são encontradas as serpentes da espécie *M. surinamensis*.



Fonte: (a) <http://www.reptile-stamps.de/html/micrurus> e (b) adaptado de Cardoso *et al.*, 2003.



Sua coloração é vermelha, branca e negra e a identificação da espécie pode ser feita observando o padrão de cores na cabeça, onde as escamas são vermelhas e demarcadas pela cor negra. (Cardoso, 2003), como mostra a Figura 4.

**Figura 4.** Serpente *M. surinamensis*, com detalhe da cabeça de cor vermelha e escamas de contornos negros.



Fonte: <http://www.fieldherpforum.com>.

Difere das demais serpentes do gênero *Micrurus* por possuir hábito semi-aquático e se alimentar basicamente de peixes. Isso confere a essas serpentes uma maior diferenciação em composição de veneno, mais direcionado para o tipo de presa e influenciado pela localização geográfica (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2011).

O veneno das serpentes da espécie *M. surinamensis* foi fracionado por Olamendi-Portugal *et al.* (2008) e identificado seus componentes. Aproximadamente 100 moléculas diferentes foram identificadas, sendo que 62 delas possuem massas moleculares entre 6 e 8 kDa, caracterizadas como toxinas 3FTx (citotoxinas e neurotoxinas), que representam a maior parte do veneno (diferentemente das demais espécies de *Micrurus*). Seis novas 3FTx abreviadas como Ms1, Ms2, Ms3, Ms4, Ms5 e Ms11 (onde Ms representa o nome científico, *M. surinamensis*, seguido pela ordem em que eles foram isolados e identificados quimicamente), foram totalmente sequenciadas. A abundância relativa dessas principais proteínas foi: 3,4% (Ms1), 20,0% (Ms2 e Ms3), 10,0% (Ms4), 25% (Ms5), e 20,6% (Ms11). Essas toxinas 3FTx são peptídeos desprovidos de atividade enzimática que possuem ação neurotóxica evidenciada em camundongos e principalmente em peixes (base da alimentação dessa espécie), com ação pós-sináptica bloqueando os receptores de Ach de forma reversível. Outras proteínas também foram identificadas, em menor proporção, são elas: PLA<sub>2</sub>, MP, LAO, Kun, Con, SSC e SAN (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Lomonte *et al.*, 2016).

Nos estudos de Schezaro-Ramos *et al.* (2016), foram comparadas neurotoxicidade, citotoxicidade e atividade de PLA<sub>2</sub> dos venenos de *M. surinamensis*, *M. frontalis*, *M. brasiliensis* e *M. spixii*. Apenas o veneno da *M. surinamensis* não apresentou atividade PLA<sub>2</sub>, mas mostrou alta capacidade neurotóxica e citotóxica, testadas em preparações com nervo frênico do diafragma de camundongo e células de neuroblastoma SH-SY5Y, respectivamente.

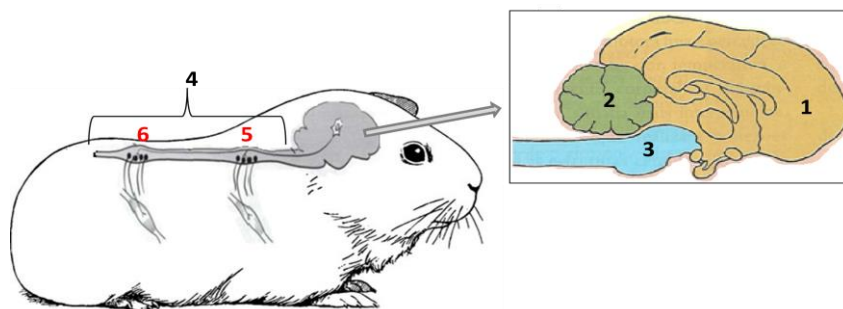
Em diferentes graus, a toxicidade dos venenos das cobras-corais, pode mostrar uma ação miotóxica, hemolítica, hemorrágica e cardiotoxica. Essas ações podem estar presentes devido à ação das PLA<sub>2</sub>, que aparecem em maior proporção na composição total do veneno da maioria

dos elapídeos (Gutiérrez, 1983; Francis, 1997; Aird e da Silva, 1991) e devido as 3FTx (Gasánov *et al.*, 2015). Diferentemente das demais espécies, a *M. surinamensis* possui em menor proporção de veneno, a fração PLA<sub>2</sub>, com predomínio da fração de 3FTx, como já citado anteriormente (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

### 3.4- Sistema nervoso e ação neurotóxica do veneno das cobras-corais

O sistema nervoso está dividido em sistema nervoso central (SNC), com suas subdivisões, cérebro e medula espinhal; e sistema nervoso periférico (SNP), composto por nervos, gânglios e terminações nervosas (Marcondes, 2008) conforme demonstrado na Figura 5.

**Figura 5:** Divisão do SNC. 1- prosencéfalo; 2 – cerebelo; 3 – tronco encefálico; 4 – medula espinhal; 5 - intumescência braquial; 6 - intumescência lombosacral. As intumescências formam os nervos espinhais que fazem parte do SNP.



Adaptado de Marcondes (2008); Martins *et al.*, (2013) e <https://pt.fotolia.com/tag/porquinho-da-india>.

O encéfalo é a região do SNC composto pelo cérebro, tronco cerebral e cerebelo. As anomalias neurológicas no encéfalo podem ser localizadas com base nos achados clínicos nas regiões do prosencéfalo (cérebro e diencéfalo), ponte, medula e cerebelo (Taylor, 2010).

A porção mais desenvolvida e mais importante do encéfalo é o prosencéfalo, composto pela substância branca cerebral, córtex cerebral (substância cinzenta), núcleo basal e diencéfalo. A substância branca consiste de feixes de fibras mielinizadas e tecido de suporte que transmite informações sensoriais ascendentes e motoras descendentes, participam na manutenção do tônus muscular e na iniciação e controle de atividades voluntárias. A substância cinzenta ou córtex cerebral participa do comportamento, visão, audição, atividade motora fina, dor, percepção consciente do tato, temperatura e posicionamento do corpo. O sistema límbico também está localizado no córtex cerebral e é responsável pelo comportamento inato de sobrevivência, tais como proteção, comportamento maternal e sexual. Os núcleos de base atuam no tônus muscular e função motora, estão localizados na substância cinzenta (Marcondes, 2008; Taylor, 2010; Martins *et al.*, 2013).

O diencéfalo é a região integradora sensorial que encaminha informações do tronco encefálico para regiões específicas do cérebro e está subdividido em epitálamo, tálamo, subtálamo, metatálamo e hipotálamo. Atua na manutenção da consciência e atenção, em funções autônomas e endócrinas, como sede, apetite, manutenção da temperatura, balanço eletrolítico e hídrico. Também no diencéfalo estão localizados núcleos de neurônios motores superiores (NMS) e

realiza conexões com o sistema ativador reticular ascendente (SARA), responsável pelo nível de consciência e estado de alerta (Marcondes, 2008; Martins *et al.*, 2013).

O tronco encefálico possui os núcleos de 10 nervos cranianos (nervos cranianos de III a XII), núcleos de NMS e o SARA, nele passam vias sensitivas responsáveis pela propriocepção consciente e inconsciente, dor e respiração normal. Possui vias descendentes motoras para músculos flexores e extensores, conectando a medula e córtex cerebral (vias sensoriais ascendentes e motoras descendentes) (Marcondes *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013).

O cerebelo é o principal centro de coordenação do sistema nervoso, controla a frequência e a força dos movimentos. Atua na coordenação, regulação de movimentos finos e modula o tônus muscular, além do equilíbrio, através da interação direta com núcleos vestibulares do tronco encefálico pelos pedúnculos cerebelares (Taylor, 2010; Thomson e Hahn, 2012).

A medula espinhal é uma massa cilindroide de tecido nervoso situado dentro da coluna vertebral óssea. Possui uma porção central de substância cinzenta em formato de “H” circundada por substância branca. A substância cinzenta possui corpos de neurônios aferentes, no corno dorsal da substância cinzenta; de interneurônios, no corno lateral; e de neurônios motores inferiores (NMI) no corno ventral. A substância branca está organizada em colunas de tratos sensoriais ascendentes (propriocepção, tato, temperatura, pressão e dor) e tratos que transmitem sinais motores descendentes. Funcionalmente se divide em segmentos: cervicais, torácicos, lombares e sacrais. Duas intumescências, a intumescência braquial e intumescência lombosacral, se caracterizam pelo maior diâmetro na medula espinhal, de onde saem núcleos dos neurônios motores que inervam a musculatura dos membros (Taylor, 2010; Thomson e Hahn, 2012).

O SNP é composto pelos 12 pares de nervos cranianos e pelos pares de nervos espinhais que contém axônios sensoriais e motores. As fibras nervosas dos nervos espinhais estão localizadas nas intumescências braquial e lombosacral e formam os nervos periféricos (Taylor, 2010).

As junções neuromusculares fazem parte do SNP e permitem que a transmissão elétrica seja transmitida dos axônios para as fibras musculares, para que ocorra a contração muscular. Para a contração, é necessária a ocorrência de um estímulo nervoso no neurônio pré-sináptico, consequente influxo de cálcio que determinará a liberação de acetilcolina (Ach), um neurotransmissor excitatório. A Ach se liga a receptores colinérgicos pós-sinápticos resultando na abertura de canais de sódio e potássio promovendo a despolarização e contração muscular. A Ach é removida pela acetilcolinesterase que promove sua hidrólise e permite a reabsorção, para novamente formar o neurotransmissor (Taylor, 2010).

O sistema nervoso autônomo (SNA) se refere ao sistema nervoso simpático e parassimpático, principalmente, e também ao sistema nervoso entérico. Ele integra o sistema motor, tendo como órgãos efetores a musculatura lisa (vasos sanguíneos), o músculo cardíaco e as glândulas exócrinas. A diferença entre o SNA e o SNC é caracterizada pelo número de neurônios atuantes, da geração do impulso, até alcançar o órgão alvo. O SNC possui o núcleo neuronal, e o axônio desse mesmo neurônio, se estende até a musculatura esquelética onde realiza a sinapse, enquanto que no SNA dois neurônios participam da transmissão do impulso ao órgão alvo, um deles é o neurônio pré-ganglionar que possui corpo celular no SNC e que inerva o segundo neurônio, o pós-ganglionar, que possui o corpo celular localizado em estruturas periféricas chamadas de gânglios (Klein e Cunningham, 2009) (Figura 6).

**Figura 6:** Representação da transmissão impulso pelo sistema nervoso autônomo.



Fonte: (Klein e Cunningham, 2009)

O sistema nervoso simpático é um sistema tóraco-lombar e o parassimpático é crânio-caudal, considerando a origem anatômica dos neurônios pré-ganglionares e a transmissão sináptica para os órgãos alvo. O simpático possui axônios pré-ganglionares na medula espinhal (região ventral da medula) que fazem sinapses com neurônios pós-ganglionares muito próximos à coluna. Esses neurônios inervam os vasos sanguíneos, o coração, glândulas, sistema gastrointestinal, as vias aéreas, etc (Klein e Cunningham, 2009).

O sistema nervoso parassimpático é um sistema cranio-sacral, pois o núcleo dos neurônios pré-ganglionares sai do SNC, região do tronco encefálico, através dos nervos cranianos III (oculomotor), VII (facial), IX (glossofaríngeo), X (vago) e vários nervos espinhais sacrais. A sinapse ocorre com os neurônios pós-ganglionares localizados na região sacral e são transmitidos aos órgãos alvos. A maioria das vísceras recebe tanto inervação simpática quanto parassimpática. O parassimpático apesar de ser considerado crânio-sacral, pode inervar as regiões torácica e lombar através do nervo vago (X) (Klein e Cunningham, 2009).

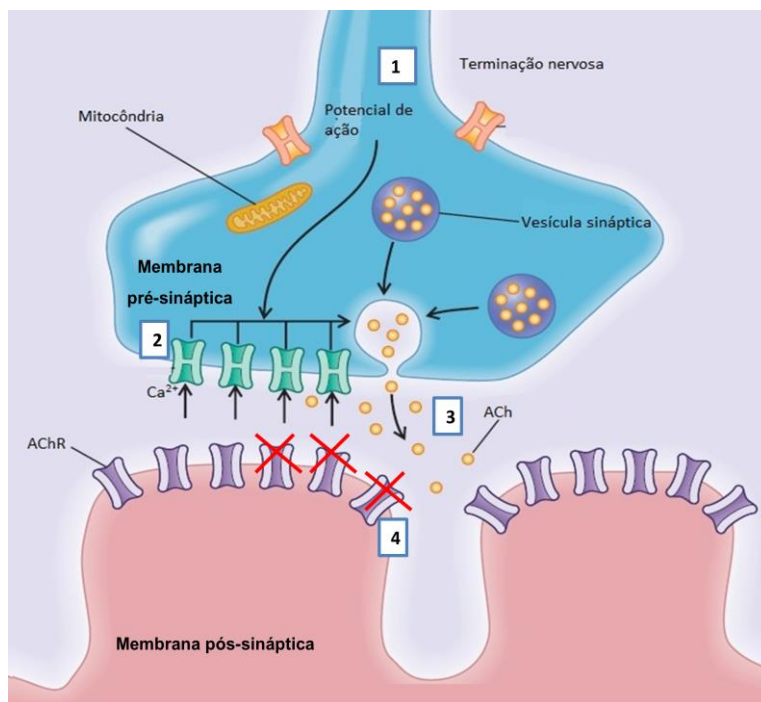
A transmissão sináptica é realizada pela acetilcolina (como ocorre no SNC) em todos os gânglios do SNA e é o neurotransmissor na sinapse pós-ganglionar parassimpática, atuando em receptores colinérgicos (muscarínicos ou nicotínicos). A maioria dos neurônios pós-ganglionares simpáticos secretam a noradrenalina como neurotransmissor, que atua em receptores adrenérgicos (receptores  $\alpha$  ou  $\beta$ ) (Klein e Cunningham, 2009). O veneno de *M. surinamensis* atua apenas em receptores colinérgicos nicotínicos (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

No envenenamento elapídico, os principais sinais clínicos são neurológicos devido a composição do veneno predominante em 3FTx (citotoxinas e neurotoxinas) e alguns tipos de PLA<sub>2</sub> (que podem atuar também como neurotoxinas). As toxinas com ação neurotóxicas podem atuar de forma pré ou pós-sinápticas (Vital Brazil, 1987; Leão *et al.*, 2009).

As toxinas 3FTx pré-sinápticas estão presentes em quase todos os venenos elapídicos. Possuem massa molecular de 12 a 60 KDa, atividade fosfolipásica, bloqueiam a liberação de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica de nervos motores, impedindo a deflagração do potencial de ação e contração muscular. Esse mecanismo não é antagonizado pelas substâncias anticolinesterásicas (Vital Brazil, 1987; Leão, 2009). A ação pós sináptica é descrita nas espécies *M. corallinus* e *M. nigrocinctus* pela ação de toxinas 3FTx e descrita em *M. dumerelli carinicauda* por ação de um tipo de PLA<sub>2</sub> com essa atividade (Vital Brazil, 1980, 1987; Bolaños *et al.*, 1984).

As toxinas 3FTx pós-sinápticas possuem massa molecular entre 6 e 14 kDa e são desprovidas de ação enzimática, são representadas principalmente pelas  $\alpha$ -neurotoxinas. Elas competem com a acetilcolina (ACh) pelos receptores colinérgicos da junção neuromuscular, atuando de modo semelhante ao curare. Assim, é bloqueada a deflagração do potencial de ação (Vital Brazil, 1987). O veneno da espécie *M. surinamensis* possui apenas neurotoxinas pós-sinápticas, toxinas 3FTx que atuam nos receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina de forma reversível (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e o veneno de *M. frontalis*, que também possui essa atividade (Moreira *et al.*, 2010) (Figura 7).

**Figura 7:** Fenda sináptica onde ocorre a transmissão do impulso nervoso para a contração muscular. O potencial de ação (1); influxo de cálcio (2); adesão das vesículas sinápticas na membrana no axônio e liberação de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica (3); receptores de ACh bloqueados na membrana pós-sináptica (4).



Adaptado de: [www.medicinanet.com.br](http://www.medicinanet.com.br) e <http://slideplayer.com.br/slide/1747410/>.

Os receptores colinérgicos nicotínicos são receptores ionotrópicos que, quando ativados se tornam permeáveis aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e são conhecidos pela transmissão excitatória rápida, comparada à transmissão sináptica induzida por receptores muscarínicos. São receptores amplamente distribuídos em vários tecidos, incluindo o cérebro e o tecido muscular, sendo que no SNC, estão presentes no córtex, no tálamo, no hipocampo e no cerebelo. Alguns tipos de receptores nicotínicos regulam parcialmente a liberação de dopamina e de glutamato; e outros controlam a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e a resposta de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (Ventura *et al.*, 2009).

O veneno de *M. lemniscatus* possui PLA<sub>2</sub> de ação neurotóxica com capacidade de alterar o comportamento e levar a degeneração neuronal, provavelmente pela ação dessa proteína nas membranas neuronais e aumento da liberação de neurotransmissores (Oliveira *et al.*, 2008).

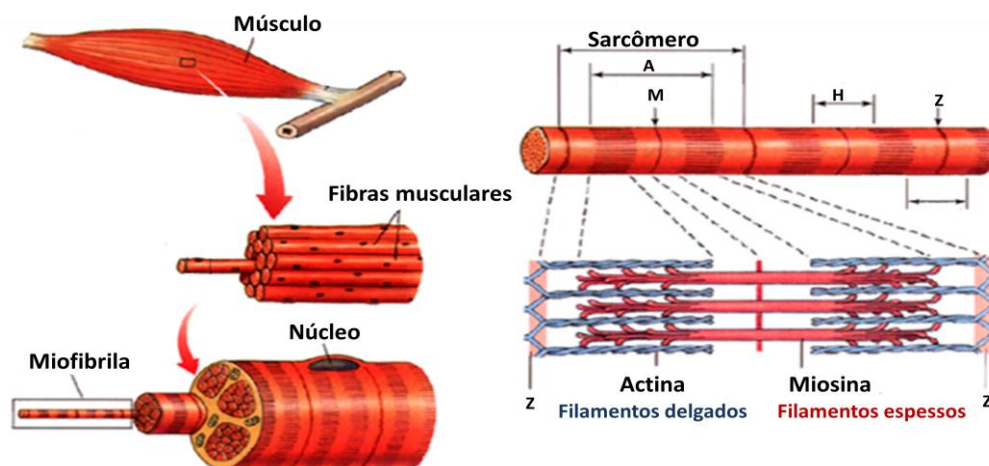
Além dos efeitos tóxicos citados acima, o uso terapêutico do veneno de cobra-coral vem sendo estudado. Os efeitos antinociceptivos do veneno de *M. lemniscatus* foram estudados por Santos *et al.* (2012) em camundongos. Essa atividade foi testada após administração oral do veneno de *M. lemniscatus* em doses sem toxicidade aparente que não causaram alterações no desempenho motor, mostrando efeitos antinociceptivos potentes, mediado pelo sistema opióide, principalmente causado pelo receptor  $\mu$ -opióide. No entanto, em estudos com veneno de *M. tener*, evidenciou-se que o mesmo pode causar dor, devido à associação das proteínas Kun e PLA<sub>2</sub> e a atuação das mesmas em receptores neuronais responsáveis pela dor (Bohlen *et al.*, 2011).

### **3.5- Musculatura esquelética e ação miotóxica do veneno das cobras-corais**

O músculo possui funções como a manutenção da postura, locomoção, participa na função respiratória, metabolismo de glicose e controle da temperatura corporal. As células estriadas esqueléticas são cilíndricas e multinucleadas, sendo chamadas como fibras musculares ou miofibras que se agrupam em feixes. A coloração vermelho ou róseo do músculo é devida a presença de pigmentos de mioglobina (proteínas que transportam oxigênio) e também contribuem para avaliação clínica de degenerações musculares (Barros, 2016).

A membrana plasmática da fibra muscular é chamada de sarcolema que está circundado pela lâmina basal, cerca de 80% dele é ocupado por miofibrilas arrançadas ao longo das miofibras. As miofibras são estruturas formadas por feixes de miofilamentos, delimitadas pelo acúmulo de mitocôndrias, sendo esses filamentos a actina (filamentos delgados) e a miosina (filamentos espessos). Os filamentos de actina (que estão ancorados no lado da linha Z) e de miosina (centrais) estão intercalados entre si, essa disposição dos miofilamentos nas miofibrilas confere o padrão estriado visualizado a microscopia. Na estrutura das miofibrilas, o sarcômero está compreendido entre duas linhas Z, a banda A (anisotrópica) é a região mais escura e a banda H é a mais clara (Taylor, 2010; Barros, 2016) (Figura 8).

**Figura 8.** Estrutura morfológica da fibra muscular esquelética.



Fonte: <https://grupomedveterinaria.wordpress.com/2012/06/21/tecido-muscular/>.

Na contração muscular, os miofilamentos não diminuem de tamanho, mas os sarcômeros ficam mais curtos e toda a célula muscular se contrai. O encurtamento dos sarcômeros ocorre em função do deslizamento dos miofilamentos delgados sobre os espessos, havendo maior sobreposição entre eles. A contração e descontração muscular se devem ao trifosfato de adenosina (ATP), que move os íons cálcio do retículo endoplasmático para as miofibras, promovendo a contração, e de volta ao retículo endoplasmático para o relaxamento (Barros, 2016).

O fosfato de creatina pode ser uma fonte de energia reserva em casos onde tenha diminuição de ATP. Nesses casos, ela é hidrolisada pela creatina quinase (CK) formando creatina e ATP. Quando há lesão de fibras musculares, ocorre um aumento sérico da enzima CK (Valberg, 2008).

O músculo é parte integrante da unidade motora do SNP, que compreende o NMI, junção neuromuscular e fibras musculares inervadas. Na junção neuromuscular a atividade elétrica é transmitida dos axônios para as fibras musculares, processo mediado pelo influxo de cálcio que culmina na liberação de Ach na fenda sináptica para estimulação muscular (pós-sináptica), induzindo a mudança conformacional, fluxo de íons e contração do músculo (Taylor, 2010).

A ação miotóxica causada pelo veneno das serpentes do gênero *Micrurus* é relatada na medicina humana e de forma experimental, comprovada pelo aumento da enzima creatina quinase (CK). Nos envenenamentos experimentais por *M. surinamensis* foi relatado um discreto aumento da enzima CK e baixa atividade miotóxica em ratos, comparada a outras espécies como *M. fulvius* e *M. nigrocinctus*, que possuem maior atividade miotóxica e valores elevados de CK (Gutiérrez *et al.*, 1983; Roodt *et al.*, 2012). Todavia, em estudos de Cecchini *et al.* (2005), não foi observada miotoxicidade no envenenamento por *M. surinamensis*. Essa discrepância pode ser atribuída ao tipo de músculo em que se fez a inoculação do veneno e à região de origem da espécie, mostrando alta variabilidade dos venenos inclusive dentro da mesma espécie (Barros, 1994; Roodt *et al.*, 2012). A miotoxicidade também foi descrita experimentalmente nos envenenamentos por: *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. hemprichi ortonii*, *M. corallinus*, *M.*

*albicinctus*, *M. ibiboboca*, *M. averyi* e *M. lemniscatus* (Gutiérrez *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1994)

A consequente mionecrose, evidenciada em envenenamentos por *M. nigrocinctus*, por exemplo, pode ocorrer por ação do veneno no sarcolema (principal estrutura celular atingida), levando a um influxo de  $\text{Ca}^{+2}$ , elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e hipercontração dos microfilamentos, causando danos mitocondriais e ativação de fosfolipases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arroyo *et al.*, 1987; Mebs, 1986). Além da ação de citotoxinas que podem alterar a estrutura da membrana celular, também pode ocorrer despolarização celular com danos mitocondriais e ruptura de lisossomos (Gasánov *et al.*, 2015). Estudos de microscopia óptica do tecido muscular de animais envenenados por *M. surinamensis*, revelaram que esse veneno mostrou a menor capacidade de provocar mionecrose, principalmente em curto intervalo de tempo, quando comparado com as espécies *M. frontalis*, *M. nigrocinctus*, *M. carinicauda* e *M. alleri* (Gutiérrez *et al.* (1983).

### **3.6 – Funcionamento cardíaco e ação cardiotoxicidade do veneno das cobras-corais**

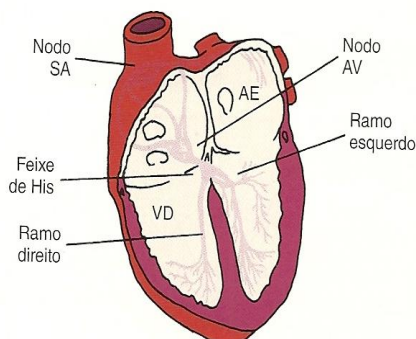
O coração é responsável pela circulação adequada de sangue para todos os órgãos e tecidos, inclusive ele mesmo, levando oxigênio a todas as células do corpo, permitindo a troca de gases, como o gás carbônico, o transporte de nutrientes, eletrólitos, além de carrear substâncias e medicamentos por todo organismo (Neto, 2008). Ele está dividido em quatro câmaras cardíacas, dois átrios e dois ventrículos e o fluxo entre eles é controlado por válvulas atrioventriculares, a tricúspide (lado direito) e a mitral (lado esquerdo). Os átrios são responsáveis por receber o sangue, seja ele venoso (átrio direito) ou arterial (átrio esquerdo), os ventrículos são responsáveis por bombear o sangue para os pulmões (ventrículo direito) para realizar trocas gasosas ou para o resto do corpo (ventrículo esquerdo) (Neto, 2008).

A parede cardíaca é formada por três estruturas: o pericárdio, uma camada serosa que reveste o coração; o endocárdio, uma camada serosa que reveste o coração internamente, inclusive o interior das câmaras, possuindo estrutura homóloga a camada íntima dos vasos; e o miocárdio, potente camada de músculo estriado involuntário, responsável pela contração cardíaca e que possui células especializadas na formação de transmissão do impulsos, determinando o ritmo e a autonomia cardíaca (Neto, 2008, Ocarino *et al.*, 2016).

A excitação e condução dos impulsos elétricos de forma sincronizada são realizadas por um sistema especializado, que permite a contração coordenada do músculo cardíaco e o bombeamento adequado de sangue para o organismo. Esse sistema é autônomo e especializado e é composto pelos nodos sinoatrial (SA) e atrioventricular (AV), feixes de His e fibras miocárdicas diferenciadas para a condução do impulso, denominadas fibras de Purkinje (Tilley e Burtnick, 2004; Camacho e Mucha, 2008, Ocarino, *et al.*, 2016) (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema do sistema de condução cardíaco. SA – nodo sinoatrial; VD – ventrículo direito; AV – nodo atrioventricular; AE – átrio esquerdo.



Fonte: Ware, 2010.

O marca-passo do coração é o nodo SA, localizado na parede superior do átrio direito, onde se origina o impulso elétrico cardíaco que se propaga pelo átrio direito e transmitido ao átrio esquerdo. Em seguida há a transmissão do impulso aos ventrículos, pela excitação do nodo AV, que ocorre com certo retardo para permitir despolarização atrial e a do próprio ventrículo. A transmissão nos ventrículos passa pelo feixe de His, se propaga até chegar aos ramos subendocárdicos, as fibras de Purkinje e assim despolarizar os ventrículos (Tilley e Burtneck, 2004; Camacho e Mucha, 2008).

Na fibra muscular cardíaca, o potencial de ação é provocado pela abertura de dois tipos de canais iônicos: os canais rápidos de sódio e os canais lentos de cálcio. Este segundo tipo de canal permanece aberto por mais tempo, permitindo que fluam para o interior das fibras musculares cardíacas grandes quantidades de íons cálcio e sódio, o que permite a manutenção do longo período de despolarização, fator determinante do platô, verificado no potencial de ação de uma fibra muscular cardíaca. Além disso, logo após o começo do potencial de ação a permeabilidade da membrana a íons de potássio, diminui cinco vezes a sua capacidade, possivelmente pelo grande influxo de cálcio, o que permite que a célula não volte ao estado de repouso (Guyton, 2002).

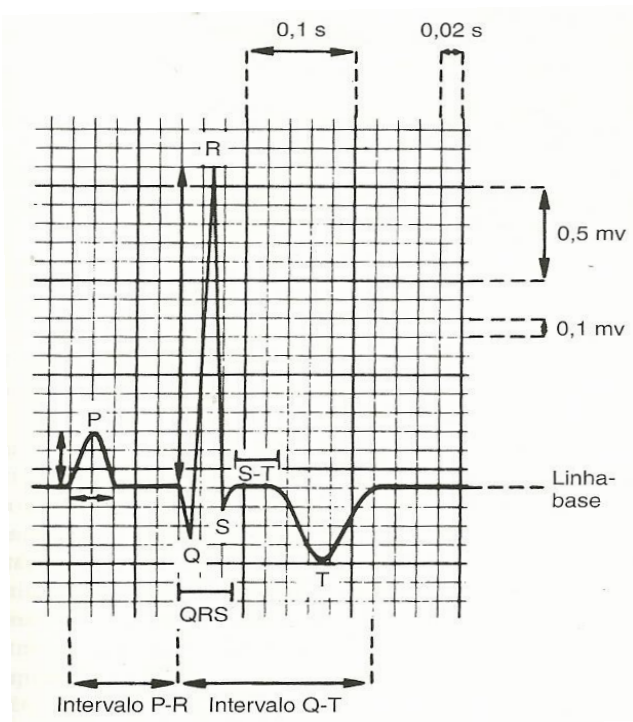
O ciclo cardíaco são os acontecimentos entre um batimento cardíaco a outro e consiste de um período de relaxamento, onde o coração se enche de sangue, período este denominado de diástole, seguido de um período de contração, denominado sístole (Guyton, 2002).

O equilíbrio do ritmo cardíaco e respiratório é controlado pelo SNA simpático e parassimpático. No coração os dois sistemas atuam no nodo SA e AV, nos ventrículos e átrios. O parassimpático promove a diminuição da frequência cardíaca através do nodo SA, diminuição da contração atrial e diminuição da contração ventricular com bloqueio do nodo AV. O simpático atua de forma contrária, promovendo o aumento da frequência cardíaca (através do nodo SA), aumento da contração e transmissão de condução no átrio e no ventrículo e aumento da velocidade de transmissão pelo nodo AV (Klein e Cunningham, 2009).

A avaliação da função cardíaca pode ser realizada, dentre outros exames, pelo eletrocardiograma (ECC), que avalia a função elétrica do coração e é importantíssimo na detecção de alterações no ritmo cardíaco (arritmias) (Camacho e Mucha, 2008; Ware, 2010).

O ECC representa de forma gráfica a polarização e a despolarização cardíaca através das ondas P, Q, R, S e T, como representado na figura 10. Fornece informações sobre a frequência cardíaca, ritmo, condução intracardíaca, detecção de arritmias, sugere aumento de câmaras específicas, isquemia, desequilíbrio eletrolítico e algumas intoxicações ou envenenamentos. A onda P é causada pela despolarização dos átrios, o intervalo P-R (entre as ondas P e R) indica o tempo de transmissão gasto pelo estímulo elétrico do nodo SA para o nodo AV. As ondas QRS correspondem à despolarização ou contração ventricular, onde Q indica a despolarização do septo interventricular, a onda R, indicando a primeira deflexão positiva, marcada pela despolarização do miocárdio, endocárdio e pericárdio e a onda S que representa a despolarização das porções basais dos ventrículos. O intervalo S-T, serve para avaliar o infra ou supra nível do segmento. Por fim, a onda T representa a repolarização ou relaxamento ventricular, e o intervalo Q-T, indica o tempo utilizado pelo impulso elétrico na despolarização e repolarização dos ventrículos (Guyton, 2002; Tilley e Burtnick, 2004; Camacho e Mucha, 2008).

**Figura 10:** Ilustração eletrocardiográfica representando os principais parâmetros de análise e os valores que correspondem a cada medida da grade do traçado. Derivação II e velocidade de 50 mm/s. Os intervalos de tempo (segundos) são medidos da esquerda para a direita e as amplitudes (milivolts) são medidas como positiva ou negativas, a partir da linha base.



Fonte: Ware, 2010.

A avaliação clínica e laboratorial do funcionamento cardíaco é realizada com frequência na prática. Mas em casos de envenenamento ofídico pouco se sabe a respeito das possíveis alterações que possam ocorrer.

As citotoxinas (3FTx) do veneno da *Naja naja* tem capacidade de despolarizar membranas excitáveis de cardiomiócitos, desregular a atividade de enzimas e receptores ligados à membrana celular, induzir hemólise e citotoxicidade, inibir a agregação plaquetária e provocar parada cardíaca. As citotoxinas interagem eletrostaticamente com lipídios aniônicos na membrana afetando a estrutura e organização da bicamada fosfolipídica por desidratação da bicamada lipídica, podendo gerar poros, aumentando a permeabilidade membrana plasmática levando à lise das células (Gasarov *et al*, 2015).

A ação cardiotoxica foi estudada em gatos anestesiados e inoculados com veneno de *M. fulvius*, uma espécie norte-americana que apresenta uma maior proporção de fosfolipases em seu proteoma. A ação do veneno ocorreu de forma irreversível e mostrou efeito despolarizante direto no músculo esquelético e efeito cardiotoxico direto, diminuindo a contratilidade e diminuição do potencial de ação (Weis e McIsaac, 1971).

### **3.7 - Efeitos clínicos**

O envenenamento elapídico é de alta toxicidade, e as manifestações clínicas são consideradas graves, levando a sintomatologia, principalmente, sistêmica. A manifestação local é caracterizada, em alguns casos, por dor de intensidade variável no local da mordida. A sistêmica é caracterizada pela atividade neurotóxica pré e/ou pós-sináptica do veneno na junção neuromuscular, impedindo a liberação ou ação da acetilcolina (Ach) (Silva Jr e Bucarechi, 2009).

A insuficiência respiratória aguda é a principal causa de óbito no acidente elapídico, decorrente do bloqueio da junção neuromuscular pelas toxinas 3FTx, ocasionando paralisia da musculatura respiratória. Outras manifestações são relatadas, tais como: ptose palpebral, com ou sem limitação dos movimentos oculares; dificuldade para deglutição e mastigação; perda da força muscular ou até paralisia total dos membros, dispnéia restritiva ou obstrutiva que pode evoluir para paralisia diafragmática, como também, vômito e sonolência (Silva e Bucarechi 2003; Amaral, 2009).

Em gatos, após envenenamento pela *M. fulvius*, foram descritos sinais de quadriplegia flácida ascendente, depressão do SNC, hipotermia, hipotensão, anisocoria e nocicepção reduzida. E em cães, são observados, além de grande depressão do SNC, sinais como: vômito, sialorréia, paralisia respiratória, hipotensão e taquicardia ventricular. No protocolo de atendimento, o paciente deve ser submetido ao hemograma, coagulograma, avaliação da concentração dos eletrólitos e bioquímica sérica (Peterson, 2006).

### **3.8 – Alterações sanguíneas**

#### **3.8.1– Hemostasia e ação hemolítica e hemorrágica do veneno das cobras-corais**

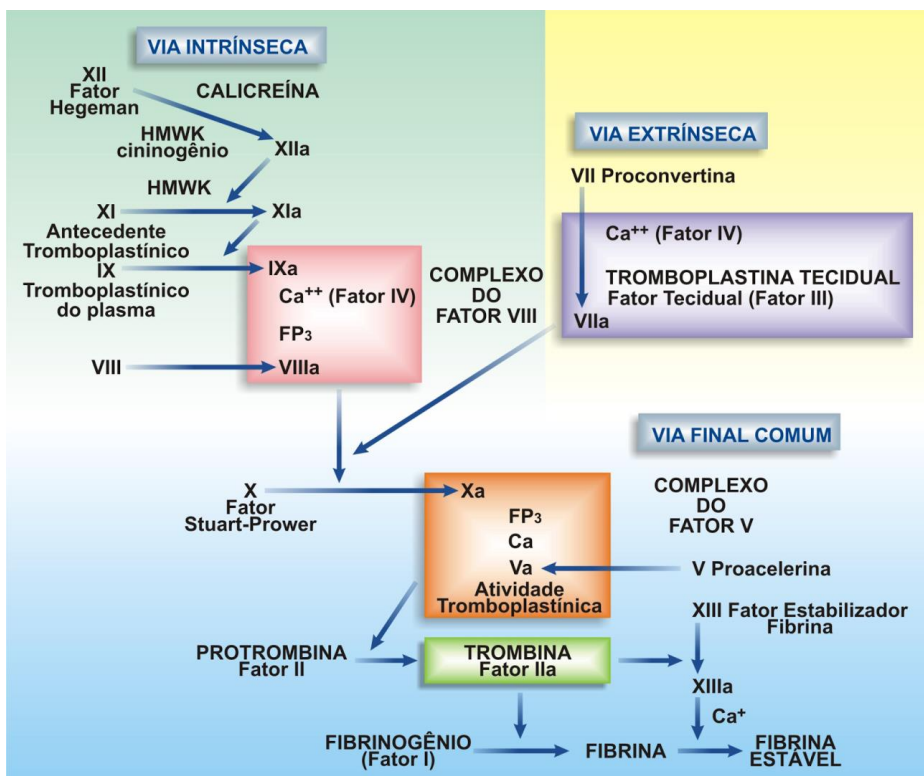
A hemostasia é um mecanismo fisiológico de proteção vital que previne a perda de sangue através da vedação de locais de lesão, mantendo a integridade do sistema vascular. A hemostasia consiste numa interação bem controlada e equilibrada entre um grande número de

proteínas participantes para que o sangue não coagule dentro dos vasos. As células endoteliais que revestem a vasculatura, as células externas e as plaquetas desempenham papéis importantes. As proteínas hemostáticas incluem precursores inativos (zimógenos) que são convertidos em enzimas ativas, proteínas reguladoras (cofatores) que aumentam a funcionalidade de suas correspondentes coenzimas e inibidores que interferem com a função da proteína através de uma variedade de mecanismos (Smith, 2010).

O início da coagulação em resposta a uma lesão depende da exposição de componentes extravasculares que não estão presentes na corrente sanguínea em condições fisiológicas. A exposição destes participantes extravasculares inicia uma cascata explosiva de ativação celular, alterações nas propriedades da superfície celular e geração de enzimas ativas que produzem um coágulo estável. Imediatamente, mecanismos locais produzem vasoconstrição, de forma inicial até adesão das plaquetas, alteração da permeabilidade vascular com produção de edema, promovendo um efeito tampão transitório (Paes *et al.*, 2009; Smith, 2010).

A hemostasia está dividida tradicionalmente em três caminhos, a via extrínseca, intrínseca e comum (Figura 11). Nesse processo ocorre a coagulação, caracterizada pela conversão das pró-enzimas (zimógenos) em enzimas (proteases). Nesse processo o fibrinogênio (proteína solúvel do plasma) é convertido em fibrina (polímero insolúvel), por ação da enzima trombina. A fibrina forma uma rede de fibras elásticas que irá consolidar a formação do tampão plaquetário e o transforma em tampão hemostático (Smith, 2010; Baker, 2012).

**Figura 11:** Modelo clássico da cascata de coagulação.



Fonte: <http://bioquimicauffgv2013.blogspot.com.br/2014/05/modelos-da-coagulacao-sanguinea.html>

A via extrínseca é assim chamada por ser ativada quando por fatores extravasculares (tissulares), gerando a substância ativadora da protrombina. Ocorre quando a ativação do fator VII, pelo fator tecidual, produz a ativação do fator X. A via intrínseca inicia-se pelo contato do sangue com uma superfície diferente do endotélio normal e das células sanguíneas (Bozzini, 2004), onde a sequência de reações enzimáticas produz o coágulo. A via comum se inicia com ativação do fator X, pela combinação de várias substâncias, fator III, cálcio, fator VII e fosfolipídios teciduais na via extrínseca e, da mesma forma, o FP3, fator IX e o fator VII na via intrínseca (Banks, 1991). Ao final da cascata a trombina converte o fibrinogênio (proteína solúvel do plasma) em fibrina (polímero insolúvel), que forma uma rede de fibras elásticas que irá consolidar a formação do tampão plaquetário e o transforma em tampão hemostático (Smith, 2010; Baker, 2012).

A deficiência dos fatores de coagulação pode ocorrer por falha parcial ou total na produção ou pelo grande consumo de proteínas de coagulação. Podem ocorrer em casos congênitos ou adquiridos por deficiência de vitamina K, envenenamentos ofídicos, intoxicações, por exemplo. A consequência de tais deficiências pode levar a perdas sanguíneas menores, como equimoses e perdas maiores, como hemorragias intracavitárias (Smith, 2010; Baker, 2012).

O veneno de serpentes dos gêneros *Bothrops*, da família Viperidae, interfere na hemostasia por ações coagulantes, proteolíticas e vasculotóxicas. Essas alterações vêm sendo amplamente estudadas pela gravidade clínica dos animais envenenados (Melo e Soto-Blanco, 2014).

Na família Elapidae, algumas espécies de *Micrurus* podem alterar a hemostasia, mas ainda são poucos os relatos a esse respeito, o que enfatiza a necessidade de realizar estudos mais aprofundados sobre possíveis efeitos a nível cascata de coagulação.

A ação hemorrágica foi demonstrada experimentalmente, mas nunca relatada em envenenamentos humanos, de um modo geral (Francis *et al.*, 1997; Arce-Bejarano *et al.*, 2014). Francis *et al.* (1997), estudando o veneno da *M. frontalis*, caracterizaram parcialmente e isolaram, uma fração PLA<sub>2</sub> com capacidade hipotensora/hemorrágica em regiões viscerais, subendocárdica e pulmonar em ratos. Ação também presente nos venenos de *M. corallinus*, *M. lemniscatus* e *M. brasiliensis* (Jorge da Silva e Bucarechi, 2003). Barros *et al.* (1994) investigando a atividade hemorrágica dos venenos de três espécies de *Micrurus* em camundongos, relataram que este efeito está presente, discretamente, na espécie *M. averyi* e ausente nas espécies *M. surinamensis* e *M. spixii*.

O efeito hemolítico direto não foi evidenciado nas principais espécies de *Micrurus*, mesmo em aplicações de altas concentrações do veneno (Roodt *et al.*, 2012). A atividade hemolítica indireta está presente nos envenenamentos por serpentes do gênero, como a *M. fulvius*, *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. lemniscatus*, *M. altirostris*, *M. balyocoriphus*, *M. pyrrhocryptus*, *M. nigrocinctus* (Jorge e Bucarechi, 2003, Roodt *et al.*, 2012). Segundo Roodt *et al.* (2012), o veneno de *M. surinamensis* apresenta menor atividade hemolítica quando comparada as espécies, citadas anteriormente. Todavia, Arce-Bejarano *et al.* (2014) demonstraram que o veneno da *M. fulvius* apresentou, *in vivo*, alta capacidade de promover hemólise intravascular em camundongos e *in vitro*, alta propriedade hemolítica em eritrócitos de cães, mas sem qualquer ação sobre hemácias humanas e de coelhos. A ação hemolítica está correlacionada diretamente com a quantidade de fosfolipases presente no veneno (Roodt *et al.*, 2012).

Salazar *et al.* (2011) estudando as frações do veneno da espécie *M. tener tener*, demonstraram presença da atividade fibrinolítica. Doses baixas (entre 1 e 20 µg) do veneno de *M. tener tener*, pré-incubadas com fibrinogênio purificado induziram a formação de gel de fibrina instável, mostrando atividade tipo trombina. A atividade da plasmina (enzima que degrada

fisiologicamente a fibrina) avaliada por um micrométodo de lise de fibrina estava significativamente aumentada na presença de veneno de *M. tener tener*, o que confirmou a presença de atividade fibrinolítica nesse veneno.

Gerads *et al.* (1992) descreveram um tipo de metaloprotease presente no veneno da *Naja naja oxiana* (serpente que pertence à família Elapidae) capaz de ativar o fator V da cascata de coagulação, convertendo-o proteolicamente numa molécula de fator Va de duas cadeias, estrutural e funcionalmente diferente do fator V ativado pela trombina. A atividade do fator V ativado pelo veneno tem uma atividade de cofator consideravelmente mais baixa do que o fator V ativado pela trombina. Também foi caracterizada uma PLA<sub>2</sub> do veneno da espécie *N. haje*, identificada como o primeiro inibidor direto da trombina encontrado no veneno da família Elapidae e a primeira fosfolipase com essa função (Osipov *et al.*, 2010).

### **3.8.2. Hematologia**

Na hematologia de cães envenenados por *M. fulvius*, podem ser observados hemólise intravascular, anemia, hemoglobinúria e alterações morfológicas de glóbulos vermelhos. A hemólise foi relatada em até 72 horas após envenenamento. Em gatos envenenados pela mesma espécie de coral, não foi observada hemólise e hemoglobinúria, mesmo em altas dosagens de veneno aplicadas intravascular (Peterson, 2006).

A ocorrência de hiperfibrinogenemia e leucocitose moderada são alterações que também podem ser encontradas (Peterson, 2006).

Nos acidentes botrópicos, laquéuticos e crotálicos, exames de coagulação devem ser realizados para confirmação diagnóstica e avaliação da eficácia da soroterapia, mas nos envenenamentos elapídicos esses ainda não são exames de rotina, nos casos humanos (Secretaria de Vigilância e Saúde – Ministério da Saúde, 2009).

### **3.8.3 - Bioquímica sérica**

A bioquímica sérica pode demonstrar, principalmente, a elevação da enzima CK, devido à lesão provocada (Cecchini *et al.*, 2005; Roodt *et al.*, 2012), esse aumento também é relatado na medicina humana. Mionecrose, mioglobulinemia (resultado de rabdomiólise) e mioglobulinúria, podem ocorrer e causar danos renais, mas a nefrotoxicidade do veneno foi evidenciada apenas experimentalmente (Peterson, 2006; Roodt *et al.*, 2012).

#### **3.8.3.1 - Proteinograma**

Eletroforese é uma técnica laboratorial usada para separar os grupos de proteínas do soro. Isso possibilita medir e analisar as proteínas individualmente. Na técnica, o soro é colocado em um tipo especial de papel e exposto a uma corrente elétrica. Isso faz com que os diferentes tipos de proteínas se movimentem e se agrupem. As proteínas criam faixas separadas no papel e são

analisadas no laboratório, onde são avaliadas as concentrações de albumina e globulinas. São importantes da avaliação de inflamações de fase aguda e crônica (Oliveira *et al.*, 2015).

Não há relatos de alterações na concentração de proteínas plasmáticas após envenenamento por *Micrurus spp.*

### 3.9 – Tratamento

O tratamento é emergencial e consiste em assegurar as vias aéreas, ventilar o paciente, uma vez que as alterações no padrão respiratório ocorrem de forma rápida e progressiva; garantir acesso venoso e terapia intensiva do paciente (Gfeller e Messonier, 2006).

O soro antielapídico é mais difícil de ser produzido, em comparação com os soros anticrotálico e antibotrópico devido à limitação de coleta do veneno nas serpentes e a dificuldade de criação das espécies em cativeiro (Cardoso, 2003). Na medicina veterinária o antiveneno não está disponível.

Nos casos onde o veneno tenha ação exclusivamente pós-sináptica é indicado o uso de anticolinesterásicos (neostigmina ou a piridostigmina), como é feito nos acidentes por *M. surinamensis* (Vital Brazil, 1996; Sakate *et al.*, 2008).

Anticolinesterásicos, também conhecidos como inibidores da acetilcolinesterase, são agentes que inibem a ação da enzima acetilcolinesterase na junção neuromuscular. Essa inibição enzimática leva à redução da degradação da Ach e potencializa sua ação. O anticolinesterásico neostigmina é um composto amônio quaternário que se liga reversivelmente ao sítio esterásico da acetilcolinesterase, tornando-a inativa por aproximadamente 30 minutos. A neostigmina é administrada por via endovenosa e a ação da neostigmina é bem rápida, ideal para os envenenamentos elapídicos, que são graves. É excretada inalterada pelos rins e sua meia-vida é menos de uma hora (Appiah-Ankam e Hunter, 2004).

Deve-se sempre administrar atropina antes do uso de anticolinesterásicos com o objetivo de antagonizar os efeitos muscarínicos da acetilcolina, principalmente hipersecreção brônquica e bradicardia (Vital Brazil, 1996; Bucarechi *et al.*, 2006; Sakate *et al.*, 2008). O uso da neostigmina deve ser feito com muita cautela, realizando-se sempre um teste prévio para a verificação da resposta positiva do acidentado a este tratamento (Sakate *et al.*, 2008).

O soro antielapídico produzido no Brasil para uso humano é apresentado na forma de ampolas, contendo 10ml de solução injetável de um concentrado de imunoglobulinas específicas purificadas obtidas do plasma de equinos imunizados com uma mistura de venenos de serpentes da espécie *M. corallinus*, *M. frontalis*. Cada 10 ml de antiveneno é capaz de neutralizar 15 mg de veneno de *M. frontalis* (Cardoso *et al.*, 2003). Portanto a especificidade do soro pode não ser eficiente para acidentes envolvendo as demais espécies, assim como a *M. surinamensis*.

Ciscotto *et al.*, (2011) relataram que uma melhor opção de veneno para produção de soro antielapídico no Brasil seria a partir do veneno de *M. frontalis* associado ao veneno da *M. ibiboboca*. O antiveneno de *M. ibiboboca* mostrou forte reconhecimento para proteínas de baixa massa molecular e em conjunto com antiveneno de *M. frontalis*, mostrou excelente habilidade de reconhecer proteínas dos venenos de *M. spixii*, *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. altirostris* e *M. lemniscatus*, melhor efeito quando comparado ao antiveneno produzido com veneno de *M. corallinus*. O fator limitante, que torna inviável a produção desse soro antielapídico, segundo os

autores, se deve a escassez de veneno e pelo fato de a *M. ibiboboca* ser uma espécie rara de ser encontrada.

Diante do exposto, o estudo do quadro clínico com especial atenção para os sistemas neurológico e cardíaco, além do conhecimento das lesões causadas pelo veneno de *M. surinamensis*, uma serpente que possui veneno bem diferente das demais cobras-corais, poderá auxiliar o clínico no manuseio do paciente envenenado, além de poder direcionar o tratamento, que é tão deficiente na medicina veterinária.



## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), certificado nº 192/2016.

### 4.1 – Veneno

O *pool* de veneno, liofilizado, das serpentes da espécie *M. surinamensis*, proveniente de serpentes da Amazônia peruana foi obtido pelo *Instituto Nacional de Salud* (INS) de Lima (Peru) e, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Para a inoculação, o veneno liofilizado foi diluído em água ultra-pura e adicionado um tampão fosfato salina - *Phosphate-buffered saline* (PBS) / Albumina de soro bovino - *bovine serum albumine* (BSA) a 0,1% para a aplicação da dose referente ao peso do animal. PBS/ BSA foi utilizado na preparação das soluções, devido a características isotônicas da substância e pela ausência de toxicidade em relação às células, mantendo a estabilidade das proteínas do veneno e não interferindo no local de aplicação.

A dose de veneno de *M. surinamensis* utilizada (0,75 µg/g de peso vivo) foi baseada em trabalhos de Roodt *et al.* (2012), que relataram uma dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) para camundongo variando entre 0,45 a 1,55 µg/g de peso vivo, e também em trabalhos não publicados do Prof. Carlos Chávez Delfin Olórtegui do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, o qual relatou uma DL<sub>50</sub> de 15 µg para camundongo de 20g.

### 4.2 - Animais

Foram utilizadas 12 cobaias (*Cavia porcellus*), machos adultos albinos da linhagem *English short ear*, com peso médio de 700 gramas provenientes de um criatório comercial situado no município de Igarapé, MG. Os animais foram alojados no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG, mantidos em caixas plásticas com dimensão 120 x 60 x 60 cm, forradas de maravalha, com controle adequado de luz (7 às 19 horas), temperatura (22 a 24 °C). O período de adaptação foi de dois dias para ambientação e os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

O modelo animal escolhido (cobaias), se deve a característica dócil dessa espécie, possibilidade de maior volume de sangue na coleta, comparada a camundongos ou ratos e a possibilidade de se fazer o exame clínico e eletrocardiográfico com maior facilidade.

### 4.3 - Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo veneno (n=6) que recebeu por via intramuscular (IM) a dose de 0,75 µg de veneno de *M. surinamensis* /g de peso vivo diluídos em 0,2 ml de PBS/BSA. O grupo controle (n=6) que funcionou como grupo testemunha, recebeu 0,2 ml de PBS/BSA também via IM.

A aplicação de veneno ou PBS/BSA foi feita utilizando seringa de insulina (1ml) e agulha 13 x 4,5 mm (Descarpack) na coxa esquerda, região do músculo bíceps femoral, por via IM, após tricotomia e assepsia da área para visualização de possíveis alterações locais.

Os animais foram identificados na orelha com o uso de canetas especiais, e numerados de 1 a 6 (grupo veneno) e de 7 a 12 (grupo controle).

### 4.4 - Exame físico

Os exames, físico geral e especificamente neurológico, foram realizados antes (Tempo 0 – T0) e após a inoculação do veneno de *M. surinamensis* aos 30 minutos (Tempo 1 - T1), uma hora (Tempo 2 - T2) e no período entre uma hora e meia a duas horas (Tempo Final – TF) da aplicação do veneno.

O tempo limite de duas horas foi definido para que se pudesse realizar o exame físico e os demais exames sem a ocorrência de morte dos animais. O tempo de sobrevivência de camundongos, em estudos de DL<sub>50</sub> do veneno de *M. surinamensis*, é de até três horas (Gutiérrez *et al.*, 1983, Roodt *et al.*, 2012).

Os parâmetros avaliados foram comportamento, coloração e aspectos das mucosas (ocular e oral), temperatura corporal por meio de termômetro digital e frequência cardíaca e respiratória, medidas por meio de ausculta torácica com auxílio de estetoscópio.

No exame neurológico foi feita uma avaliação minuciosa de cada animal (Tabela 1). Ressalta-se que não existe na literatura uma padronização do exame ou tabela de pontuação para avaliação neurológica para essa espécie animal, desse modo, utilizou-se testes semelhantes aos utilizados em coelhos em outro experimento da equipe (Branco, 2015).

**Tabela 1:** Exame físico neurológico em cobaias.

<b>Parâmetro físico</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Pontuação</b>
<b>Estado mental</b>	Alerta ou alterado (depressão, estupor ou coma)	<b>0 – Normal</b> <b>1 – Deprimido</b> <b>2 – Estupor</b> <b>3 – Coma</b>
<b>Postura</b>	Normal ou inadequada (decúbito lateral ou esternal)	<b>0 – normal</b> <b>1 – inadequada</b>
<b>Marcha</b>	Normal ou anormal (ataxia, paresia/paralisia, claudicação)	<b>0 – Ambulatório; sem alterações</b> <b>1 – Ambulatório; paresia e/ou ataxia</b> <b>2 – Não ambulatório</b>
<b>Movimentos involuntários</b>	Tremores, miotonias, mioclonia, crises epiléticas	<b>0 – ausente</b> <b>1 – presente</b>
<b>Reações posturais</b>	Testes positivos, diminuído ou negativo: saltitamento, propriocepção e carrinho de mão	<b>0 – Normal</b> <b>1 – Reduzido</b> <b>2 – Ausente</b>
<b>Nervos cranianos</b>	Resposta normal, presença ou déficit: reflexo pupilar, reflexo palpebral, reflexo corneano, nistagmo, estrabismo, reflexo de deglutição e tônus da língua	<b>0 – Normais</b> <b>1 – Déficit</b>
<b>Reflexos miotáticos (espinhais)</b>	Presença, ausência ou diminuição: reflexo patelar, tônus muscular, reflexo de retirada nos membros e reflexo perineal	<b>0 – Normal</b> <b>1 – Reduzido</b> <b>2 – Ausente</b>
<b>Tônus muscular</b>		<b>0 – Normal</b> <b>1 – Reduzido</b> <b>2 – Ausente</b>
<b>Nocicepção</b>	Presença ou ausência da percepção de dor superficial e profunda (mesmo teste aplicado em reflexo de retirada)	<b>0 – presente</b> <b>1 – Ausente</b>
<b>Alteração no padrão respiratório</b>	Normal (tóraco-abdominal) ou alterada	<b>0 – Ausente</b> <b>1 – Presente</b>

Fonte: Adaptado de Branco, 2015.

Obs: Quanto maior a pontuação do animal, maior o seu comprometimento neurológico, sendo a pontuação máxima 16 pontos.

#### 4.5 – Eletrocardiograma

Os eletrocardiogramas (ECG) foram realizados em aparelho eletrocardiográfico (TEB ECGPC) na derivação DII, antes da administração do veneno (T0) e antes da morte ou eutanásia no tempo final (TF), durante cinco minutos ininterruptos em cada animal. O exame foi realizado com o animal em repouso, decúbito dorsal e contido manualmente, sem sedação. Avaliou-se a frequência cardíaca, as ondas P, T, o complexo QRS e o comportamento geral do traçado.

#### 4.6 - Exames laboratoriais

As coletas sanguíneas foram realizadas em dois tempos, antes da inoculação do veneno (T0) e no tempo final (TF) determinado, período entre uma hora e meia a duas horas após a inoculação do veneno. Foi puncionada a veia jugular utilizando-se seringa de 3ml e agulha 25 x 7 mm (BD Solomed) e o sangue foi acondicionado em tubos com ácido etilenodiaminotetracético tripotássico ( $K_3EDTA$ ) a 10%, citrato de sódio a 10% para obtenção do plasma e sem anticoagulante para obtenção do soro, após centrifugação (3000 rotações por minuto durante 10 minutos) no laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras foram aliqüotadas, identificadas e armazenadas a  $-20^{\circ}C$  até o processamento.

O hemograma foi feito em analisador hematológico automático (Sysmex pocH-100iv Diff) e confecção de esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro, corados com panótico, para posterior contagem diferencial de leucócitos. O volume globular foi determinado por meio do método do microhematócrito (Thrall *et al.*, 2012).

O perfil bioquímico obtido por meio das dosagens séricas de creatina quinase total (CK) e sua isoenzima MB (CK-MB), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), ureia, creatinina, ácido úrico, cálcio, fósforo, potássio e sódio por método colorimétrico cinético utilizando kits comerciais (BIOCLIN®), no analisador bioquímico semi-automático (TP Analyzer Basic).

A concentração de proteínas totais foi estimada por refratometria, e o perfil proteico fracionado foi obtido por eletroforese horizontal em gel de agarose a 12% e tampão TRIS, utilizando amostras de soro congeladas, com tempo de corrida de 30 minutos. Os géis foram corados com amido negro e descorados em uma série de etanol e ácido acético. A leitura foi feita por um *scanner* com *software* SE250 da CELM®. A concentração proteica de albumina e globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) em g/dl foi determinada através da multiplicação do percentual de cada fração obtida pela concentração da proteína total.

Para os testes de coagulação foram feitas coletas em tubos de vidro siliconizados ou tubos de poliestireno contendo citrato de sódio a 10%. As amostras citratadas foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm para obtenção do plasma e feita leitura em um coagulômetro CLOTimer® para avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), tempo de protrombina (TP) e concentração de fibrinogênio por sistema fotométrico utilizando kits BIOCLIN®.

#### **4.7 – Eutanásia**

Todos os animais do grupo controle foram eutanasiados até o tempo limite de duas horas de avaliação, pelo método de sangria sob anestesia geral com uso de tiopental na dose de 55 mg/kg (Fiocruz, 2002) associado à lidocaína na concentração de 10 mg/mL, injetado via intraperitoneal (IP) (CONCEA, 2013).

No grupo veneno, três animais que apresentavam grave quadro clínico e não foram à óbito dentro das primeiras duas horas foram eutanasiados como objetivo evitar o sofrimento e três animais foram a óbito no período de até duas horas. Por isso o tempo final (TF) está compreendido no período entre uma hora e meia a duas horas após a aplicação do veneno

#### **4.8 – Alterações macro e microscópicas**

Os animais foram necropsiados e coletados fragmentos de coração, pulmões, fígado, rins, baço, cérebro e músculo, fixados em formol a 10%. Os fragmentos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções de cada tecido foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica em microscopia óptica.

Para a microscopia eletrônica os mesmos órgãos citados anteriormente foram fixados em solução de glutaraldeído a 2% durante 24 horas e depois mantidos em tampão fosfato de sódio. Desses foram selecionados um fragmento de músculo, coração e cérebro, do grupo controle e outro do grupo veneno para processamento do material no Centro de Microscopia da UFMG. Os fragmentos sofreram pós-fixação em tetróxido de ósmio e embebição em resina Epon. Cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina e ultrafinos com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV.

#### **4.9 - Análises Estatísticas**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Os dados foram avaliados estatisticamente com o auxílio do programa SAS for Windows v.8.0. As diferenças estatisticamente significantes dos dados provenientes de mensurações repetidas foram determinadas utilizando a análise de regressão por modelo misto por meio do PROC MIXED do SAS, sendo cada animal determinado como uma unidade fixa e o tempo como variável (Wolfgang; Chang, 1996; Littell *et al.*, 1998). O nível de significância para todas as análises foi estabelecido como  $P < 0,05$ .

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Exame físico

#### 5.1.1 – Geral

As alterações clínicas observadas em cobaias que receberam veneno de *M. surinamensis* foram predominantemente neurológicas, como esperado nos envenenamentos por cobras-corais (Bucarechi *et al.*, 2006). A ocorrência dos sinais clínicos se deu de forma rápida e progressiva após 1h a 1h30 da inoculação do veneno. A morte dos animais 1,2 e 3 ocorreram entre 1h30 às 2h da inoculação do veneno, os demais animais foram eutanasiados ao tempo de duas horas.

Ao exame clínico a aferição da temperatura retal (TR - °C) e avaliações das frequências respiratória (FR - movimentos por minuto) e cardíaca (FC – batimentos por minuto) foram realizadas em todos os tempos de avaliação clínica (T0, T1, T2, TF), mas para critério de comparação, os resultados apresentados na tabela 2, mostram os valores encontrados apenas nos tempos T0 e TF.

**Tabela 2:** Resultados médios e desvio padrão dos parâmetros físicos correspondentes à temperatura retal (TR - °C), frequência respiratória (FR - mpm) e frequência cardíaca (FC - bpm) nos animais dos grupos veneno e controle.

Parâmetro	Momentos	Grupos /desvio padrão	
		Veneno	Controle
<b>TR</b>	T0	36,2 ± 0,8	35,8 ± 0,7
<b>°C</b>	TF	35,7 ± 1,1	36,5 ± 0,7
<b>FR</b>	T0	122,0 ± 8,7	118,0 ± 4,2
<b>Mpm</b>	TF	97,0 ± 23,3	120,7 ± 15,5
<b>FC</b>	T0	171,0 ± 7,8 <b>A</b>	175,3 ± 21,4
<b>Bpm</b>	TF	187,7 ± 34,5 <b>a,B</b>	163,3 ± 19,3 <b>b</b>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância  $p < 0,05$ .

A temperatura retal e frequência respiratória (FR), não mostraram diferença significativa na comparação entre os tempos T0 e TF de cada grupo.

Ao tempo final de avaliação (TF) quatro cobaias (animais 1, 2, 3 e 6) do grupo que recebeu veneno de *M. surinamensis* apresentaram mucosas cianóticas mostrando a diminuição da oxigenação para os tecidos. Ao mesmo tempo, todos os animais mostraram um aumento significativo ( $P > 0,05$ ) da frequência cardíaca (FC) no TF, que passou de 171,0 para 187,7 bpm (Tabela 2). Esse valor médio final (187,7 bpm) também foi significativamente maior que o valor médio do grupo controle (163,3 bpm). Aumentos na frequência cardíaca, alteração na irrigação do coração, danos à musculatura cardíaca, alterações na polarização e despolarização cardíaca

(por alterações metabólicas ou fármacos, e nesse caso pela ação do veneno (Fernández-Armenta *et al.*, 2013).

O veneno da *M. surinamensis* possui efeito pós-sináptico bloqueando receptores colinérgicos nicotínicos e conseqüentemente a transmissão neuromuscular (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). Assim os animais, possivelmente, pela depressão do SNC mostraram certa incapacidade de contração das musculaturas envolvidas na respiração (diafragma e músculos intercostais), pelas alterações no padrão respiratório observada ao exame físico (respiração passou de tóraco-abdominal para abdominal). Como compensação a uma alteração no controle do marcapasso natural do coração (nodo SA), provavelmente pelo bloqueio também do SNA, ocorreu um aumento da FC na tentativa de manter a circulação e oxigenação corporal. Isso é decorrente da automaticidade do coração, que mesmo com bloqueio neurológico ou lesão muscular, tenta manter o funcionamento gerando impulsos celulares (Fernández-Armenta *et al.*, 2013).

Após o exame físico, a progressão dos sinais se agravou nos animais do grupo veneno, especialmente a FC, que mostrou uma diminuição significativa (observada ao exame eletrocardiográfico), quando o músculo cardíaco já não conseguia mais gerar e transmitir impulsos excitatórios. Estes resultados também serão demonstrados e discutidos na seção de eletrocardiograma.

Nenhuma alteração de TC, FR e FC foi observada nos animais do grupo controle que receberam PBS/BSA (Tabela 2).

### **5.1.2 - Exame neurológico**

As cobaias são animais muito dóceis, normalmente ficam bem quietos para realização do exame físico. Alguns reflexos testados como saltitamento, não são bem executados nesses animais nos membros pélvicos, pois já se apresentam normalmente diminuídos.

O tamanho pupilar normal da cobaia está sempre em midríase e o reflexo à luz muito lento, quando comparado a outras espécies, sendo o reflexo consensual à luz ausente ou bastante sutil. A sensibilidade facial é demonstrada de forma muito sutil, assim como o reflexo perineal.

A maioria das cobaias avaliadas também não realiza bem o reflexo de retirada do membro pélvico (não recolhe o membro ao ser estimulado), mas são animais bastante sensíveis à dor.

Animais do grupo controle (em todos os tempos) e animais do grupo veneno ao T0 apresentaram normalidade para a espécie em todos os testes aplicados (padrão observado nos animais hígidos). Nos animais que receberam veneno de *M. surinamensis*, as alterações mostraram-se progressivas após o envenenamento como comprovado pela pontuação obtida no exame neurológico apresentado na tabela 3.

**Tabela 3:** Pontuação neurológica por animal e valor médio dos animais inoculados com veneno de *M. surinamensis*, nos diferentes tempos de avaliação (Tempo zero, Tempo 1, Tempo 2 e Tempo Final - TF).

<b>Pontuação por animal, no grupo veneno</b>				
<b>Animal</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>TF</b>
<b>1</b>	0	0	10	15
<b>2</b>	0	1	3	16
<b>3</b>	0	0	6	15
<b>4</b>	0	0	1	3
<b>5</b>	0	0	1	3
<b>6</b>	0	0	1	11
<b>Média</b>	<b>0</b>	<b>0,2</b>	<b>3,7</b>	<b>10,5</b>

Obs: A pontuação máxima por animal pode ser de 16 pontos, correspondente ao somatório de todos os parâmetros avaliados.

O aumento progressivo da pontuação mostrou o comprometimento nervoso observado a partir de 30 minutos (T1) de avaliação e o valor máximo ao tempo final (TF). A frequência das alterações observadas nos animais do grupo veneno em cada tempo de avaliação estão detalhadas na tabela 4.

**Tabela 4.** Frequência de alterações ao exame neurológico de cobaias do grupo veneno.

<b>Número de animais (n=6), em cada um de seus tempos de observação</b>				
<b>Alteração clínica</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>TF</b>
<b>Alteração do estado mental</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>6</b>
<b>Postura inadequada</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>Marcha alterada</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>Presença de movimentos involuntários</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Reações posturais reduzidas ou ausentes</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>Déficit dos nervos cranianos</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Reflexos miotáticos (espinhais)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>Tônus muscular reduzido ou ausente</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>Nocicepção reduzida ou ausente</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
<b>Alteração no padrão respiratório</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>6</b>



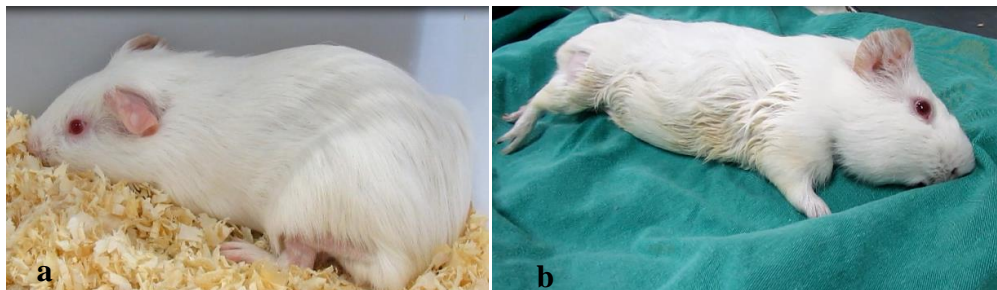
Até o T1 (30 minutos após a inoculação do veneno), apenas um animal (animal 2) apresentou tremores e movimentos de mastigação fora do padrão normal, enquanto que os demais, nada apresentaram de anormalidade ao exame físico.

A partir do T2 (1h após a inoculação do veneno), todos os animais apresentaram alterações neurológicas, com destaque para o animal 1 que apresentou depressão no estado mental, permanecendo em decúbito esternal e exibiu marcha incoordenada, presença de espasmos, tremores, ruídos respiratórios (em nível nasal), reações posturais diminuídas, déficit nos nervos cranianos com grande diminuição nos reflexos pupilar e corneano (oftalmoplegia), diminuição do reflexo de deglutição e tônus da língua, diminuição do tônus muscular de um modo geral, reação à dor diminuída e respiração abdominal. Este animal teve uma evolução muito rápida dos sintomas, apresentando uma paralisia flácida e estado comatoso. Ao apresentar estado grave, que provavelmente, o levaria a morte, este animal foi anestesiado e procedido a eutanásia, cerca de 30 minutos após o T2. Salienta-se que antes da eutanásia, foi realizado exame físico e esse considerado como TF.

Os demais animais, ao T2, manifestaram poucas alterações quando comparados ao animal 1. Os animais 2 e 3 apresentaram vocalização, alteração no padrão respiratório (mais abdominal e entrecortada), ruídos respiratórios (em nível nasal) e diminuição nas reações posturais. Por outro lado, os animais 5 e 6 não demonstraram qualquer tipo de alteração clínica nesse tempo de avaliação e, o animal 4, alterou o padrão respiratório (respiração tipo abdominal) e mostrou muito incômodo e dor, no local da inoculação.

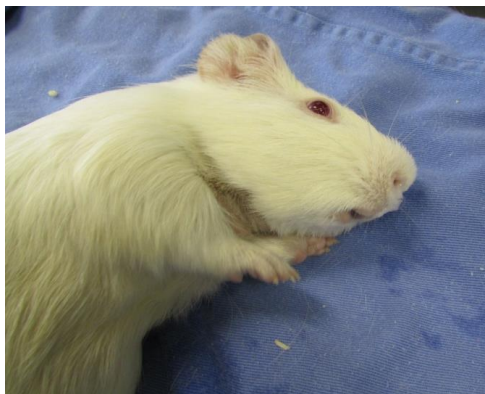
Ao tempo final (período entre 1h e 30 min a 2h após a inoculação do veneno), todos os animais avaliados apresentaram alterações neurológicas, do estado mental e respiratório. A mudança no estado mental, variou de depressão (animais 4, 5 e 6) à comatoso (animais 1, 2 e 3) e o padrão respiratório com respiração tipo abdominal (Figura 12). Para os demais parâmetros, o animal 4 apresentou tremores e pequena redução nas reações posturais nos testes de saltitamento e propriocepção, principalmente no membro da aplicação e o animal 5 mostrou somente leve diminuição no tônus muscular. Os animais (1, 2, 3 e 6) mostraram reações mais graves, permanecendo em decúbito lateral ou esternal, apresentando respiração ruidosa, perda do tônus muscular (tetraplegia flácida), oftalmoplegia, e principalmente ausência de respostas nos testes para avaliação dos reflexos miotáticos, reações posturais e nocicepção. Também apresentaram presença de material espumoso nas narinas (Figura 13), boca aberta e posição ortopnéica, evidenciando assim a dificuldade respiratória. O quadro evoluiu para um estado mais grave e realizou-se a sedação (dos animais 1, 2 e 3 (entre 1h30 e 2h) para a sangria. Nos animais 4, 5 e 6 foi realizada eutanásia ao tempo de 2h, tempo limite estipulado para as avaliações.

**Figura 12 (a e b):** Evolução clínica dos animais envenenados. Na foto da esquerda (a), animal extremamente prostrado. Foto da direita (b): animal em decúbito lateral esquerdo com paralisia total, oftalmoplegia e dificuldade respiratória.



Fonte (a e b): Arquivo próprio.

**Figura 13:** Animal do grupo veneno com paralisia total, espasticidade dos membros anteriores e secreção nasal.



Fonte: Arquivo próprio.

O agravamento dos sinais clínicos em quatro animais envenenados e a ocorrência de alterações mais brandas do envenenamento em dois animais mostra a variabilidade na resistência individual nos animais. A utilização de uma  $DL_{50}$  prevê a possível resistência em alguns indivíduos à determinada dose, que pode levar à morte 50% dos animais (Eaton e Gilbert, 2008).

As alterações clínicas, em período tão curto (até duas horas), apresentadas pelos animais que receberam veneno se devem possivelmente a baixa massa molecular dos componentes do veneno elapídico, que permite uma rápida distribuição pelo organismo, podendo alcançar diversos órgãos (Lomonte *et al.*, 2016). A ação do veneno da *M. surinamensis*, que é de ação pós-sináptica, atua em nível de SNC bloqueando a transmissão do impulso nervoso (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

A alteração do estado mental e do comportamento, observados em todos os animais, mostra que o veneno alcançou rapidamente o SNC, afetando principalmente as regiões do cérebro e do tronco encefálico, responsáveis pelo controle da maioria das funções do organismo animal. O

sistema límbico é o responsável pelo comportamento e estado mental e está localizado no cérebro, na região subdividida como prosencéfalo (Martins *et al*, 2013). Desse modo, pelos sinais clínicos causados pelo veneno, acredita-se que o mesmo também deve atuar bloqueando esse sistema.

As alterações provocadas pelo veneno nas transmissões dos impulsos pelo tronco encefálico parecem ser responsáveis pelas alterações clínicas vistas na maioria dos animais. Além de alteração no estado mental, também foi observado déficit nos nervos cranianos com a ausência de resposta nos testes de reflexo palpebral (pares V e VII), reflexo de deglutição (pares IX e X) e tônus da língua (par XII), observado na maioria dos animais envenenados.

Alteração no padrão respiratório também se deve a alterações na transmissão nervosa pelo tronco encefálico, que também atua no seu controle (Taylor, 2010), mas pode estar associada principalmente ao bloqueio neuromuscular da contração dos músculos respiratórios (Bucaretche *et al.*, 2006), principalmente o diafragma (ação potencial do veneno).

Os receptores nicotínicos estão amplamente distribuídos no SNC e alguns deles regulam parcialmente a liberação de dopamina e de glutamato; e outros controlam a liberação de GABA e a resposta de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo (Ventura *et al.*, 2009). Assim o possível bloqueio, tanto excitatório quanto modulador do impulso nervoso, pode promover uma depressão geral do SNC agravando progressivamente durante o tempo, sem tratamento do envenenamento.

A não transmissão nervosa pela medula espinhal aos neurônios motores inferiores (NMI) conduziu à perda do tônus muscular, bloqueando o estímulo elétrico para contração levando à paralisia flácida em quase todos os animais. O bloqueio da regulação da função de tecidos como o coração (bloqueio também da atividade do SNA) pode ter propiciado o comprometimento geral do organismo, com a baixa oxigenação e nutrição dos tecidos.

Nos casos humanos avaliados durante 20 anos em São Paulo, relatados por Bucaretche *et al.* (2006), o envenenamento por cobra-coral classificado como moderado, é o mais comum. Esse quadro é marcado por dor local, fraqueza, parestesia ou paralisia total, ptose palpebral, disfagia e salivação excessiva e o tratamento feito com soro antielapático normalmente é eficiente. Nos casos graves (segundo mais frequente segundo os mesmos autores), ocorrem, além dos sintomas citados, fasciculações, perda da habilidade de permanecer de pé e respiração mais superficial, sendo que para o tratamento, a utilização de um anticolinesterásico se torna mais comum.

Em envenenamentos por serpentes do gênero *Crotalus* (Família Viperidae) as manifestações neurológicas surgem nas primeiras horas e melhoram a partir do segundo dia do acidente. A presença de fácies miastênica é característico, evidenciando ptose palpebral uni ou bilateral, flacidez da musculatura da face, midríase bilateral semiparalítica, oftalmoplegia, visão turva e/ou diplopia, indicando, portanto, o comprometimento do III, IV e VI pares cranianos, diplopia secundária à oftalmoplegia e visão turva (Barraviera, 1990), semelhante aos achados no envenenamento pela *M. surinamensis*.

## 5.2 – Eletrocardiograma

Os resultados das medidas de amplitude, duração das ondas P e R e duração dos intervalos PR, QT e complexo QRS, além da frequência cardíaca calculada a partir do traçado, estão apresentados na tabela 5. As alterações nos traçados eletrocardiográficos por animal estão apresentadas na tabela 6.

**Tabela 5:** Média e desvio padrão de medidas das ondas P (ms e mV), R (mV) e T (mV); intervalos PR (ms), QT (ms); complexo QRS (ms) e frequência cardíaca (bpm) obtidas a partir do exame eletrocardiográfico de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h (Tempo Final) após a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
<b>Onda P</b> (ms)	T0	31,4 ± 5,72	29,4 ± 2,16
	TF	35,5 ± 4,70	31,1 ± 2,00
<b>Onda P</b> (mV)	T0	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,02
	TF	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02
<b>PR</b> (ms)	T0	60,2 ± 11,1 <b>A</b>	62,8 ± 4,59
	TF	84,9 ± 29,3 <b>a,B</b>	64,0 ± 3,63 <b>b</b>
<b>QRS</b> (ms)	T0	31,2 ± 2,44 <b>A</b>	32,5 ± 6,22
	TF	34,3 ± 2,21 <b>B</b>	34,4 ± 4,09
<b>Onda R</b> (mV)	T0	0,5 ± 0,28 <b>A</b>	0,5 ± 0,14 <b>A</b>
	TF	0,7 ± 0,25 <b>B</b>	0,6 ± 0,20 <b>B</b>
<b>QT</b> (ms)	T0	113,2 ± 14,2 <b>A</b>	113,1 ± 14,9
	TF	135,9 ± 26,1 <b>a,B</b>	112,8 ± 12,0 <b>b</b>
<b>Onda T</b> (mV)	T0	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,02
	TF	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02
<b>FC (TEB)</b> (bpm)	T0	300,2 ± 48,9 <b>A</b>	305,6 ± 33,7
	TF	200,0 ± 96,5 <b>a,B</b>	307,7 ± 23,5 <b>b</b>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância  $p < 0,05$ .

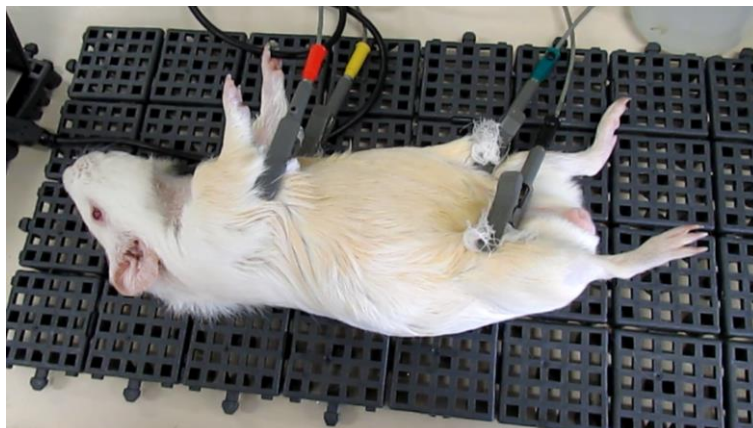
Obs: Medidas das ondas P (ms e mV), R (mV) e T (mV); intervalos PR (ms), QT (ms); complexo QRS (ms) e frequência cardíaca (bpm) obtidas no equipamento TEB (FC TEB).

**Tabela 6:** Alterações eletrocardiográficas encontradas em cobaias, antes (Tempo zero) e 2h (Tempo Final) após a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).

Animal	Alterações	
	T0	TF
1	Sem alterações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BAV 3º grau</li> </ul>
2	Sem alterações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FC reduzida</li> <li>• Extrassístole Ventricular (ventrículo esquerdo)</li> <li>• Parada sinusal</li> <li>• Escape juncional</li> <li>• BAV 1º</li> <li>• Extrassístole supraventricular</li> <li>• BAV 3º</li> </ul>
3	Sem alterações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arritmia sinusal</li> <li>• Parada sinusal</li> <li>• Escape juncional</li> <li>• Extrassístole supraventricular</li> <li>• BAV 2º</li> <li>• BAV 3º</li> <li>• BAV 3º multifocal</li> </ul>
4	Sem alterações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FC reduzida</li> </ul>
5	Sem alterações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FC reduzida</li> <li>• Extrassístole ventricular</li> </ul>
6	Sem alterações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FC reduzida</li> <li>• BAV 3º multifocal</li> </ul>
<b>Grupo controle</b>	Sem alterações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alterações</li> </ul>

Alguns animais apresentaram estado comatoso ao tempo final de avaliação, não necessitando de contenção manual (Figura 14). As alterações observadas nos animais do grupo veneno foram progressivas ao longo da avaliação eletrocardiográfica. Os animais de um modo geral começaram com uma diminuição da frequência cardíaca, bloqueios atrioventriculares (BAV) de 1º, 2º e 3º graus e extrassístoles ventricular (de ventrículo esquerdo) e supraventricular em diversas áreas do traçado. Apenas um animal do grupo veneno não apresentou alterações significativas ao eletrocardiograma.

**Figura 14:** Cobaia do grupo veneno sendo submetido ao exame eletrocardiográfico, duas horas após a injeção de veneno de *M. surinamensis*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Todos os animais apresentaram marca-passo migratório, inclusive os do grupo controle. Esse achado, não é considerado uma patologia, por isso não foi apresentado na tabela de alterações individuais.

A onda P representa despolarização dos átrios e sua duração caracteriza o tempo gasto pelo impulso para atravessar os átrios vindos do nodo SA. No traçado normal, derivação DII, a onda P é positiva (está acima da linha base), pequena e arredondada (Burtnick e Tilley, 2004).

Avaliando a onda P, houve um aumento na duração da onda nos dois grupos avaliados, mas esse aumento não mostrou diferença estatística na comparação entre os T0 e TF. Em amplitude, praticamente não houve diferença entre os tempos, nos grupos. O aumento na duração da onda P, sem significado patológico pode ocorrer em casos de marca-passo migratório. O marca-passo migratório é marcado por ondas P mais altas e estreitas durante a inspiração e ondas mais achatadas e largas durante a expiração, pode ocorrer devido à própria movimentação do animal e ao estresse provocado pela manipulação para realização do exame (Ware, 2010). Foi observado em todos os animais avaliados, tanto do grupo veneno quanto do grupo controle a presença desse evento, portanto assim como ocorre em outras espécies, à ocorrência do marca-passo migratório não representa em cobaias alguma patologia e não apresenta relação com o veneno.

O ritmo regular do coração é chamado de ritmo sinusal normal. É o mecanismo normal para iniciar a sístole cardíaca, que parte do nodo SA e se estende para os átrios, nodo AV e ventrículos. Os intervalos P-QRS-T são normais e qualquer alteração nas ondas e intervalos, indica a presença de anormalidade na formação e/ou condução do impulso, gerando as arritmias (Burtnick e Tilley, 2004) (Figura 15). São tolerados até 10% de variação entre os intervalos RR para se considerar o ritmo regular sinusal (Ware, 2010).

**Figura 15:** Traçado eletrocardiográfico normal de cobaia (animal 6) do grupo veneno (Tempo zero). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.



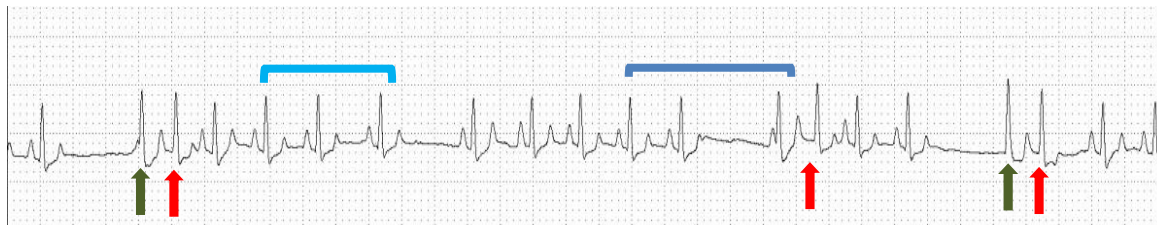
A frequência cardíaca pode ser medida a partir do cálculo entre intervalos RR em cerca de 10 cm do traçado a 50 mm/s (Burtnick e Tilley, 2004). Através do TEB todas as medidas são aferidas de forma rápida e mais precisa.

O animal 3 (grupo veneno) mostrou ao ECG, arritmia sinusal, uma irregularidade no ritmo sinusal originado no nodo SA, marcado por períodos de alternância entre frequência cardíaca mais lentas e mais rápidas (Figura 16). Estas irregularidades podem estar relacionadas à respiração, aumentando com a inspiração e diminuindo com a expiração, devido ao aumento do tônus vagal. A arritmia sinusal ocorre quando há um aumento maior que 10% e menor que o dobro entre os intervalos RR no traçado (Ware, 2010).

A parada sinusal ocorreu em dois animais do grupo veneno, animal 2 e 3. Esse tipo de alteração ocorre quando o ritmo sinusal é interrompido por falha prolongada e ocasional do nodo SA em iniciar um impulso, impedindo que o impulso gerado no nodo SA seja transmitido aos átrios (Figura 16). Com as pausas prolongadas podem ocorrer períodos de baixo débito cardíaco (volume de sangue ejetado por minuto). O intervalo RR nesses casos apresenta medidas maiores que o dobro de intervalos anteriores e pode estar associada à bradicardia (Ware, 2010). A parada ou bloqueio sinusal pode ocorrer, dentre outros fatores, pela toxicidade de algumas drogas, desequilíbrio eletrolítico, doença cardíaca degenerativa (Burtnick e Tilley, 2004) e no caso desse estudo associado à neurotoxicidade e miotoxicidade do veneno.

Quando o ritmo não retorna à atividade sinusal normal a tempo, ocorrem complexos de escape (Figura 16). Isso ocorreu em dois animais, animais 2 e 3, os mesmos que mostraram parada sinusal. Esse ritmo de escape ocorre geralmente quando o nodo SA reduz a frequência ou para. A atividade intrínseca dos marca-passos das regiões mais baixas, da junção atrioventricular ou dos ventrículos resgata o ritmo cardíaco após a pausa. A ativação do marca-passo subsidiário pela falha do marca-passo principal funciona como mecanismo de resgate do coração, gerando os escapes juncionais (Burtnick e Tilley, 2004; Ware, 2010).

**Figura 16:** Arritmia sinusal (azul claro), parada sinusal (azul escuro), escape juncional (seta verde), extrassístole supraventricular (seta vermelha), apresentadas pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final de avaliação (2h após o envenenamento). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.



Todos os animais apresentaram uma diminuição acentuada da frequência cardíaca com nível de significância  $p < 0,05$ , passou de 300,2 para 200,0 bpm. Essa diminuição da frequência cardíaca e alterações no ritmo sinusal, descritas acima, apareceram juntamente com os sinais neurológicos, mostrando a distribuição do veneno por todos os tecidos. O bloqueio neuromuscular causado pelo veneno nos receptores colinérgicos nicotínicos de Ach na musculatura esquelética ocorre também no músculo cardíaco em nível ganglionar (SNA) e pós-ganglionar do sistema parassimpático. O coração ainda consegue gerar impulsos devido à automaticidade intrínseca nos locais atrial, juncional e ventricular, que apresentam diferentes taxas normais de impulsos. Esses impulsos podem responder de forma anormal e gerar uma taquicardia, bradicardia, tornar o músculo muito excitável (premature) ou ausente (bloqueio) (Burtneck e Tilley, 2004; Ware, 2010). Nos casos dos animais avaliados prevaleceu a bradicardia e ocorreram bloqueios atrioventriculares e complexos prematuros.

Os animais 2 e 3 do grupo veneno, apresentaram ao eletrocardiograma extrassístoles supraventriculares (Figuras 16 e 18). Essas extrassístoles são causadas por impulsos supraventriculares originados em outro sítio que não seja o nodo SA, aumentando a automaticidade das fibras miocárdicas dos átrios. Uma onda P prematura ectópica (diferente das ondas normais) interrompe o ritmo normal e pode apresentar intervalo PR mais longo que o normal do traçado. Elas podem estar associadas à insuficiência mitral ou miocardiopatias (Burtneck e Tilley, 2004; Ware, 2010).

Os animais 2 e 5 do grupo veneno apresentaram outro tipo de complexo prematuro, uma extrassístole ventricular (Figura 17). Essa extrassístole ventricular ocorre pela geração do impulso cardíaco diretamente no ventrículo e não no nodo SA, e se deve ao aumento da automaticidade e reentrância. O complexo ventricular prematuro, devido ao comprometimento da perfusão dos tecidos, promove efeitos cardiovasculares secundários, tais como, complexo QRS tipicamente largo e bizarro, onda P sem o complexo QRS e pausa compensatória após o complexo bizarro. Estas alterações levam à fraqueza, intolerância ao exercício, síncope e morte súbita (Ware, 2010; Puerta *et al.*, 2013).



**Figura 17:** Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) apresentado pelo animal 1 do grupo veneno após 1h e 30min após a injeção do veneno de *M. surinamensis*. Derivação D2, 50 mm/s, 2N.

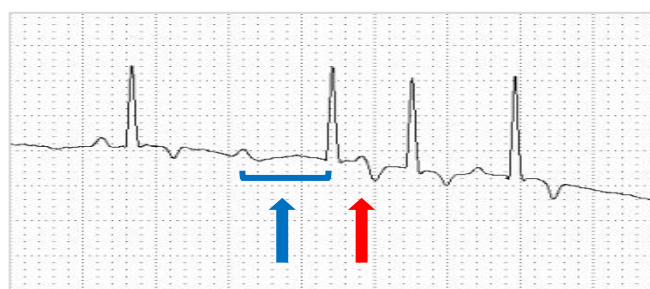


Os complexos prematuros podem ser devido a miotoxicidade do veneno de *M. surinamensis* que danifica as fibras musculares miocárdica, comprometendo a contração das mesmas, além do bloqueio neuromuscular dos receptores de Ach.

O intervalo PR reflete o período do início da ativação atrial, condução pelo nodo AV, feixe de His e fibras de Purkinje (Ware, 2010). É medido do início da onda P até o começo da onda Q (Burtnick e Tilley, 2004). A avaliação do intervalo PR nos eletrocardiogramas dos animais do grupo veneno mostrou um aumento médio significativo ( $p < 0,05$ ). Intervalos PR longos indicam um retardo na condução atrioventricular e indicam a ocorrência de bloqueios atrioventriculares (BAV) (Burtnick e Tilley, 2004) e a grande variabilidade reflete as diferentes alterações arrítmicas encontrada nos animais.

Quatro dos seis animais que receberam veneno de *M. surinamensis* apresentaram bloqueio atrioventricular (BAV) de 1º, 2º e/ou 3º grau. O animal 2 apresentou BAV de 1º, o animal 3 apresentou BAV de 2º e os animais 1, 2, 3 e 6 apresentaram BAV de 3º. O BAV 1º caracteriza-se por um aumento do intervalo PR devido a uma falha na condução do impulso do átrio para o ventrículo (junção atrioventricular) e feixe de His (Figura 18). Esse tipo de bloqueio pode ocorrer em animais saudáveis, em animais idosos, intoxicação por digitálicos, por  $\beta$ -bloqueadores, por desequilíbrio eletrolítico (hiper ou hipocalemia), estimulação vagal reflexa (aumento cíclico do intervalo PR) e enfermidade degenerativa do sistema de condução (Tudury *et al.*, 2003; Camacho e Mucha, 2008).

**Figura 18:** BAV 1º (seta azul), extrassístole supraventricular (seta vermelha) apresentada pelo animal 2 do grupo veneno ao tempo final de avaliação (2h após o envenenamento). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.



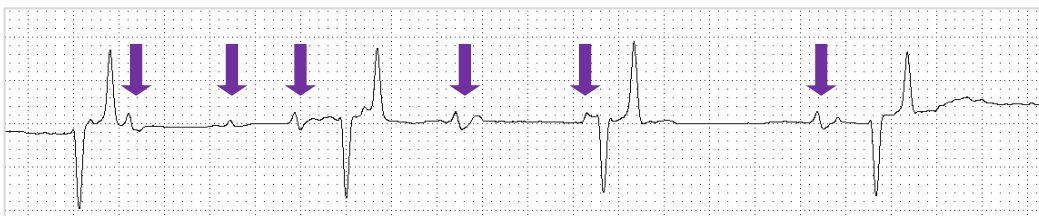
O BAV 2° é caracterizado por uma intermitente falha na condução atrioventricular, prolongamento progressivo do intervalo PR, onde uma ou mais ondas P aparecem sozinhas sem um complexo QRS-T (Figuras 19 e 21). O bloqueio é geralmente no nodo AV e o QRS é de duração normal. As causas podem associadas a arritmias sinusais e aumento do tônus vagal, por intoxicação digitálica ou por quinidina, pela aplicação de xilazina e outros anestésicos, por desequilíbrio eletrolítico,  $\beta$ -bloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e taquicardia supraventricular (Tudury *et al.*, 2003).

**Figura 19:** BAV 2° apresentado pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final (2h) após injeção do veneno. São visualizadas ondas P isoladas, sem o complexo QRS (setas amarelas). Derivação D2, 25 mm/s, 2N.



O BAV 3° ou bloqueio completo é caracterizado pela interrupção completa dos impulsos elétricos do átrio para o ventrículo (Figuras 20 e 21). As ondas P são dissociadas do complexo ventricular (QRS) e as duas são assincronamente controladas por marca-passos independentes, e nesses casos, a frequência ventricular é menor que a frequência atrial. O complexo QRS apresenta-se largo e de formato bizarro quando o marca-passo está localizado no ventrículo ou na junção atrioventricular, acima da bifurcação do feixe de His, quando ocorre bloqueio de ramo de feixe (Burtneck e Tilley, 2004). Pode ocorrer em casos de cardiomiopatia hipertrófica, infarto do miocárdio, endocardite bacteriana, hiper ou hipocalemia, intoxicações digitálicas e cardiopatias infiltrativas ou fibróticas (Tudury *et al.*, 2003).

**Figura 20:** BAV 3° apresentado pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final (2h) após inoculação do veneno. As setas mostram ondas P sem conexão com complexos QRS, que nestes casos apresentam formato bizarro. Derivação D2, 25 mm/s, 2N.



**Figura 21:** Evolução de um BAV de 2° (espaço em amarelo) para um BAV 3° (espaço em roxo), apresentado pelo animal 3 (grupo veneno) ao tempo final (2h) após inoculação do veneno. Derivação D2, 25 mm/s, 2N.



Nos animais do grupo veneno foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos complexos QRS. O complexo QRS representa a despolarização e contração ventricular e quando há um aumento, ou seja, formação de complexos largos de configuração variável indica a ocorrência de marca-passo ectópico abaixo do feixe de His ou uma lesão no sistema de condução intraventricular (bloqueio de ramo de feixe) (Tudury *et al.*, 2003; Burtneck e Tilley, 2004; Camacho e Mucha, 2008). Assim como descrito anteriormente, alterações na condução ventricular do impulso e na contração demonstram uma ação direta lesiva do veneno de *M. surinamensis* sobre as fibras musculares cardíacas e no sistema de condução, alterando o ritmo e conduzindo à progressivas arritmias e falha total cardíaca.

O intervalo ST, (dados não demonstrados), não mostrou depleção (negativa) ou elevação (positiva) em relação à linha base. Também não houve aumento ou diferença na duração do intervalo após injeção do veneno de *M. surinamensis*. O retardo na condução, drogas e hipertrofia ventricular podem alterar o intervalo.

A amplitude onda R mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em ambos os grupos estudados e seu aumento isolado não representa uma patologia (Ware, 2010).

A onda T normal deve ser 25% menor que a onda R, pois variações na relação entre essas podem demonstrar alterações eletrolíticas, metabólicas e hormonais, especialmente, quando há aumento de onda T. Em casos onde a relação se afeta pela diminuição de onda R, os fatores determinantes podem ser decorrentes de alterações metabólicas, hormonais, efusão pericárdica ou torácica e obesidade. Em todos os animais desta pesquisa, nenhuma alteração foi observada na relação entre as ondas R e T.

Os animais que receberam veneno de *M. surinamensis* mostraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do intervalo QT (Tabela 5). O intervalo QT representa o tempo total de ativação e despolarização dos ventrículos e varia inversamente em relação a frequência cardíaca. Influem na duração do intervalo QT: o tônus do SNA, desequilíbrios eletrolíticos (potássio e cálcio), secundariamente ao prolongamento do QRS e anormalidades no SNC (Ware, 2010). Nesse estudo, os animais que receberam veneno de *M. surinamensis* apresentaram diminuição da frequência cardíaca, alto intervalo QT (correlação inversa), aumento sérico na concentração de potássio e alterações do SNC.

O veneno de *M. surinamensis* leva ao bloqueio neuromuscular nos receptores de Ach, e esse bloqueio interfere na transmissão do impulso, tanto no SNC como no SNA, ou seja, altera o sistema motor esquelético e cardíaco. Os sinais neurológicos e as alterações no padrão

respiratório, evidenciados ao exame físico foram agravantes nas alterações cardíacas. As cobaias com alterações neurológicas mais graves (animais 1, 2, 3 e 6) também foram as que apresentaram as maiores alterações no ritmo cardíaco e bloqueios atrioventriculares de diferentes graus, enquanto que os animais que manifestaram sinais mais brandos do envenenamento (animais 4 e 5) mostraram redução na frequência cardíaca. Todavia, deve ser salientado que o animal 5 apresentou extrassístoles ventriculares.

O SNA atua na regulação das células marca-passo para aumentar ou diminuir a frequência cardíaca. A Ach é necessária para se completar a transmissão sináptica nos gânglios tanto para o sistema simpático quanto para o parassimpático, mas no músculo cardíaco, a Ach é o neurotransmissor parassimpático (reduz da frequência) e a noradrenalina o neurotransmissor simpático (aumenta a frequência) (Klein e Cunningham, 2009). Com o bloqueio dos receptores colinérgicos da Ach, a transmissão e o controle do ritmo cardíaco podem ser afetados, alterando a permeabilidade da membrana aos íons, principalmente cálcio, sódio e potássio e conseqüentemente afetando a despolarização celular. As alterações no controle do ritmo são as principais causas de arritmias e/ou paradas sinusais, que levam à conseqüentes formações de escapes juncionais, para tentar voltar o ritmo à normalidade (Ware, 2010; Puerta *et al.*, 2013).

Em conjunto, a miotoxicidade (que será descrita adiante) tanto esquelética quanto cardíaca evidenciada com aumentos expressivos na concentração de CK, enzima marcadora de lesão muscular e na sua fração MB (CK-MB), que revela lesão no miocárdio, além dos achados microestruturais (microscopia eletrônica) que mostraram destruição das fibras cardíacas, sugerem impedimento da contração cardíaca. Dessa forma tanto a formação e transmissão de impulsos, e conseqüentemente, as contrações atriais e ventriculares, foram comprometidas. Essas alterações estruturais das fibras podem explicar a ocorrência dos BAV de 1º, 2º e 3º graus, uma vez que levam ao processo chamado de reentrância, na busca do impulso elétrico por caminhos alternativos entre as fibras lesadas, para se conseguir gerar a contração muscular (Ware, 2010; Puerta *et al.*, 2013).

As toxinas 3FTx (que podem ser cardiotoxinas), presente no veneno da *Naja naja oxiana*, por exemplo, têm capacidade de despolarizar membranas excitáveis de cardiomiócitos e provocar parada cardíaca. Elas interagem eletrostaticamente com lipídios aniônicos na membrana afetando a estrutura e organização da bicamada fosfolipídica por desidratação da bicamada lipídica, podendo gerar poros, aumentando a permeabilidade membrana plasmática levando à destruição das células (Gasnov *et al.*, 2015).

Gatos anestesiados e inoculados com veneno de *M. fulvius* via IV, mostraram diminuição da frequência cardíaca e da pressão arterial, ondas T bifásicas e um animal apresentou complexo ventricular prematuro, sendo esse último semelhante ao encontrado nas cobaias que receberam veneno de *M. surinamensis* (Weis e McIsaac, 1971). O veneno da *M. fulvius* mostrou, em preparações *in vitro* de musculatura de camundongo, diminuição da resposta do músculo liso às aminas adrenérgicas, diminuição da transmissão neuromuscular, efeito despolarizante direto no músculo esquelético e efeito cardiotoxico direto (Weis e McIsaac, 1971). O veneno da *M. fulvius* é composto principalmente por PLA<sub>2</sub> que possuem capacidade hemolítica (Arce-Bejarano *et al.*, 2014).

As proteínas 3FTx estão presentes em grande proporção no veneno de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). A alteração na fibra cardíaca, comprovada pelo aumento significativo de CK e CK-MB na bioquímica sérica, pode ser decorrente da ação das toxinas

3FTx e em pequena proporção pelas PLA<sub>2</sub> (componente minoritário do veneno da *M. surinamensis*). Portanto, sugere-se um efeito cardiotoxico direto do veneno de *M. surinamensis*.

Alterações eletrolíticas vistas nos animais do grupo veneno, como o aumento de sódio, fósforo e potássio refletem essa alteração na integridade das fibras e pode ter influenciado no agravamento das alterações cardíacas. A alteração na integridade de membranas celulares, afeta sua despolarização e a concentração de alguns íons nos meios extra e intracelular. Aumentos discretos nos níveis de potássio podem ser assintomáticos, mas seu aumento também levar à diminuição da excitabilidade miocárdica e condução lenta gerando arritmias (Juzado, Pérez e Díez, 2012).

Resumindo, pôde ser comprovado nesse estudo que o veneno da *M. surinamensis* causa alterações arrítmicas no coração em curto período de tempo (2h após). Houve um distúrbio na formação do impulso supraventricular, possivelmente no nodo SA devido a bradicardia apresentada em todos os animais envenenados. Em dois animais (2 e 3), houve a formação de complexos supraventriculares prematuros (extrassístole supraventricular), além de variações na frequência e ritmos e, conseqüente formação de escapes juncionais. Também houve distúrbio na formação do impulso ventricular, pelo nodo AV (que recebe estímulo do marca-passo cardíaco, o nodo SA), pela observação de complexos ventriculares prematuros (extrassístole ventricular) em dois animais (2 e 5). A principal alteração observada foi o distúrbio na condução do impulso e possível bloqueio de feixe (esquerdo e/ou direito), evidenciado pela formação dos bloqueios atrioventriculares (BAV) de 1º, 2º e 3º grau na maioria dos animais (animais 1, 2, 3 e 6). Foram detectadas alterações morfológicas das fibras, que podem ser o fator determinante para a falha na condução. E se observou também, a ação automática intrínseca do coração, com habilidade de iniciar um impulso na tentativa de corrigir a falha no marca-passo natural cardíaco, mas que pode ter resultado em respostas anormais diminuindo a frequência cardíaca, tornando o músculo muito excitável (prematuro) ou levando a ausência de resposta (bloqueio). Os dados aqui apresentados são inéditos em estudos com envenenamentos por cobras-corais.

### **5.3 -Alterações laboratoriais**

#### **5.3.1 – Eritrograma**

Tanto o número de hemácias (RBC), como a concentração de hemoglobina (HGB) e o hematócrito (VG) diminuíram ( $p < 0,05$ ) após a administração de veneno de *M. surinamensis* ou PBS/BSA (Tabela 7) indicando que essa diminuição está relacionada com a coleta, ou manuseio dos animais ou ainda, com a resposta individual da espécie utilizada (*Cavia porcellus*). Seriam estes animais mais sensíveis às coletas de sangue, mesmo em pequenas quantidades?

**Tabela 7:** Valores médios e desvio padrão do eritrograma de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
<b>RBC</b> (x10 <sup>6</sup> /µl)	T0	5,46 ± 0,19 <b>A</b>	5,15 ± 0,53 <b>A</b>
	TF	4,82 ± 0,48 <b>B</b>	4,45 ± 0,49 <b>B</b>
<b>HGB</b> (g/dl)	T0	16,7 ± 0,54 <b>A</b>	15,3 ± 1,70 <b>A</b>
	TF	14,4 ± 0,60 <b>B</b>	13,1 ± 1,57 <b>B</b>
<b>VG</b> (%)	T0	47,5 ± 6,28 <b>A</b>	46,7 ± 4,80 <b>A</b>
	TF	43,0 ± 4,73 <b>B</b>	41,5 ± 4,97 <b>B</b>
<b>VCM</b> (fL)	T0	78,4 ± 2,62	77,1 ± 1,39
	TF	79,1 ± 2,53	77,7 ± 1,21
<b>HCM</b> (pg)	T0	30,6 ± 1,01	29,8 ± 0,57
	TF	30,4 ± 1,50	29,5 ± 0,79
<b>CHCM</b> (g/dl)	T0	39,2 ± 2,23	38,6 ± 0,95
	TF	38,4 ± 2,27	38,0 ± 1,04
<b>RDW</b> (fL)	T0	39,7 ± 2,62	38,7 ± 1,20
	TF	39,8 ± 2,69	38,8 ± 1,57

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância p<0,05.

Todavia, deve ser salientado que os animais não apresentaram um quadro de anemia conforme Thrall *et al.*, 2012 (Tabela 8) e nos esfregaços sanguíneos não foram visualizadas alterações de formato ou cor nas hemácias. Os índices hematimétricos e RDW não apresentaram diferença entre os tempos de avaliação.

**Tabela 8:** Valores hematológicos de referência para cobaias.

	<b>RBC</b>	<b>HGB</b>	<b>VG</b>	<b>VCM</b>	<b>HCM</b>	<b>CHCM</b>	
	x10 <sup>6</sup> /µl	g/dl	%	fL	Pg	%	
<b>Cobaia</b>	4,1 - 6,1	10,5 - 15,3	35,9 - 48,3	75,0 - 91,0	-	28,2 - 33,0	a
	5,49 - 8,69	11,4 - 13,5	37,5 - 44,2	54,6 - 62	16,5 - 18,8	26,1 - 34,1	b

Adaptado de (a) Thrall *et al.* Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, 2012, p. 225-232, (b) Weiss e Wardrop. Schalm's veterinary hematology, 2010, p.893-898.

A avaliação dos parâmetros, RBC, HGB e VG, em conjunto servem para determinar a normocitemia (quando os valores estão dentro dos valores e referência), anemia (concentrações abaixo dos valores de referência) ou policitemias (acima dos valores de referência) (Paes *et al.*, 2009; Thrall *et al.*, 2012). Apesar de ter ocorrido uma diminuição desses parâmetros em todos os animais, esses apresentam um quadro de normocitemia.

A diminuição poderia ser decorrente de hemorragias e/ou hemólise, mas nenhuma alteração nesse sentido foi observada e não havia fator determinante para tal no grupo controle. O efeito hemorrágico nos envenenamentos experimentais por *M. surinamensis* não foi relatado em estudos de Barros *et al.* (1994), concordando com o observado em nosso estudo. Esse efeito foi descrito apenas nos envenenamentos experimentais por *M. fulvius*, *M. frontalis* e discretamente observado em *M. averyi* (Barros *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 1997; Arce-Bejarano *et al.*, 2014).

A atividade hemolítica direta não foi evidenciada nas principais espécies de *Micrurus*, mesmo em aplicações de altas concentrações do veneno (Roodt *et al.*, 2012). A atividade hemolítica indireta está presente nos envenenamentos por serpentes do gênero *M. fulvius*, *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. lemniscatus*, *M. altirostris*, *M. balyocoriphus*, *M. pyrrhocryptus*, *M. nigrocinctus* e é bem menor nos envenenamentos experimentais por de *M. surinamensis* (Jorge e Burarechi, 2003, Roodt *et al.*, 2012). Hemólise intravascular *in vivo* foi observada apenas em envenenamento experimental por *M. fulvius* em camundongos (Arce-Bejarano *et al.*, 2014). A ação hemolítica está correlacionada diretamente com a quantidade de PLA<sub>2</sub> presente no veneno (Roodt *et al.*, 2012), que é mínima no veneno de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008), justificando a não observação de hemólise nos animais avaliados neste estudo.

Ressalta-se que foi coletado um pequeno volume de sangue no Tempo zero (3ml) incapaz de causar uma hipovolemia nos animais, já que os mesmos apresentavam um peso médio de 700g de peso vivo. Portanto, como não ocorreu alterações na amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), conclui-se que estas alterações não foram causadas pelo veneno de *M. surinamensis*.

### 5.3.2 – Leucograma

Os resultados do leucograma (tabela 9) apresentam o número de leucócitos totais e a contagem diferencial de leucócitos.

**Tabela 9:** Valores médios e desvio padrão do leucograma de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
<b>Leucócitos totais</b> (x10 <sup>3</sup> /µl)	T0	7,8 ± 2,2 <b>A</b>	9,6 ± 2,0
	TF	13,0 ± 1,5 <b>B</b>	11,5 ± 3,0
<b>Heterófilos</b> (%)	T0	46,4 ± 11,4 <b>A</b>	59,5 ± 19,0
	TF	68,4 ± 10,7 <b>B</b>	58,7 ± 19,7
<b>Heterófilos</b> (/µl)	T0	3764,2 ± 1519,9 <b>A</b>	5766,7 ± 2039,6
	TF	9020,4 ± 2108,9 <b>B</b>	6468,2 ± 2200,2
<b>Eosinófilos</b> (%)	T0	1,6 ± 1,8	0,33 ± 0,5
	TF	0,8 ± 1,3	1,17 ± 1,9
<b>Eosinófilos</b> (/µl)	T0	129,2 ± 176,1	35,3 ± 55,9
	TF	93,2 ± 153,6	105,7 ± 174,7
<b>Linfócitos</b> (%)	T0	47,8 ± 11,2 <b>A</b>	34,3 ± 19,1
	TF	23,4 ± 9,81 <b>B</b>	33,7 ± 22,8
<b>Linfócitos</b> (/µl)	T0	3809,8 ± 1426,9	3175,8 ± 1522,2
	TF	3022,6 ± 1205,7	4218,8 ± 3705,2
<b>Basófilos</b> (%)	T0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
	TF	0,6 ± 0,5	0,2 ± 0,4
<b>Basófilos</b> (/µl)	T0	16,8 ± 37,6	0,0 ± 0,0
	TF	75,8 ± 70,6	18,7 ± 45,7
<b>Monócitos</b> (%)	T0	4,0 ± 3,24	5,8 ± 2,5
	TF	6,8 ± 2,28	6,3 ± 2,7
<b>Monócitos</b> (/µl)	T0	340,0 ± 303,5 <b>A</b>	588,8 ± 348,9
	TF	888,0 ± 286,8 <b>B</b>	672,0 ± 210,3

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância p<0,05.

Os valores de referência para a espécie estão apresentados na tabela 10.

**Tabela 10:** Valores de referência do leucograma para cobaias.

	Leucócitos	Heterófilos	Eosinófilos	Linfócitos	Basófilos	Monócitos	
	x10 <sup>3</sup> /µl	%	%	%	%	%	
<b>Cobaia</b>	3,2 - 15	18-35	1-5	55-75	0-3	3- 12	a
	7,8 - 20,7	21,7- 47,7	2,1 - 7,8	41,3- 68,5	0,6 - 2,7	2,46 -5,84	b

Adaptado de (a) Mitruka e Rawnsle (1977) e (b) Schermer (1967) citados por Weiss e Wardrop. Schalm's veterinary hematology, 2010, p.893-898.

Nas cobaias que receberam veneno de *M. surinamensis*, houve aumento significativo (p<0,05) no número de leucócitos ao tempo final, que passou de 7,8 ± 2,2 para 13,0 ± 1,5/µl de sangue. Os leucócitos são células brancas, de defesa do organismo que participam de processos



inflamatórios e imunológicos. São produzidos na medula óssea pelo processo de leucopoiese e liberados na circulação sanguínea para posterior migração para tecidos, inclusive na região marginal de vasos sanguíneos (Paes *et al.*, 2009). O aumento de leucócitos também foi descrito em envenenamentos por *Micrurus* na América do Norte, sendo o leucograma um dos exames recomendados nesses casos (Peterson, 2006). Este relato corrobora com o resultado encontrado neste estudo, mostrando que o envenenamento por *M. surinamensis*, uma serpente encontrada na América do Sul, provoca aumento no número total de leucócitos, possivelmente, devido ao processo inflamatório local agudo.

Heterófilo é o mesmo que neutrófilo, mas recebe nomenclatura diferenciada para cobaias devido à presença de núcleo segmentado e eosinofílico diferente dos neutrófilos dos outros mamíferos domésticos (Thrall *et al.*, 2012). Da mesma forma que os leucócitos totais, após a injeção do veneno de *M. surinamensis*, as cobaias apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do número relativo e absoluto dos heterófilos, sendo estas células responsáveis pela leucocitose. Os heterófilos participam da resposta inflamatória sendo atraídos quimicamente, onde realizam a fagocitose de organismos estranhos. Seu aumento está associado principalmente a processos infecciosos (bactérias, vírus, fungos ou protozoários), anemia hemolítica imunomediada e necrose. Na inflamação aguda, eles são recrutados da parede dos vasos o que ocorre também em casos de estresse e dor (Couto, 2010; Thrall *et al.*, 2012). Ressalta-se que o grupo controle, que recebeu injeção IM de PBS/BSA não apresentou alteração do leucograma.

Em relação aos linfócitos, houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores relativos no TF, no grupo que recebeu veneno de *M. surinamensis*. A diminuição no número total de linfócitos ocorre em casos de inflamação aguda, levando a migração das células para os tecidos inflamados e linfonodos. Essa diminuição pode ocorrer concomitante à neutrofilia, como ocorreu nos animais estudados (Paes *et al.*, 2009; Thrall *et al.*, 2012).

Em relação aos monócitos, houve aumento ( $P < 0,05$ ) no número absoluto nos animais que receberam veneno de *M. surinamensis* no TF. O aumento pode ocorrer concomitante ao aumento de heterófilos devido aos mesmos precursores em processos inflamatórios, casos de necrose, hemólise ou hemorragias (Weiss e Wardrop, 2010; Thrall *et al.*, 2012).

Nesse sentido, as possíveis causas do aumento de heterófilos e monócitos e diminuição dos linfócitos nos animais envenenados pode ser devido ao quadro grave e agudo deste envenenamento, manifestado por significativas alterações clínicas, neurológicas e cárdio-respiratórias, além das lesões musculares (mionecrose) observadas na microscopia óptica e eletrônica (que serão descritas adiante) que atraem células leucocitárias para os tecidos, uma vez que a distribuição do veneno é rápida e ampla (Lomonte *et al.*, 2016).

Eosinófilos e basófilos não apresentaram alterações nos seus números nos tempos avaliados e nos diferentes grupos.

### **5.3.3 – Coagulação**

#### **5.3.3.1 - Plaquetas**

Não houve alterações no número de plaquetas antes e após a injeção de veneno ou PBS/BSA (comparação entre tempos). Entretanto, no tempo final, os grupos são diferentes estatisticamente

( $P < 0,05$ ), devido a menor contagem plaquetária apresentada pelo grupo controle (PBS/BSA) (Tabela 11). Esses valores encontram-se discretamente abaixo dos limites de referência para cobaias, entre 161 a 368  $\times 10^3/\mu\text{l}$  de acordo com Weiss e Wardrop (2010). Como foram encontrados agregados plaquetários em todas as lâminas de esfregaços sanguíneos dos grupos controle e veneno nos dois tempos, os resultados encontrados não representam uma alteração clínica. Esse fato pode ocorrer devido à dificuldade da coleta de sangue ou mesmo pelo estresse da coleta (Paes *et al.*, 2009, Thrall *et al.*, 2012).

**Tabela 11:** Valores médios e desvio padrão do número de plaquetas/ $\mu\text{l}$  de sangue de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	T0	232,0 $\pm$ 102,4	211,2 $\pm$ 162,7
	TF	375,8 $\pm$ 171,3 <b>a</b>	150,0 $\pm$ 103,5 <b>b</b>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância  $p < 0,05$ .

As plaquetas são elementos corpusculares desprovidos de núcleos, altamente sensíveis a qualquer alteração física ou química do sangue ou sistema cardiovascular, apresentando rápida resposta, para minimizar danos vasculares, modular respostas alérgicas e inflamatórias. Também servem para avaliar a hemostasia primária que envolve a interação entre a parede dos vasos. Quando há uma lesão vascular, além da vasoconstrição, há ativação de plaquetas e fatores para sua adesão e agregação para agir na reparação do dano (Paes *et al.*, 2009). Como não houve alteração macro e microscópica no local da área de aplicação do veneno, tais como formação de halo hemorrágico, petéquias ou equimoses, (exceto um animal do grupo veneno que apresentou áreas de hemorragia na musculatura esquelética em avaliação histológica), sugere-se o não envolvimento plaquetário nas primeiras duas horas do envenenamento.

As plaquetas desempenham uma função crucial na hemostasia, mas também são responsáveis pela trombose patogênica (Weiss e Wardrop, 2010). Serpentes da família Elapidae possuem componentes no veneno capazes de inibir a agregação de plaquetas através da ação de L-aminooxidasas ou PLA<sub>2</sub> (Rosso *et al.*, 1996, Alape-Girón *et al.*, 1999, Sakurai *et al.* 2001, Satish *et al.*, 2004). Nesta pesquisa, não foram vistas alterações plaquetárias semelhantes às descritas em outros elapídeos.

### 5.3.3.2. TTPa, TP e fibrinogênio

Nenhum dos três parâmetros avaliados (Tempo de tromboplastina parcial ativada –TTPa, Tempo de protrombina -TP e concentração de fibrinogênio) mostrou diferença significativa na comparação dos tempos no grupo veneno e controle (Tabela 12), revelando que o veneno nas primeiras duas horas não altera a cascata de coagulação.

**Tabela 12:** Valores médios e desvio padrão de TTPa (seg), TP (seg) e concentração de fibrinogênio (mg/dl) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
<b>TTPa (seg)</b>	T0	61,6 ± 89,4	41,6 ± 31,8
	TF	61,2 ± 90,8	46,2 ± 75,9
<b>TP (seg)</b>	T0	73,9 ± 37,2	85,5 ± 43,4
	TF	36,6 ± 18,3	49,4 ± 17,0
<b>Fibrinogênio (mg/dl)</b>	T0	196,4 ± 102,9	220,7 ± 113,0
	TF	132,6 ± 119,6	185,5 ± 90,2

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância  $p < 0,05$ .

TTPa é o teste mais comumente empregado para verificação do mecanismo intrínseco da coagulação, para o diagnóstico de anomalias dos fatores da coagulação XII, XI, IX, VIII, X, protrombina e fibrinogênio. O TP fornece indicação sobre a quantidade total de protrombina presente no sangue, sendo utilizado para identificar as anormalidades dos fatores envolvidos no sistema no sistema extrínseco, protrombina e fatores V, VII e X. Alteração na hemostasia secundária, na deficiência dos fatores de coagulação, leva a perdas sanguíneas graves (Carlos e Freitas, 2007; Baker, 2012). Nos animais envenenados não foram observadas hemorragia ou hemólise.

O fibrinogênio é uma proteína produzida no fígado e normalmente serve para verificar ocorrência de processos inflamatórios e distúrbios da coagulação (hemostasia secundária) (Paes *et al.*, 2009; Baker, 2012). A hiperfibrinogenemia pode ocorrer em casos de desidratação (como ocorre no aumento das demais proteínas), em processos inflamatórios em várias espécies domésticas e sua diminuição ou ausência ocorre em distúrbios de coagulação, como observada frequentemente nos acidentes botrópicos e crotálicos (Sakate, 2008; Baker, 2012). O aumento de fibrinogênio em acidentes por *Micrurus* foi descrito por Peterson (2006), mas não foi observado nesta pesquisa.

O veneno da *M. surinamensis* possui baixa atividade hemolítica e não possui atividade hemorrágica (Cecchini *et al.*, 2005; Roodt *et al.*, 2012). Clinicamente os animais avaliados neste estudo não apresentaram sinais de hemólise ou hemorragia que determinassem a ação do veneno, com exceção de um animal que apresentou micro-hemorragias na musculatura esquelética na avaliação histológica.

Salazar *et al.* (2011) estudando as frações do veneno da espécie *M. tener tener*, demonstraram a presença da atividade fibrinolítica, formação de fibrina instável, além dos inibidores da atividade do Fator Xa. Isto mostra que algumas cobras-corais possuem capacidade de alterar a cascata da coagulação, mas devido à grande variabilidade na composição do veneno destas serpentes (Lomonte *et al.*, 2016), tais atividades não são observadas em todas as espécies, como observado para *M. surinamensis* neste trabalho.

As Najas, pertencentes à família Elapidae, podem interferir na cascata da coagulação. Gerads *et al.* (1992) descreveram um tipo de metaloprotease presente no veneno da *Naja naja oxiana*

capaz de ativar o Fator V, tornando a atividade do Fator Va consideravelmente mais baixa, comparado ao mesmo fator ativado pela trombina. E, no veneno da *N. haje* foi identificada uma PLA<sub>2</sub>, caracterizada como o primeiro inibidor direto da trombina encontrado em venenos da família Elapidae (Osipov *et al.*, 2010). O conhecimento desses efeitos em outras espécies de elapídeos é importante para a busca dos diferentes potenciais tóxicos do veneno das *Micrurus*.

Lesões vasculares são observadas principalmente em acidentes botrópicos (família Viperidae), devido as metaloproteases presentes no veneno dessas serpentes que possuem ação vasculotóxica destruindo o endotélio vascular de capilares (Melo *et al.*, 2005). Em cobras-coraís, foi observada hemorragia em camundongos envenenados experimentalmente por *M. frontalis* e essa ação foi atribuída a um tipo de PLA<sub>2</sub> com capacidade hemorrágica (Francis *et al.*, 1997). O veneno da *M. surinamensis* possui uma fração muito pequena composta por PLA<sub>2</sub> (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008), tornando pouco provável a ocorrência de alterações significativas causadas por essas proteínas. A hemorragia na musculatura de um animal do grupo veneno poderia ser devido a algum componente ainda não descrito do veneno com essa função? Mais estudos a esse respeito devem ser realizados para tais esclarecimentos.

O veneno de *M. surinamensis*, não causou alterações significativas na hemostasia de cobaias 2h após. Não existem relatos na literatura sobre TP e TTPa em animais envenenados por *Micrurus*, e alterações na cascata de coagulação somente foram relatadas por Salazar *et al.* (2011), que utilizaram outros protocolos para avaliação da cascata de coagulação.

#### **5.4 - Bioquímica sanguínea**

Os valores médios das enzimas creatina quinase (CK), fração MB (CK-MB), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA) estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13:** Valores séricos médios em U/L e desvio padrão de CK, CK-MB, AST, LDH, ALT, GGT e FA de cobaias, (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
<b>CK</b>	T0	1173,3 ± 782,5 <b>A</b>	2731,1 ± 1660,2
<b>(U/L)</b>	TF	6482,1 ± 4782,4 <b>a,B</b>	3144,1 ± 1328,8 <b>b</b>
<b>CK-Mb</b>	T0	247,3 ± 100,7 <b>A</b>	300,9 ± 81,0
<b>(U/L)</b>	TF	694,0 ± 270,5 <b>a,B</b>	340,8 ± 233,9 <b>b</b>
<b>AST</b>	T0	112,7 ± 81,3 <b>A</b>	45,8 ± 12,1
<b>(U/L)</b>	TF	242,7 ± 75,5 <b>a,B</b>	45,6 ± 16,1 <b>b</b>
<b>LDH</b>	T0	465,1 ± 192,4 <b>A</b>	508,1 ± 253,7
<b>(U/L)</b>	TF	1025,1 ± 473,8 <b>a,B</b>	695,1 ± 701,9 <b>b</b>
<b>ALT</b>	T0	48,1 ± 14,0 <b>a</b>	94,0 ± 17,6 <b>b</b>
<b>(U/L)</b>	TF	41,2 ± 9,73 <b>a</b>	87,0 ± 20,2 <b>b</b>
<b>GGT</b>	T0	11,0 ± 10,1	5,79 ± 3,39
<b>(U/L)</b>	TF	6,82 ± 4,12	7,46 ± 4,34
<b>FA</b>	T0	51,4 ± 23,4	62,8 ± 21,2
<b>(U/L)</b>	TF	57,0 ± 19,2	65,7 ± 32,1

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância  $p < 0,05$ .

As enzimas CK e CK-MB são importantes na avaliação de lesões musculares da musculatura esquelética e cardíaca, respectivamente, e podem ser utilizadas conjuntamente com as enzimas AST, LDH e ALT.

Como as enzimas AST e ALT não são órgão-específicas também são utilizadas para avaliação hepática, conjuntamente com enzimas marcadoras de obliteração de canalículo biliar, como GGT e FA. Além das enzimas, são utilizados outros parâmetros relacionados com síntese hepática tais como, proteínas, fatores de coagulação e ureia.

#### 5.4.1 - Avaliação muscular

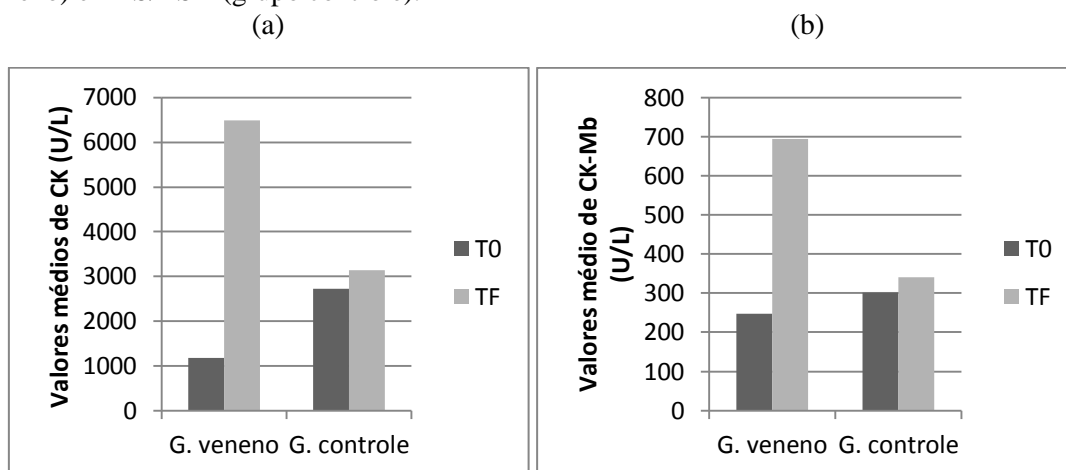
As enzimas CK, CK-MB, AST e LDH apresentaram elevação significativa ( $P < 0,05$ ) em até 2h após a inoculação do veneno de *M. surinamensis* (Tabela 13).

Nos animais envenenados, o aumento de CK, de 1173,3 (T0) para 6482,1 (TF) foi extremamente alto: 452,5% maior quando comparado aos valores basais (T0), ou seja, cerca de 5,5 vezes maior que a concentração inicial da enzima. Essa diferença foi extremamente alta para o período de avaliação de apenas duas horas, como pode ser visualizado na figura 22-a, onde o grupo veneno no TF mostrou um aumento consideravelmente maior, em comparação com o mesmo tempo do grupo controle. A literatura relata que o pico da enzima normalmente ocorre cerca de 6-12 horas após o dano (Allison, 2012), mas altos níveis de CK podem ser observados em até três horas de envenenamento por cobras-corais (Gutiérrez *et al.*, 1983; Peterson, 2006). Todavia, Roodt *et al.* (2012) relataram discreto aumento de CK em camundongos envenenados experimentalmente por *M. surinamensis*. Ressalta-se o veneno de *M. surinamensis* é

considerado com alta capacidade citotóxica e neurotóxica, segundo estudos de Schezaro-Ramos *et al.* (2016).

O aumento na concentração da fração MB (CK-MB), de 247,3 UI/L (T0) para 694,0 UI/L após injeção do veneno foi de 180,6%, um acréscimo considerável (Figura 22-b). A ocorrência de lesão cardíaca após envenenamento por *M. surinamensis* ainda não havia sido descrita na literatura. A enzima CK-MB, que é uma fração da CK total, é um importante marcador de lesão cardíaca em células miocárdicas (Valberg, 2008; Allison, 2012). Uma parte da enzima CK encontrada nas membranas mitocondriais pode representar até 15% da atividade total da CK cardíaca.

**Figura 22 (a e b):** Valores médios de CK (UI/L) (a) e CK-MB (UI/L) (b) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).



A CK é uma enzima encontrada em altas concentrações na musculatura esquelética, músculo cardíaco, músculo liso e cérebro. Está presente no citoplasma das células musculares, inclusive em membranas mitocondriais e fornece ATP para contração muscular por fosforilação de ADP a partir de fosfato de creatina e é liberada quando ocorre algum tipo de dano a essas células (Valberg, 2008; Allison, 2012). A fração CK-BB está presente no cérebro; a CK-MM, nos músculos esquelético e cardíaco e, a CK-MB, principalmente no coração (Thompson, 1997; Valberg, 2008).

Discretos aumentos de CK podem ocorrer após injeções intramusculares, ferimentos e decúbito prolongado que podem levar a pequenas lesões (Thompson, 1997; Valberg, 2008). Por outro lado, aumentos elevados nos níveis de CK têm significado clínico; um aumento de três a cinco vezes nos valores basais pode significar uma lesão em cerca de 20 gramas de músculo, em mamíferos domésticos (Valberg, 2008). Portanto, valores extremamente altos para CK, nos animais envenenados, revelam uma lesão muscular significativa. Não foram encontrados na literatura valores de referência de CK e CK-MB em cobaias para fins comparativos.

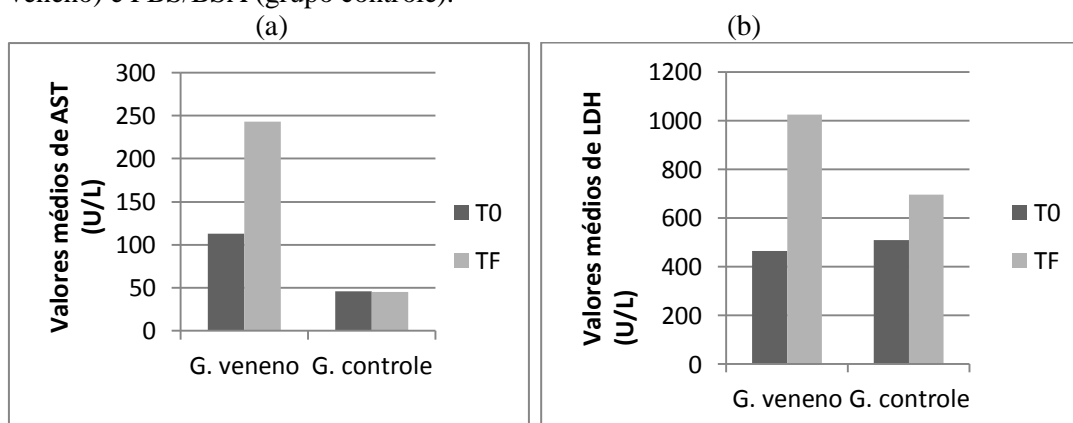
Outras enzimas avaliadas também contribuíram para comprovar ocorrência de lesões musculares, apesar de não serem específicas para danos musculares como a CK. A enzima AST,

está presente em altas concentrações na musculatura esquelética, fígado e em células da musculatura cardíaca (Allison, 2012) e elevações de suas atividades foram relatadas em numerosas desordens musculares caracterizadas por necrose de miofibras (Valberg, 2008).

O aumento de AST nos animais do grupo veneno de 112,7 (T0) para 242,7 (TF), representou um crescimento de 115,3%, que contribuiu para confirmar a ocorrência de lesão na musculatura esquelética e cardíaca (Figura 23-a). Ressalta-se que essa enzima também é utilizada como marcador de lesão hepática. Mas, como não foram observadas alterações microscópicas do fígado, essa lesão foi desconsiderada, além da ausência de alterações das enzimas hepáticas (GGT e FA), que será discutida posteriormente.

Os valores de LDH sérico passaram de 465,1 (T0) para 1025,1 (TF), um aumento de 120% após a aplicação do veneno e apesar de sua pouca especificidade, a ocorrência de lesão muscular pode ter a maior contribuição para essa elevação (Figura 23-b).

**Figura 23 (a e b):** Valores médios de AST (UI/L) (a) e LDH (UI/L) (b) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).



A enzima LDH, que catalisa a oxidação reversível de piruvato a L-lactato possui uma série de isoenzimas presentes nos eritrócitos, hepatócitos, músculos e miocárdio. Devido ao fato destas isoenzimas terem ampla distribuição no organismo, o aumento sérico de LDH pode ser de difícil interpretação na medicina veterinária, necessitando da análise juntamente com outras enzimas, como a CK para detecção de lesão muscular (González e Scheffer, 2003; Valberg, 2008). Lesões musculares de etiologias variadas podem se relacionar com o aumento desta enzima. Além disso, exercício prolongado e hepatopatias também podem elevar os valores desta enzima (Kaneko, 2008). Valores de referência para essa enzima em cobaias não foram encontrados.

A enzima ALT não é uma enzima órgão-específica, e está presente no citoplasma de células hepáticas, musculares e nos rins. Em cobaias, sua atividade em células cardíacas é equivalente à sua atividade hepática, uma particularidade para a espécie (Campbell, 2012). Os resultados para essa enzima, não mostraram diferença estatística entre os tempos avaliados do grupo veneno e controle.

Desse modo, avaliando os marcadores de lesão muscular, pode-se afirmar que o veneno de *M. surinamensis*, apesar de ser considerado de baixo potencial miotóxico segundo Gutiérrez *et al.* (1983) por possuir uma fração muito pequena de PLA<sub>2</sub> (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008), foi capaz de provocar sérios danos musculares em apenas duas horas de envenenamento. O aumento de CK observado nesse estudo foi bastante significativo, diferindo dos valores observado por Roodt *et al.* (2012) que relataram discreto aumento para essa enzima em estudos com camundongos.

Essa alta capacidade citotóxica observada neste trabalho está de acordo com estudos de Schezaro-Ramos *et al.* (2016), como já foi citado. E apesar da pequena fração fosfolipásica presente no veneno de *M. surinamensis*, fração normalmente relatada como miotóxica, o veneno dessa espécie mostrou sua capacidade de causar lesão muscular. Além disso, a hipóxia tecidual proveniente da insuficiência respiratória provocada pelo bloqueio neuromuscular, que foi evidenciada nos animais, pode ter influenciado no influxo de cálcio intracelular, provocando danos mitocondriais e em membranas (Geihs, 2014).

Serpentes do gênero *Crotalus* (família Viperidae) também possuem PLA<sub>2</sub> como causadoras de lesão muscular em associação com outra fração, a crotapotina. Elas promovem a rupturas de fibras e de organelas intracelulares, levando ao influxo de cálcio e efluxo de CK, LDH e AST (Lago *et al.*, 2012). Essas alterações enzimáticas (muscular esquelética) foram semelhantes ao observado em nossos estudos com a *M. surinamensis*.

A lesão cardíaca evidenciada nesse trabalho não estava descrita na literatura para a espécie *M. surinamensis*. As alterações cardíacas descritas nos envenenamentos por *M. fulvius*, se devem principalmente pela ação da PLA<sub>2</sub>, a maior fração do veneno, que provoca lesões musculares (Weis e McIsaac, 1971) e pela ocorrência de hemólise intravascular, que causa uma brusca queda de pressão arterial (Arce-Bejarano, 2014). O veneno da *M. surinamensis* é bem diferente, pois não tem efeito hemolítico comprovado e possui efeito fosfolipásico muito menor, comparado com o de *M. fulvius* e com a maioria das espécies de *Micrurus* estudadas (Cecchini *et al.*, 2005; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010; Roodt *et al.*, 2012).

#### **5.4.2 - Avaliação hepática**

Das enzimas marcadoras de lesão hepática, a AST mostrou um aumento significativo no TF de avaliação em comparação ao T0, no grupo veneno, já discutida anteriormente na seção de avaliação muscular. O aumento de LDH também foi significativo, mas da mesma forma, essa enzima não específica para avaliação hepática. As demais enzimas, ALT, GGT e FA, não apresentaram alteração entre os tempos e grupos avaliados.

A gama-glutamilttransferase (GGT) é uma enzima presente em todas as células, com exceção do músculo. Apresenta grande atividade nos rins e fígado, mas somente é encontrada no plasma proveniente das células hepáticas, uma vez que a GGT de origem renal é excretada na urina. O aumento dessa enzima se relaciona com colestase, por estar presente nos canalículos das células hepáticas e, particularmente, nas células epiteliais que revestem os ductos biliares (González e Scheffer, 2003; Kaneko, 2008). Na cobaia, a GGT possui maior especificidade hepática quando comparada ao rato (Campbell, 2012). Não foram encontrados valores de referência para a espécie na literatura.



Os valores observados para a enzima FA após injeção de veneno de *M. surinamensis* estão situados entre os valores de referência para a espécie, que variam de 55-108 U/L segundo Campbell (2012), e não tiveram alteração significativa em relação ao T0. A fosfatase alcalina (FA) também é uma marcadora de colestase e alterações hepáticas. FA possui maior concentração em células osteoblásticas na membrana óssea, no epitélio biliar e células epiteliais e em menor concentração nos rins e intestino (Allison, 2012; Campbell, 2012).

As enzimas AST e ALT possuem grande importância na avaliação hepática, assim como na avaliação muscular. Os valores de referência para AST variam de 26-68 U/L e os valores de referência para ALT variam de 25-59 U/L em cobaias (Campbell, 2012). Como o grupo controle já no tempo zero (valores basais) apresentavam valores de ALT acima do limite superior relatado por Campbell (2012), isso não foi considerada uma alteração clínica.

A avaliação hepática pode ser feita também pelos testes relacionados com a síntese hepática, assim concentração de albumina, ureia (que serão discutidos nos próximos tópicos) e fatores de coagulação. Os valores encontrados para esses parâmetros não mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), demonstrando que a produção dos mesmos não foi afetada em cobaias duas horas após o envenenamento elapídico.

Não existem relatos na literatura de ocorrência de lesão hepática nos envenenamentos por corais verdadeiras. Desse modo, pode-se afirmar que no tempo avaliado, o veneno da *M. surinamensis* não causou danos no fígado.

### **5.4.3 - Avaliação renal**

Ureia e creatinina são metabólitos utilizados para avaliar a função renal, sendo a creatinina a mais específica. O ácido úrico também pode ser usado para essa avaliação como um complemento na verificação de ocorrência de cálculos. Além desses metabólitos, a avaliação dos íons cálcio, fósforo, sódio e potássio e das proteínas totais são úteis na avaliação de alterações na filtração glomerular renal.

Os valores para os produtos de metabolismo, ureia, creatinina e ácido úrico e para os eletrólitos, cálcio, fósforo, potássio e sódio estão apresentados na tabela 14.

**Tabela 14:** Valores séricos médios e desvio padrão dos metabólitos ureia (mg/dl), creatinina (mg/dl), e ácido úrico (mg/dl) e dos eletrólitos, cálcio (mg/dl), fósforo (mg/dl), potássio (mmol/L) e sódio (mmol/L) de cobaias, antes (Tempo zero) e 2h após (Tempo Final) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
Ureia (mg/dl)	T0	64,5 ± 5,82	53,8 ± 12,3
	TF	65,7 ± 14,1	51,7 ± 15,4
Creatinina (mg/dl)	T0	0,75 ± 0,26 <b>A</b>	0,76 ± 0,09
	TF	0,97 ± 0,26 <b>B</b>	0,81 ± 0,14
Ácido úrico (mg/dl)	T0	2,44 ± 0,86 <b>A</b>	1,75 ± 0,69
	TF	4,49 ± 1,79 <b>a,B</b>	1,71 ± 0,49 <b>b</b>
Cálcio (mg/dl)	T0	10,2 ± 0,57	10,5 ± 0,38
	TF	10,2 ± 0,80	10,6 ± 0,31
Fósforo (mg/dl)	T0	6,28 ± 0,93 <b>A</b>	7,15 ± 1,57
	TF	10,3 ± 3,18 <b>a,B</b>	7,68 ± 1,63 <b>b</b>
Sódio (mmol/L)	T0	136,5 ± 30,0 <b>A</b>	117,8 ± 9,32
	TF	140,3 ± 31,1 <b>B</b>	115,8 ± 4,80
Potássio (mmol/L)	T0	4,56 ± 0,76 <b>A</b>	4,71 ± 1,11 <b>A</b>
	TF	9,21 ± 3,24 <b>B</b>	7,79 ± 1,75 <b>B</b>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância  $p < 0,05$ .

Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração sérica de creatinina ( $0,97 \pm 0,26$ ) na comparação dos tempos no grupo veneno. Todavia, ainda é cedo para se afirmar que houve uma lesão renal, pois, os valores de creatinina encontram-se dentro dos limites considerados normais (0,6 a 2,2 mg/dL) para a espécie. Podem ter ocorridas diminuições significativas na taxa de filtração glomerular que refletem exatamente em pequenos aumentos no creatinina nas fases iniciais da lesão (Macedo, 2011). Também deve ser salientado que, valores normais de creatinina, podem não significar normalidade renal. Indicam que, pelo menos 25% da massa renal, está funcionando de forma adequada na excreção e mantendo os níveis séricos dentro da normalidade (Meuten, 2012).

A creatinina possui especificidade como marcadora, uma vez que é totalmente excretada pelos rins e seu aumento sérico indica uma lesão renal. É sintetizada no músculo, derivada principalmente do metabolismo da creatina muscular. Sua elevação pode estar associada a fatores pré-renais como diminuição do fluxo sanguíneo renal e diminuição da filtração glomerular, falha renal, falha na excreção, danos musculares e exercícios intensos (Lopes, Biondo e Santos, 2007; Martos *et al.*, 2012; Meuten, 2012).

Em relação à ureia, os valores de referência em cobaias variam entre 9 a 31,5 mg/gL (Campbell, 2012). Apesar de os valores de ureia, já no momento basal, oscilarem entre 53,8 a 64,5mg/dL (Tabela 14), isto não tem significado clínico já que este parâmetro pode estar aumentado em decorrência da alimentação e outros fatores. A ureia é produzida no fígado, proveniente da metabolização de proteínas, circula no sangue e é filtrada nos glomérulos renais para excreção na urina. Normalmente, cerca de 50% da ureia é reabsorvida nos túbulos proximais e 10% nos túbulos coletores (Meuten, 2012). Apenas quando há cerca de 75% de comprometimento renal, ocorre uma elevação relevante em seu valor sérico, desse modo somente avaliando-se os valores

de ureia não se pode detectar uma injúria renal aguda (Campbell, 2012). A concentração de ureia é afetada por fatores pré-renais como ingestão proteica elevada, aumento do catabolismo de proteínas e jejum prolongado. Devido a essas interferências, a ureia, quando analisada unicamente, não é um bom indicador do funcionamento renal. Para se analisar a função renal, esse parâmetro deve ser interpretado juntamente aos níveis de creatinina, proteína e densidade urinárias (Braun e Lefebvre, 2008).

Houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração sérica de ácido úrico ( $4,49 \pm 1,79$ ), na comparação dos tempos no grupo veneno. Ressalta-se que para ácido úrico não foram encontrados valores de referência (Campbell, 2012). O ácido úrico foi realizado como um complemento, para avaliar a formação de cristais nos rins e outras condições clínicas, como insuficiências renal e cardíaca congestiva (Meuten, 2012). O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas e por sua atividade como depurador natural de radicais livres, pode ser utilizado como marcador de estresse oxidativo, dano tissular e disfunção renal (Corominas *et al.*, 2014). O urato é reabsorvido quase que totalmente no túbulo proximal deixando cerca de 0-2% de urato filtrado no lúmen tubular, por isso a quantidade de ácido úrico na urina é de aproximadamente 10% da quantidade de urato filtrada (Martín e Nieto, 2011).

Possíveis lesões renais podem ocorrer nos envenenamentos por cobras-corais devido à lesão muscular que libera mioglobina na circulação, podendo danificar os rins e em envenenamentos por outras serpentes, cujo veneno causa hemólise com liberação de hemoglobina (Roodt *et al.*, 2012). As lesões renais também podem ocorrer em animais com diminuição da taxa de filtração glomerular e alterações em nível tubular, de reabsorção e excreção (Braun e Lefebvre, 2008).

A concentração dos eletrólitos cálcio, fósforo, potássio e sódio, também são importantes na avaliação de lesões renais, já que a concentração também sofre interferência nas alterações de absorção e excreção renal.

Na média geral entre os animais estudados, o cálcio não variou significativamente entre os tempos T0 e TF. O cálcio exerce importante função na composição óssea, em reações essenciais como coagulação sanguínea, manutenção da integridade e permeabilidade das membranas celulares, estimulação dos músculos esqueléticos e cardíacos e condução neuromuscular. Grande parte do cálcio está vinculado a proteínas plasmáticas (40-45% do cálcio total), principalmente albumina e, complexado com íons não proteicos, como fosfato, citrato, lactato, etc (5-10% do total de cálcio) (Bohn, 2012). Só o componente ionizado é fisiologicamente ativo, e está regulado pelo paratormônio (Favus e Langman 1986). O cálcio não ligado a proteínas é filtrado pelos glomérulos e amplamente reabsorvido pelos túbulos. Em animais sadios isso resulta na recuperação de mais de 90% do cálcio filtrado. O cálcio ionizado exerce diferentes funções no organismo (Bohn, 2012). De um modo geral, a concentração sérica de cálcio total reflete a concentração de cálcio ionizado, contudo, no paciente com insuficiência renal crônica (IRC), esta relação se perde (Chew e Nagode 1990). A maior concentração de cálcio e fósforo está no meio intracelular e seus níveis séricos normais dependem do controle hormonal. A calcitonina, paratormônio (PTH) e 1,25-dihidroxitamina D (calcitrol ou vitamina D), são seus principais reguladores (Bohn, 2012).

Os valores de referência para cálcio variam de 8,2-12,0 mg/dl, portanto os valores médios encontrados nos animais do grupo veneno e controle, estão dentro da normalidade (Campbell, 2012).

Ao contrário do observado para cálcio, o fósforo mostrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), entre o T0 e o TF nos animais do grupo veneno. O fósforo é o sexto elemento mais abundante no organismo e, dentre suas inúmeras funções, pode ser destacado o fornecimento de energia para as atividades celulares. Para tanto, o fosfato orgânico ocorre sob a forma de compostos de alta energia tais como creatina fosfato e o ATP. Cerca 85% do fosfato estão contidos nos ossos sob forma de hidroxiapatita; 14% estão nas células de tecidos moles como constituintes de compostos orgânicos e 1% está presente no líquido extracelular. Do total de fosfatos no sangue, 30% apresentam-se sob forma orgânica como constituintes moleculares das hemácias e 70% são íons plasmáticos livres sob formas denominadas fosfato inorgânico. A excreção fósforo diminui com a redução da taxa de filtração glomerular e gera alterações no balanço de cálcio e fósforo (Rosol e Carpen, 1996; Martos *et al.*, 2012).

Em cobaias, os valores de referência para o fósforo variam de 3,0-7,6 mg/dl (Campbell, 2012), portanto o aumento na concentração desse íon no grupo veneno ( $10,3 \pm 3,18$ ) mostrou-se acima dos valores normais.

Em relação ao potássio, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), tanto no grupo veneno quanto no grupo controle (Tabela 13). Mas quando se faz a comparação das médias encontradas com os valores de referência para a espécie, que variam de 3,8-7,9 mmol/L, apenas observou-se aumento no grupo veneno ( $9,21 \pm 3,24$ ), valor este que ultrapassou o limite superior de normalidade. O potássio é um elemento encontrado principalmente intracelularmente, cerca de 98%. A distribuição de potássio através da membrana celular desempenha um papel crítico na manutenção da excitabilidade cardíaca e neuromuscular. Alterações na concentração de potássio que alteram a proporção de potássio intracelular para extracelular modificam o potencial de membrana. O balanço depende dos rins onde o potássio é filtrado pelos glomérulos e, parcialmente reabsorvido no túbulo proximal juntamente com outros eletrólitos que participam da reabsorção isosmótica de líquido e, parte deste, pode ser secretado no túbulo distal (Bohn, 2012; Campbell, 2012).

O sódio também apresentou aumento sérico estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na comparação dos tempos (T0 e TF) no grupo veneno ( $140,3 \pm 31,1$ ). O sódio possui grande importância na fisiologia animal, atuando na regulação da pressão sanguínea (volume e osmolaridade) e na manutenção das funções musculares e de nervos. A concentração de sódio no sangue é determinada pela alimentação, ingestão de líquidos e é excretado na urina. O aumento nos níveis de sódio se deve principalmente à perda água maior que a excreção do eletrólito e sua diminuição sérica associada ao processo inverso (Bohn, 2012).

Nos rins, o movimento de água está relacionado, de várias maneiras, ao transporte de sódio. A reabsorção de sódio no túbulo proximal se produz de modo isosmótico e está regulada para manter o volume sanguíneo, enquanto que na porção espessa ascendente da alça de Henle. A reabsorção do sódio sem água constitui a base tanto para a excreção do excesso de água, como para a conservação da água mediante produção de urina diluída ou concentrada (Guyton, 2002).

Os valores séricos de referência para sódio em cobaias variam de 120-152 mmol/L (Campbell, 2012). Apesar de os valores encontrados estarem entre os limites de normalidade, o aumento em curto período de tempo deve ser considerado.

A justificativa para o aumento níveis de fósforo, potássio e sódio pode estar associado às lesões musculares provocadas pelo veneno ou à diminuição da eliminação pelos rins associada a um dano renal conseqüente a lesão muscular (Macedo, 2011). A degeneração e necrose celular ou a

formação de poros nas membranas as torna permeáveis e altera a concentração dos eletrólitos intra e extracelular. Outra justificativa seria a própria ação das neurotoxinas nos receptores colinérgicos nicotínicos alterando também a permeabilidade de canais iônicos e alteração eletrolítica (Gasnov *et al.*, 2015).

Outro fator que pode contribuir para avaliação da função renal são as proteínas plasmáticas. Geralmente as proteínas não são excretadas pelos rins, devido ao tamanho molecular que não permite sua filtração pelo glomérulo, apenas uma pequena quantidade é filtrada e eliminada na urina. Em casos de nefropatias, ocorre perda de proteínas e consequente diminuição sérica (Juzado, Pérez e Díez, 2012; Lopes, Biondo e Santos, 2007; Meuten, 2012). Os valores séricos de proteínas totais não mostraram diferença significativa entre os tempos de avaliação, no grupo veneno e controle (Tabela 14).

Considerando-se o aumento de creatinina e íons (fósforo, sódio e potássio), não se pode descartar a ação nefrotóxica direta do veneno, apesar de nenhuma alteração histológica na microscopia óptica ter sido observada. Deve-se considerar que o tempo foi muito curto, apenas duas horas, ou seja, superagudo. Lesões renais diretas são relatadas em envenenamentos botrópicos (família Viperidae), como no caso da espécie *Bothrops marajoensis*, que provoca redução na resistência vascular renal, no fluxo urinário e na taxa de filtração glomerular pela ação da LAO (presente em grande proporção no veneno dessa serpente) (Dantas *et al.*, 2015). A LAO também está presente no veneno na *M. surinamensis*, mas em proporção muito baixa (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e a ocorrência de lesão renal nesse envenenamento foi discreta (Roodt *et al.*, 2012).

As alterações observadas podem caracterizar um possível início de insuficiência renal aguda (IRA), que ocorre devido à alta suscetibilidade dos rins a efeitos da isquemia e de agentes tóxicos (Grauer, 2010). Será que em períodos maiores de exposição ao veneno, alterações mais graves poderiam ocorrer?

Variações na absorção e excreção renais interferem diretamente no equilíbrio ácido-base, além disso, pacientes com dificuldade respiratória (como ocorreu nos animais envenenados) pode levar a uma retenção de gás carbônico, hipoxemia e acidose respiratória e metabólica (Grauer, 2010).

Apesar da possível alteração na função renal pelo aumento, principalmente da creatinina sérica, fósforo, sódio e potássio, a lesão não levou a alteração sérica de ureia. O aumento da creatinina pode também ter ocorrido devido à lesão muscular grave que ocorreu nos animais envenenados. Mais estudos sobre as lesões renais em animais envenenados pela espécie *M. surinamensis* devem ser realizados para melhor esclarecimento dos danos provocados.

O exame da urina serve como complemento na avaliação renal, mas nesse estudo, não foi possível sua realização devido ao número reduzido de animais que ainda continham urina na bexiga durante a necropsia. A ausência de urina nos animais não ocorreu por restrição à água, uma vez que o acesso era livre. Possivelmente os animais, podem ter diminuído a ingestão de água ou urinado antes de sua manipulação no início do envenenamento.

#### 5.4.4 – Proteinograma fracionado

Os valores para o proteinograma fracionado realizado por eletroforese horizontal, estão apresentados na tabela 15.

**Tabela 15:** Valores médios e desvio padrão de proteína total (g/dl) e fracionada (g/dl) mensuradas no soro de cobaias, antes (T0) e 2h após (TF) a injeção de veneno *Micrurus surinamensis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Grupos	Momentos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
<b>PT</b> (g/dl)	T0	6,03 ± 0,92	6,13 ± 0,47
	TF	6,10 ± 1,15	5,60 ± 0,54
<b>Albumina</b> (g/dl)	T0	3,80 ± 0,57	3,78 ± 0,47
	TF	3,98 ± 0,77	3,46 ± 0,51
<b>A/G</b> (g/dl)	T0	1,91 ± 0,12	1,62 ± 0,27
	TF	2,01 ± 0,35 <b>a</b>	1,63 ± 0,31 <b>b</b>
<b>α-1 globulina</b> (g/dl)	T0	0,69 ± 0,17	0,70 ± 0,06
	TF	0,75 ± 0,14	0,70 ± 0,15
<b>α-2 globulina</b> (g/dl)	T0	0,84 ± 0,14	0,94 ± 0,12
	TF	0,84 ± 0,26	0,75 ± 0,15
<b>β-1 globulina</b> (g/dl)	T0	0,15 ± 0,08	0,19 ± 0,06
	TF	0,16 ± 0,06	0,20 ± 0,05
<b>β-2 globulina</b> (g/dl)	T0	0,21 ± 0,11	0,32 ± 0,06
	TF	0,26 ± 0,09	0,32 ± 0,05
<b>γ globulina</b> (g/dl)	T0	0,16 ± 0,09	0,21 ± 0,09
	TF	0,17 ± 0,10	0,18 ± 0,04

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na linha ou letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si segundo análise de regressão por modelo misto em nível de significância  $p < 0,05$ .

Avaliando os resultados da Tabela 15, percebe-se que as proteínas totais e as fracionadas não mostraram alteração na comparação entre os tempos, apenas um aumento na relação A/G ( $P < 0,05$ ) entre os grupos (controle e veneno) no TF. Os valores de referência em cobaias para proteínas totais, variam de 4,2-6,8 g/dl e para albumina, de 2,1-3,9 g/dL (Campbell, 2012). Todavia, não foram encontrados valores de referência do fracionamento proteico para a cobaia.

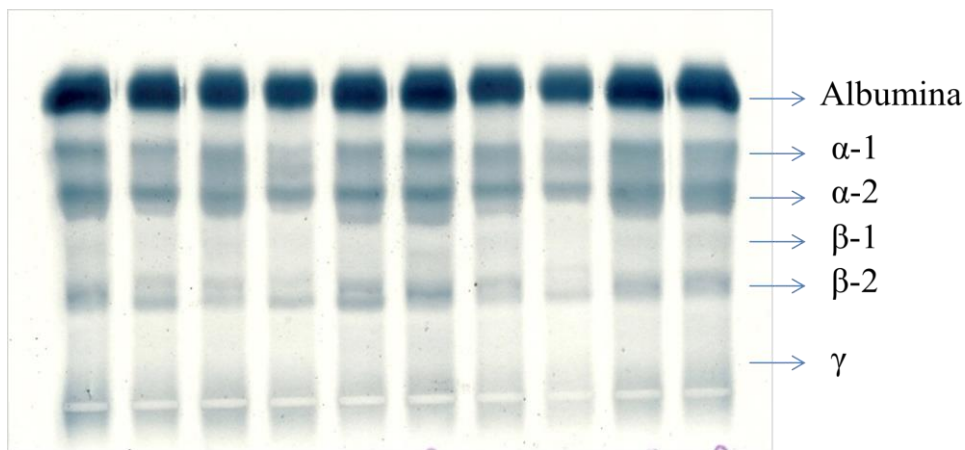
As proteínas plasmáticas estão envolvidas em múltiplas funções, tais como manutenção da pressão osmótica e viscosidade do sangue, transporte de substâncias (nutrientes, hormônios, metabólitos), regulação do pH e coagulação do sangue. Sua síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal e com a funcionalidade hepática (González e Scheffer, 2003). A concentração das proteínas totais pode ser afetada por alterações de síntese hepática, desidratação ou super-hidratação (Juzado, Pérez e Díez, 2012).

O perfil fracionado das proteínas plasmáticas para verificação das concentrações de albumina e globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e a relação albumina/globulina (A/G). A albumina é a proteína mais abundante no organismo e é sintetizada no fígado. As proteínas  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas são sintetizadas

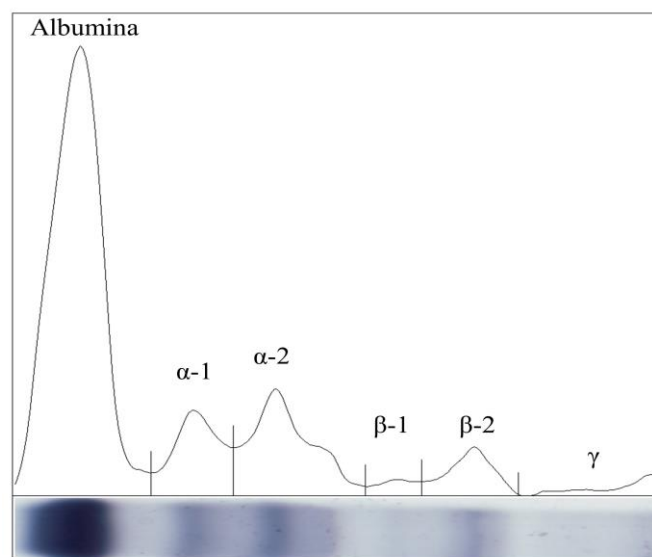
em resposta a processos inflamatórios agudos (proteínas de fase aguda) e as  $\gamma$  globulinas (compostas pelas imunoglobulinas IgA, IgM, IgE) aumentam nas inflamações crônicas (Oliveira *et al.*, 2015). Sugerem a ocorrência também disfunções hepáticas, perdas proteicas, síndromes nefróticas e outras alterações que ajudam no entendimento da resposta imunológica (Naoum, 1990).

O fracionamento proteico em gel de agarose, realizado nas cobaias estão apresentados na figura 24 e a curva gerada na leitura do gel, está apresentado na figura 25. Em cobaias foi observada a separação de seis bandas: albumina,  $\alpha$  -1 globulina,  $\alpha$  -2 globulina,  $\beta$ -1 globulina e  $\beta$ -2 globulina e  $\gamma$ - globulinas.

**Figura 24:** Gel de agarose demonstrando o fracionamento eletroforético das proteínas séricas de cobaias (grupo controle). Notar a formação de seis bandas distintas.



**Figura 25:** Perfil eletroforético demonstrando as seis frações proteicas do soro de cobaias (animal do grupo controle).



Apesar de o aumento de leucócitos, discutidos anteriormente, indicarem a ocorrência de um processo inflamatório agudo, o tempo de avaliação não foi suficiente para gerar alteração nas proteínas, tanto total como fracionada, sem diferenças entre os grupos e os tempos. O aumento nas proteínas totais ocorre mais frequentemente em patologias crônicas, danos renais e hepáticos (Allison, 2012). Como já relatado, os animais não apresentaram lesão hepática ao exame bioquímico e na avaliação histológica e também não apresentavam sinais de desidratação, o que pode justificar a normalidade das proteínas nos grupos.

## **5.5 - Avaliação Macroscópica e Histológica**

À macroscopia de todos os órgãos, não foram observadas alterações nos dois grupos estudados.

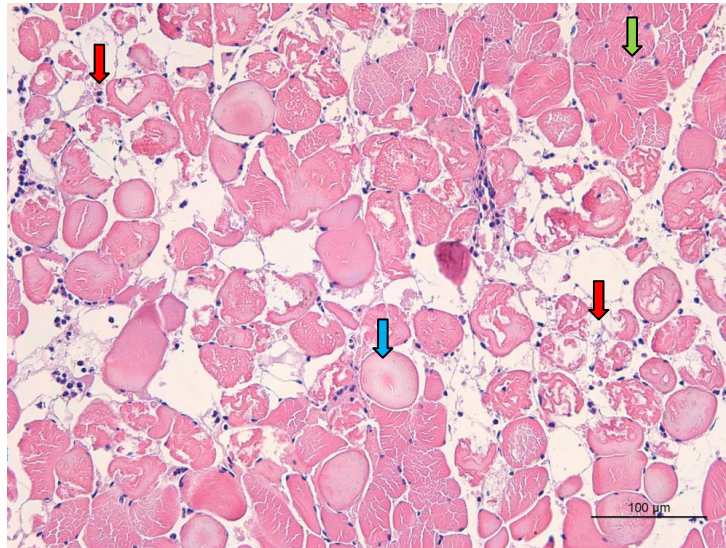
### **5.5.1. Microscopia óptica**

Foram realizados estudos microscópicos (microscopia óptica) do cérebro, coração, fígado, rins, baço, pulmões e músculo (bíceps femoral). Com exceção de uma cobaia do grupo veneno (animal 5), que apresentou um acúmulo de heterofilos nos vasos sanguíneos cerebrais, somente os tecidos musculares (esquelético e cardíaco) dos animais envenenados, foram os que apresentaram alterações dignas de nota.

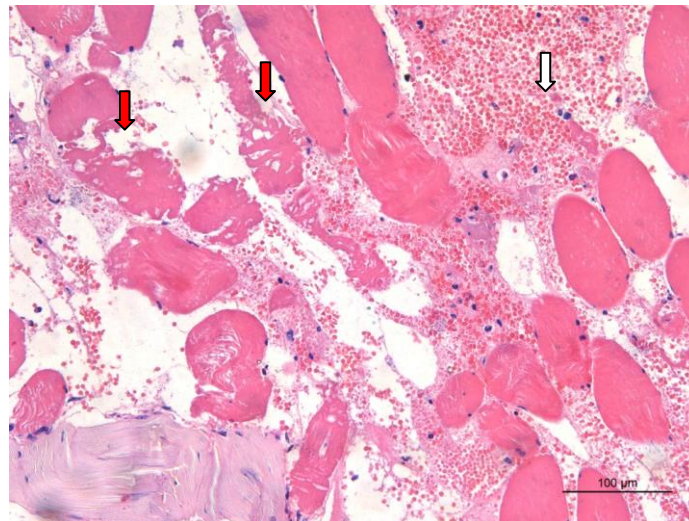
A histologia do tecido muscular esquelético revelou, no animal 2 do grupo veneno, necrose e degeneração muscular multifocal à coalescente, separação das fibras e acúmulo de material eosinofílico (sugestivo de edema) com miosite linfocítico-plasmocitária e heterofílica, conforme demonstrado na Figura 26. E o animal 4 do grupo veneno, apresentou fibras musculares esqueléticas com necrose caracterizadas por segmentação e floculação do sarcoplasma com múltiplos vacúolos, perda dos limites celulares e extravasamento de hemácias no endomísio (hemorragia) (Figura 27).



**Figura 26:** Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 2) após injeção de veneno da serpente *Micrurus surinamensis* apresentando fibras musculares normais (seta verde), fibras com degeneração hialina (seta azul) e necrose (setas vermelhas). Coloração HE, Bars = 100µm.



**Figura 27.** Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 4) após injeção de veneno da serpente *Micrurus surinamensis* apresentando fibras musculares com necrose caracterizada por segmentação e floculação do sarcoplasma com múltiplos vacúolos, perda dos limites celulares (seta vermelha), extravasamento de hemácias no endomísio (hemorragia) (seta branca). Coloração HE, Bars = 100µm.

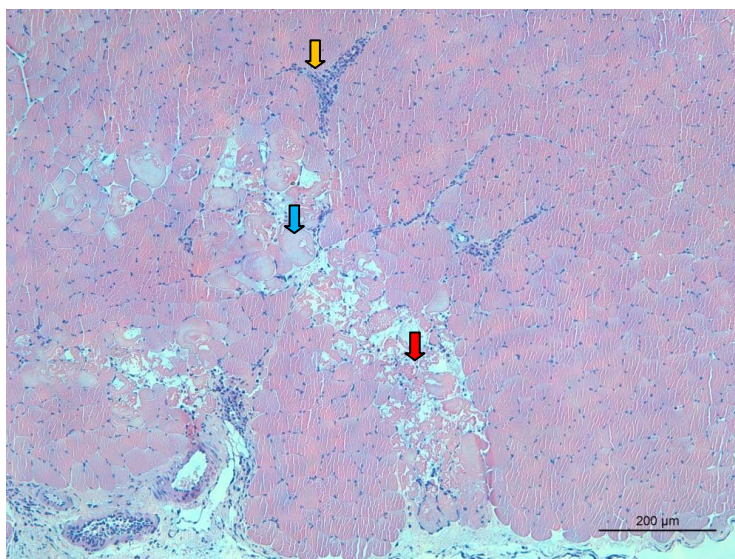


Na maioria dos casos, a necrose da fibra muscular esquelética ocorre de forma segmentar (afeta um segmento da fibra) e somente em casos de esmagamento muscular ou isquemia de grandes áreas, é que podem ocorrer lesões que afetem toda a fibra (Barros, 2016). Processo semelhante

foi visualizado na figura 26, com fibras com diâmetro maior (perdem a angulosidade) com sarcoplasma de coloração mais eosinofílica, perda de estriações e fragmentação com aspecto de flocos ou grânulos. O que ocorre após a instauração do processo de necrose irá interferir diretamente na recuperação da miofibrila. Quando o aporte sanguíneo não é afetado ocorre a ação de células inflamatórias, principalmente macrófagos (derivados dos monócitos do sangue), que agem cerca de 24 a 48 horas após a lesão, na retirada dos detritos sarcoplasmáticos (Barros, 2016). No caso do animal 4, onde a microvasculatura foi comprometida, a recuperação da musculatura, em acidentes naturais, poderia retardar a regeneração das fibras e formar áreas de fibrose.

O tipo de necrose observada nos dois animais do grupo veneno se distribuiu em trajetos ramificados ao longo do músculo (Figura 28). Foram visualizadas desde a perda da angulosidade das fibras até fibras necróticas.

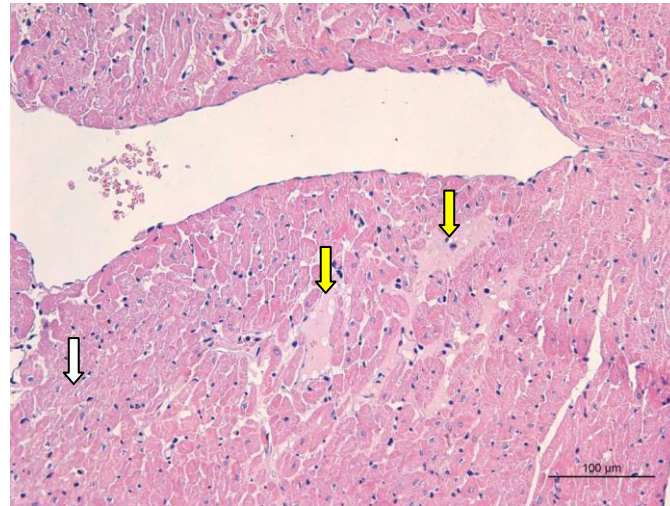
**Figura 28:** Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 2) após injeção de veneno da serpente *Micrurus surinamensis* mostrando a distribuição do veneno marcado por áreas de fibras com degeneração hialina (seta azul) e necrose (seta vermelha) miosite heterofílica (seta laranja) na musculatura esquelética. Coloração HE, Bars = 200µm.



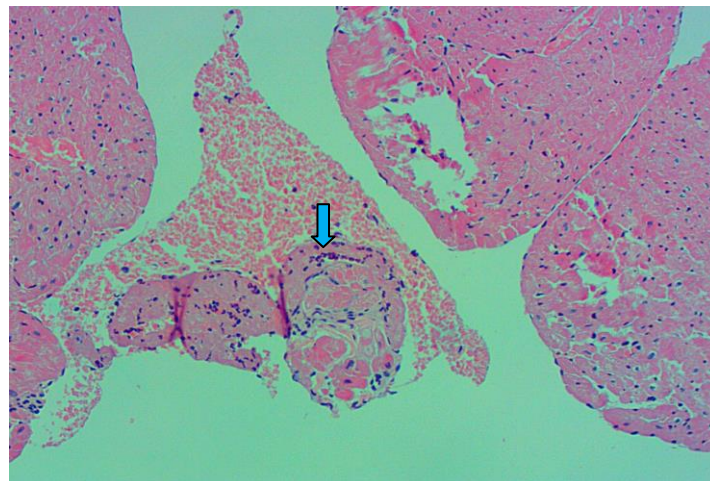
Estudos histológicos da musculatura esquelética de animais inoculados quatro horas após a aplicação via intraperitoneal do veneno de *M. fulvius* mostraram, fibras com perda da angulosidade e com degeneração hialina (Weis e McIsaac, 1971).

À microscopia óptica do músculo cardíaco do animal 6 (grupo veneno), foram visualizados, edema leve multifocal no miocárdio e agregados de heterófilos, eritrócitos e fibrina no músculo papilar (Figuras 29 e 30). O animal 5 (grupo veneno) apresentou apenas uma miocardite focal leve, enquanto que nas lâminas dos demais animais do grupo veneno, nenhuma alteração foi observada. No grupo controle, observou-se uma miocardite linfo-plasmocitária focal discreta no animal 10 e agregado de heterófilos no interior de vasos sanguíneos no miocárdio, nos animais 8 e 12, excluindo a ação do veneno como causador desta inflamação.

**Figura 29:** Secção histológica de tecido muscular estriado cardíaco de cobaia (animal 6) após injeção de veneno da serpente *Micrurus surinamensis* apresentando edema multifocal discreto (setas amarelas) e fibras musculares cardíacas normais (seta branca). Coloração HE, Bars = 100µm.



**Figura 30:** Secção histológica de tecido muscular estriado cardíaco e fragmentos de músculo papilar de cobaia (animal 6) após injeção de veneno da serpente *Micrurus surinamensis* mostrando agregados de heterófilos, eritrócitos e fibrina (seta azul). Coloração HE, Bars = 100µm.



O veneno da *M. surinamensis* mostrou discreta miotoxicidade na avaliação de microscopia óptica, assim como descrito na literatura por Gutiérrez *et al.*, 1983 e Roodt *et al.*, 2012. Todavia, as enzimas musculares aumentaram de forma significativa 2h após a inoculação do veneno: a CK teve um acréscimo de 452,5%; a CK-MB cerca de 115,3% e LDH 120%,

mostrando que apesar de discretas alterações à microscopia óptica, as lesões musculares podem ter ocorrido.

Os resultados encontrados em relação a ação local do veneno de *M. surinamensis* diferem na literatura consultada. Gutiérrez *et al.* (1983), afirmaram que o veneno da *M. surinamensis* não possui atividade edematogênica na musculatura esquelética (no local da aplicação do veneno), diferente dos estudos de Cecchini *et al.* (2005), que mostraram a ocorrência de discreto local, após aplicação do veneno.

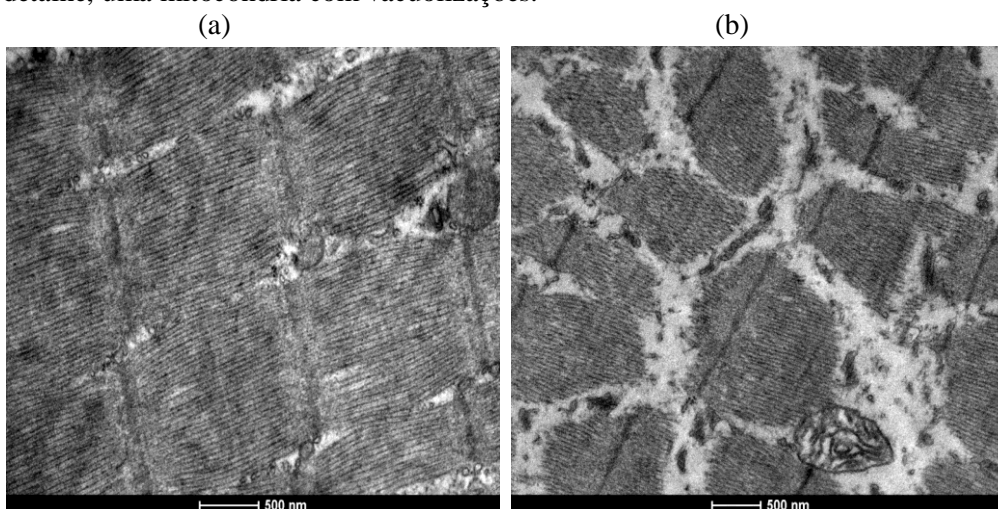
### 5.5.2 - Microscopia eletrônica

Foram enviados para a microscopia eletrônica fragmentos de músculo esquelético do animal 2 (grupo veneno) e do animal 8 (grupo controle), além dos fragmentos de músculo cardíaco dos animais 6 (grupo veneno) e 7 (grupo controle). Os fragmentos musculares do grupo controle serviram como padrão.

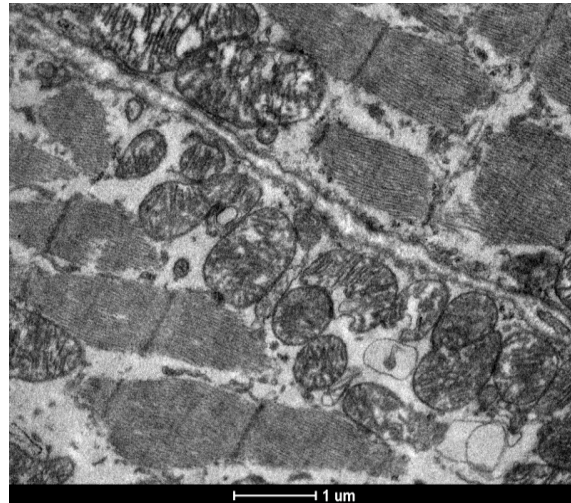
Na microscopia eletrônica, as lesões musculares foram bem evidentes, com destruição das fibras musculares esqueléticas (figuras 32 e 33). Nos dois animais, animal 2 (grupo veneno) e animal 8 (grupo controle), foram visualizados espaçamentos entre as fibras musculares e mitocôndrias com vacuolizações, sugerindo possíveis alterações por preparação do material.

Para comparação, a figura 31 representa um músculo esquelético normal em visão microestrutural.

**Figura 31:** Secção histológica de tecido muscular esquelético normal (animal 8 do grupo controle)(a) e após injeção de veneno de serpente *Micrurus surinamensis* (animal 2)(b) em visão microestrutural a 500nm mostrando perda de continuidade e grandes espaços entre as fibras. Em detalhe, uma mitocôndria com vacuolizações.



**Figura 32:** Secção histológica de tecido muscular esquelético de cobaia (animal 2) após injeção de veneno da serpente *Micrurus surinamensis*, mostrando perda de continuidade, grandes espaços entre as fibras e em detalhe, uma mitocôndria com vacuolizações em visão microestrutural a 500nm.

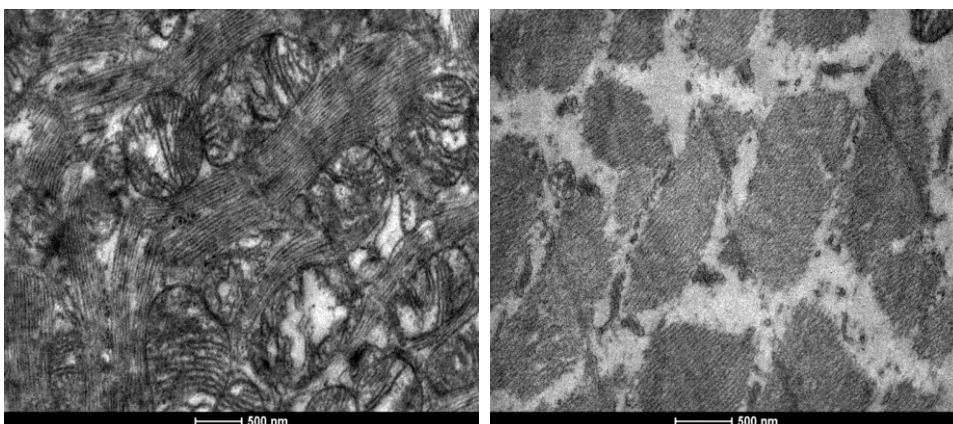


Na visualização microestrutural das fibras esqueléticas cardíacas foram observadas lesões musculares semelhantes ao músculo esquelético, que não haviam sido visualizadas em microscopia óptica (Figura 33). As fibras musculares cardíacas apresentaram perda de continuidade, grandes espaços entre as fibras e mitocôndrias vacuolizadas, nos animais do grupo veneno e controle, sugerindo possíveis alterações por preparação do material. Para comparação, a figura 33 representa um músculo cardíaco normal em visão microestrutural.

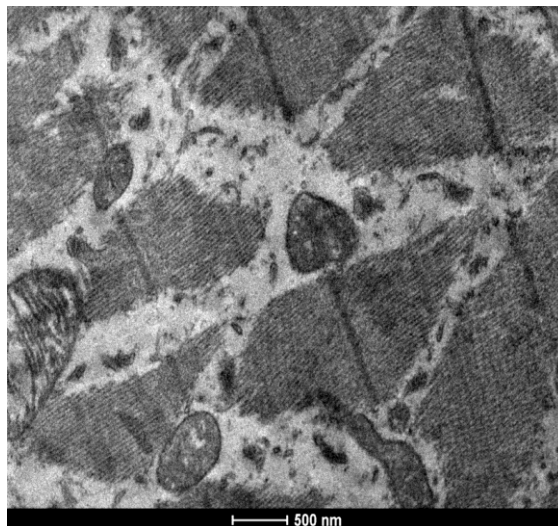
**Figura 33:** Secção histológica de tecido muscular cardíaco normal (animal 7 do grupo controle)(a) e após injeção de veneno de serpente *Micrurus surinamensis* (animal 6)(b) mostrando as perdas de continuidade das fibras musculares, em visão microestrutural a 500nm.

(a)

(b)



**Figura 34:** Secção histológica de tecido muscular cardíaco de cobaia (animal 6) após injeção de veneno da serpente *Micrurus surinamensis* em visão microestrutural a 500nm mostrando as perdas de continuidade das fibras musculares.



Segundo estudos de Gutiérrez *et al.* (1983), o veneno das cobras-corais possui capacidade de gerar mionecrose em até três horas de envenenamento, mas a peçonha de *M. surinamensis* mostrou menor capacidade miotóxica comparada a espécies como *M. nigrocinctus*, *M. frontalis*, *M. allerri* e *M. carinicauda*. Os animais envenenados mostraram discreta mionecrose, assim como relatado anteriormente na microscopia óptica.

Na análise microestrutural, a lesão ficou evidente, mostrando que o veneno é capaz de danificar as fibras musculares em apenas duas horas de envenenamento. A lesão muscular é grave e corrobora a elevação das enzimas CK, CK-MB, LDH e AST.

Como o veneno de *M. surinamensis* possui maior concentração de proteínas 3FTx, com ação predominante neurotóxica e pequena fração fosfolipásica, foi descrito que o mesmo possui baixa capacidade miotóxica, uma vez que a miotoxicidade está associada a maior presença de PLA<sub>2</sub> (Gutiérrez *et al.*, 1983; Lomonte *et al.*, 2016). Todavia, estes conceitos devam ser reavaliados, já que nesta pesquisa detectou-se aumento considerável de enzimas musculares nos animais envenenados, além das lesões vistas na microscopia eletrônica na fibra muscular 2h após o envenenamento.

Na avaliação geral dos animais envenenados, todos apresentaram alterações clínicas e laboratoriais, todavia em diferentes graus. Quando se consideram todos os parâmetros (exame físico e neurológico, eletrocardiograma, exames laboratoriais e histologia), dois animais apresentaram quadro muito grave (animais 1, 2, 3 e 6), dois apresentaram quadro moderado (4 e 5).

O animal 1, ao exame neurológico, apresentou alterações significativas no padrão respiratório, mental e tônus muscular uma hora após a aplicação do veneno. Ao tempo final de sua avaliação (1h30), este animal mostrou uma evolução muito rápida e grave dos sinais clínicos e ao exame eletrocardiográfico, apresentou BAV de 1º grau. Na avaliação individual, os valores de

leucócitos dobraram em relação ao T0, os valores bioquímicos de CK tiveram o segundo maior aumento do grupo (cerca cinco vezes maior que os valores basais), com aumento moderado das enzimas musculares (CK-MB, LDH e AST).

O animal 2 foi o primeiro a apresentar alterações ao exame físico e foi o quadro mais grave ao exame neurológico, com alteração em todos os parâmetros neurológicos avaliados, apresentando a segunda maior queda na frequência cardíaca. Ao eletrocardiograma também apresentou diversas alterações tais como: extrassístoles supraventriculares e ventriculares, parada sinusal e consequentes escapes juncionais, além de BAV de 1° e 3° graus. Na avaliação laboratorial individual, apresentou os maiores aumentos do grupo para as enzimas CK-Mb e LDH. Na análise de microscopia óptica e microestrutural, apresentou lesão de fibras musculares esqueléticas (necrose e degeneração das fibras musculares). Foi o único animal a mostrar alterações significativas em todos os tipos de avaliação (física, eletrocardiográfica, laboratorial e histológica).

O animal 3 apresentou a segunda maior pontuação ao exame neurológico (quanto maior a pontuação, maior o comprometimento do SNC), com a maior queda da frequência cardíaca entre todos os animais. Ao exame eletrocardiográfico, apresentou arritmia e parada sinusal com consequente escape juncional e BAV de 2° e 3° graus. Os exames laboratoriais, mostraram o maior aumento no número de leucócitos e na concentração de CK e o segundo maior aumento nas concentrações de CK-MB e LDH.

O animal 4 apresentou sinais clínicos menos graves quando comparado com todos os animais do grupo veneno, mostrando apenas alteração no padrão respiratório e discreta depressão do SNC, obtendo a menor pontuação, na tabela de pontuação neurológica. Ao eletrocardiograma apresentou frequência cardíaca reduzida, sem arritmias. Todavia, os exames laboratoriais mostraram alterações mais significativas com o maior aumento no número de heterófilos e um aumento 17,9 vezes maior, em relação ao T0, na concentração de CK ao tempo final (2h). Este animal foi o único a demonstrar incômodo no local de aplicação do veneno e apresentou hemorragia e necrose da musculatura esquelética, visualizadas na microscopia óptica.

O animal 5, semelhante ao animal 4, apresentou uma pontuação baixa ao exame neurológico, com alteração no padrão respiratório e depressão do SNC. Ao eletrocardiograma apresentou extrassístoles ventriculares e diminuição da frequência cardíaca. Nos exames laboratoriais, apresentou o maior aumento na concentração de AST e segundo maior aumento no número de leucócitos totais e de heterófilos.

Por fim, o animal 6, recebeu a terceira maior pontuação ao exame neurológico com paralisia total além de alteração no padrão respiratório e estado comatoso. Ao exame eletrocardiográfico, foi observado BAV 3° grau. Nos exames laboratoriais, mostrou o maior aumento no número de leucócitos totais e o segundo na concentração de heterófilos. Foi um animal, ao exame físico, considerado um dos mais graves, mas com discretas alterações laboratoriais.

## 6 – CONCLUSÕES

Ao exame físico, o veneno de *M. surinamensis* mostrou-se neurotóxico para cobaias com alterações, principalmente, na região do tronco encefálico devido à alteração no padrão respiratório e mental em todos os animais do grupo veneno. O bloqueio de receptores

colinérgicos nicotínicos da Ach provocado pelo veneno levou a um comprometimento generalizado do SNC e na modulação do funcionamento de órgãos como o coração, pelo SNA. Os sinais clínicos apareceram entre 30 minutos à uma hora após a inoculação do veneno e a dificuldade respiratória logo progrediu para alterações motoras, no estado mental, até a paralisia total.

O veneno de *M. surinamensis* foi capaz de causar alteração na condução elétrica do coração de cobaias, evidenciadas no eletrocardiograma, que mostraram a ocorrência de BAV de 1º, 2º e 3º graus, extrassístoles ventriculares, presença de complexos QRS bizarros. Além disso, alterações musculares cardíacas foram comprovadas pela dosagem da enzima CK-MB, que se mostrou, significativamente, elevada após a aplicação do veneno, o que sugere que houve comprometimento das células musculares cardíacas.

Em relação ao perfil hematológico e coagulograma, apenas pode observar uma leucocitose com neutrofilia e linfopenia.

Na bioquímica sérica houve alteração na concentração de creatinina e dos eletrólitos, sódio, fósforo que pode estar associada à citotoxicidade das toxinas 3FTx, com presença de mioglobinemia, já que houve aumento acentuado de CK, indicando lesão de fibra muscular.

A capacidade de lesão muscular foi evidente tanto na musculatura esquelética quanto cardíaca pela elevação das enzimas marcadoras de lesão muscular, tais como CK, CK-MB, LDH e AST, comprovando a atividade miotóxica do veneno.

Na microscopia óptica, foi evidenciada necrose na musculatura esquelética em apenas dois dos seis animais do grupo veneno, de grau leve e um animal apresentou áreas de hemorragia. Estes dois animais foram enviados para a microscopia eletrônica, confirmando os danos nas fibras musculares, esquelética e cardíaca.

Assim, nesse trabalho, conseguiu-se demonstrar de forma inédita, as alterações cardíacas graves e agudas, causadas 2h após a administração do veneno de *M. surinamensis* em cobaias.



## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, S.D. DA SILVA Jr., N.J. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 99B, p.287-294, 1991.
- ALAPE-GIRÓN, A.; PERSSON, B.; CEDERLUND, E., *et al.* Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. *European Journal Biochemistry*, p.225–234, 1999.
- ALLISON, R.W. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; *et al.* Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2 ed, p. 401-475, 2012.
- AMARAL, C. F. S. Cuidados Intensivos nos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H. *et al.* Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo - SP, Ed *Savier*, p. 446-453, 2009.
- ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B. Toxicologia na prática clínica. Belo Horizonte, MG. Ed. *Folium*, 2.ed. p.491-509, 2013.
- APPIAH-ANKAM,J.; HUNTER, J.M. Pharmacology of neuromuscular blocking drugs. The Board of Management and Trustees. *British Journal of Anaesthesia*, 2004. Disponível em: <http://ceaccp.oxfordjournals.org/>. Dezembro, 2016.
- ARCE, V.; ROJAS, E.; OWNBY, C.L. *et al.* Preclinical assessment of the ability of polyvalent (Crotalinae) and anticoral (Elapidae) antivenoms produced in Costa Rica to neutralize the venoms of North American snakes. *Toxicon*, v.41, p.851–860, 2003.
- 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.
- ARROYO, O.; ROSSO, J.P.; VARGAS, O. Skeletal muscle necrosis induced by a phospholipase ae isolated from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 87B, n. 4, p. 949-952, 1987.
- BAKER, D.C. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; *et al.* Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2 ed., p. 185-204, 2012.
- BANKS, W.J. Histologia Veterinária Aplicada. Ed. *Manole*, 2 ed., São Paulo, 1991.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, p.14-20, 1990.
- BARROS, A.C.S.; FERNANDI, D.P.; FERREIRA, L.C.L. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus sp.* (coral snakes). *Toxicon*, v.32, n.4, p. 445-452, 1994.

BARROS, C.S.L. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. Patologia veterinária. Rio de Janeiro, Ed. *Roca*, 2 ed., p. 663-701, 2016.

BENARD-VALLE, M.; CARBAJAL-SAUCEDO, A.; ROODT, A. *et al.* Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*, v.77, p. 6-15, 2014.

BOHLEN, C.J., CHESLER, A.T., SHARIF-NAEINI, R., *et al.* A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature*, v.479, p.410-414, 2011.

BONH, A. Laboratory evaluation of electrolytes. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; *et al.* Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*, p. 518, 2012.

BOLAÑOS, R. Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centroamerica. San José, Costa Rica. *Editorial Universidad de Costa Rica*, v.46, p.275-291, 1984.

BOZZINI C.E.; MOLINAS, F. Hemostasia. In: Houssay, A.B.; Cirgolani, H.E. Fisiologia Humana de Houssay. Porto Alegre, *Artmed*, 7 ed., 2004.

BRANCO, S.E.M.T. Emulsão Lipídica no Tratamento de Coelhos Nova Zelândia Intoxicados pela Ivermectina –Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte –MG. *Escola de Veterinária da UFMG*, p.62, 2015.

BRAUN, J.P.; LEFEBVRE, H. P.; WATSON, A.D.J. Creatinine in the dog, a review. *Veterinary Clinical Pathology*, v.32, p.162-179, 2003.

BUCARETCHI, F.S.; HYSLPO, S.; VIEIRA, R.J. *et al.* Bites by coral snakes (*Micrurus spp.*) in Campinas, State of São Paulo, southeastern Brazil. São Paulo-SP, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.48, p. 141-145, 2006.

CAMACHO, A.A.; MUCHA, C.J. In: FEITOSA, F.L.F. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. São Paulo-SP, Ed. *Roca*, 2 ed., p. 445 -459, 2008.

CAMPBELL, J.A e LAMAR, W.W. The venomous reptiles of the western Hemisphere. Ithaca (NY), *Comstock Publishing Associates*, 2004.

CAMPBELL, T. W. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; *et al.* Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*, 2 ed., p. 571-580, 2012.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H. *et al.* Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo - SP, Ed *Savier*, p.468, 2003.

CARLOS, M.M.L.e FREITAS, P.D.F.S. Estudo da cascata de coagulação sangüínea e seus valores de referência. *Acta Veterinaria Brasília*, v.1, n.2, p.49-55, 2007.

- CASTRO, K.L.; DUARTE, C.G; RAMOS, H.R. Identification and characterization of B-cell epitopes of 3FTx and PLA2 toxins from *Micrurus corallinus* snake venom. *Toxicon*, v.93, p.51-60, 2015.
- CECCHINI, A. L.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L.B. *et al.* Biological and enzymatic activities of *Micrurus sp.* (Coral) snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 140, p. 125– 134, 2005.
- CHEW, D.J.; NAGODE, L.A. Renal secondary hyperparathyroidism. *Proceedings of the Entomological Society*, 1990.
- CISCOTTO, P.H.C.; RATES, B.; DANIEL A.F. SILVA, D.A.F. *et al.* Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. Elsevier, *Jornal of Proteomics*, v.74, p.1810-1824, 2011.
- COELHO, M.P.R.C.; GUTIERREZ, J.S.; MARTINS, B.D.C. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia: Neurologia em cães e gatos. Belo Horizonte, MG. Ed. *Fundação de Estudos e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.2, p.7-25, 2013.
- CONCEA. Diretrizes da prática de Eutanásia. Ministério da ciência, tecnologia e inovação. Brasília/DF, 2013.
- CORRÊA-NETTO, C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; SILVA, D.A., *et al.* Snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *Journal Proteomics*, v.74, 1795-17809, 2011.
- COROMINAS, A.I.; BALCONI, S.N.; PALERMO, M. *et al.* Niveles de ácido úrico sérico y riesgo de desarrollar preeclampsia. *Medicina (Buenos Aires)*, v.74, p.462-471, 2014.
- COUTO, C.G. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. *Medicina interna de pequenos animais.* (traduzido) Rio de Janeiro, Ed. *Elsevier*, 4 ed., p. 985-1008, 2010.
- CUNNINGHAM, I.G.; KLEIN, B.C. *Fisiología veterinária.* España, Ed *Elsevier Saunders*, 4 ed., p.6-145, 2009.
- DANTAS, R.T.; JORGE, A.R.C.; JORGE, R.J.B. L-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* causes nephrotoxicity in isolated perfused kidney and cytotoxicity in MDCK renal cells. *Toxicon*, v.104, p. 52-56, 2015.
- DI-BERNARDO, M.; BORGES-MARTINS, M.; SILVA JR, N.J. A new species of coral snake (*Micrurus*: Elapidae) from southern Brazil. *Zootaxa*, (1447), p. 1–26, 2007.
- EATON, D.L.; GILBERT, S.G. In: Casarett and Doull's *Toxicology. The basic science of poisons.* Ed. *Mc GrawHill*. p.1293, 2008.
- FAVUS, M.J. E LANGMAN, C.B. Evidence for calcium-defender control of 1,25 dihydroxyvitamin D, production by rat kidney proximal tubules. *The Journal os Biological Chemistry*, v.261, p.11224, 1986.

FERNANDEZ, J.; ALAPE-GIRÓN, A.; ANGULO, Y., *et al.* Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *Journal Proteomic Research*, v. 10, p.1816-1827, 2011.

FRANCIS, B.R.; DA SILVA JR., N.J.; SEEBART, C., *et al.* Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*, v.35, p.1193-1203, 1997.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED). Animais Peçonhentos (Manual técnico). 5º Ed. Belo Horizonte-MG, 2014.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. – Brasília-DF. Vigilância Epidemiológica, p.32-34, 2001.

GASANOV, S.E.; SHRIVASTAVA, I.H.; ISRAILOV, F.S. *et al.* *Naja naja oxiana* Cobra Venom Cytotoxins CTI and CTII Disrupt Mitochondrial Membrane Integrity: Implications for Basic Three-Fingered Cytotoxins. *PLoS ONE*, v.10, n.6, p.28, 2015.

GEIHS, M.A.; VARGAS, M.A.; NERY, L.E.M. Damage caused during hypoxia and reoxygenation in the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda: Varunidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A, v.172, p.1–9, 2014.

GFELLER R.W. & MESSONNIER S.P. Manual de toxicologia e envenenamentos em pequenos animais. São Paulo-SP, Ed.*Roca*, 2. ed. , p.376, 2006.

GERADS, I., TANS, G., YUKELSON, L.Y.A., *et al.* Activation of bovine factor V by an activator purified from the venom of *Naja naja oxiana*. *Toxicon*,v. 30, p.1065–1079, 1992.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, F.H.D. Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do rio Grande do Sul. p.73-89, 2003.

GRAUER, G.F. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. (traduzido) Rio de Janeiro, Ed. *Elsevier*, 4 ed., p. 648-666, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M. Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 20, p.1-9, 2014.

GUTIERREZ, J. M., ROJAS, G., DA SILVA JÚNIOR, N.J., NÚÑEZ, J. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon*, v.30, p.1299-1302, 1992.

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., PORTILLA, E., CERDAS, L., ROJAS, E. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon*, v. 21, p.777–783, 1983.

- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia medica. (traduzido) Philadelphia-USA. Ed Saunders Company, 11 ed., p.115-171, 2002.
- HAYES, A.W. Principles and Methods of Toxicology. New York: *Taylor and Francis*, 4 ed, 2001.
- JUZADO, A.M.; PÉREZ, C.R.; DÍEZ, M.G. In: Manual clínico del perro y gato. Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba, p.394, 2012.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of domestic animals. 5.ed. San Diego: *Academic Press*, p.896, 2008.
- LAGO, L.A.; MELO, M.M.; HENEINE, L.G.D. *et al.* Avaliação clínica de bovinos inoculados com veneno de *Crotalus durissus terrificus* detoxicado por iodação e iodação com encapsulação em lipossomas. *Ciência Animal Brasileira*, v. 13, p. 234-239, 2012.
- LEÃO, L.I. Análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Micrurus corallinus* (cobracoral) e identificação de candidatos antigênicos para um anti-soro alternativo. São Paulo-SP Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, USP, p.127, 2008.
- LEÃO, I.L.; HO, P.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics*, v.10, p.112, 2009.
- LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal. Science*, v.76, n.4, p.12-16, 1998.
- LOPEZ, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. Manual de patologia veterinária. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 3 ed., p.107, 2007.
- LOMONTE, B., REY-SUAREZ, P.; FERNANDEZ, J., *et al.* Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*, v.122, p. 7-25, 2016.
- MACEDO, E. Blood urea nitrogen beyond estimation of renal function. . São Paulo-SP, *School Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins*, v. 39, n.2, 2011.
- MANOCK, S. R.; SUAREZ, G.; GRAHAM, D., *et al.* Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, p.1-6, 2008.
- MARTIN, N.E.; NIETO, V.G. Hypouricemia and tubular transport of uric acid. *Revista Nefrología-España*, v.31, n.1, p.44-50, 2011.
- MARCONDES, M. In: FEITOSA, F.L.F. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. São Paulo, Ed. *Roca*, 2 ed., p. 411-459, 2008.
- MARTINS, B.C.; MELO, E.G. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia: Neurologia em cães e gatos. Belo Horizonte, MG. Ed. *Fundação de Estudos e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.69, p.26-36, 2013.

- MARTOS, C.M.P.; MALDONADO, L.G.; MORÁN, L.C. *et al.* Manual clínico del perro y gato. Hospital clínico veterinario de la Universidad de Córdoba - España, p.394, 2012.
- MEBS, D. e OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their Biochemical and biological activities. *Pharmac. Ther.*, v. 48, p. 223-236, 1990
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H. *et al.* Animais Peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2.ed. São Paulo, Ed. *Sarvier*, p.42-70, 2008.
- MELO, M.M, SOTO-BLANCO, B. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia: Animais Peçonhentos. Belo Horizonte, MG. Ed. *Fundação de Estudos e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.75, p.37-39, 2014.
- MELO, M. M.; HABERMEHL, G. *et al.* Treatment of *Bothrops alternatus* envenomation by Curcuma longa and Calendula officinalis extracts and ar-turmerone. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n.1, p. 7-17, 2005.
- MORAIS, D.H.; ÁVILA, R.W.; KAWASHITA-RIBEIRO, R.A.; CARVALHO, M.A. Squamata, Elapidae, *Micrurus surinamensis* (Cuvier, 1817): New records and distribution map in the state of Mato Grosso, Brazil, with notes on diet and activity period. *Biological sciences*, 2011.
- MEUTEN, D. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; *et al.* Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*, 2 ed., p. 323-377 e 545-570, 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN.Disponível: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Datasus, acesso em dezembro de 2016.
- MOREIRA, K.G.; PRATES, M.V.; ANDRADE, F.A.C.; *et al.* Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*, v.56, p.55-63, 2010.
- MOREIRA, M.A.P.; PONTUAL, K.A.Q.; PEREIRA, M.F. *et al.* Acidente ofídico por coral (*Micrurus lemniscatus*) em cão (*Canis familiares*) – relato de caso. In Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA. *Anais ANCLIVEPA* 2004, v.25, p. 93, 2004. (resumo)
- MOUSSATCHÉ, H., MELÉNDEZ, T. Some pharmacological observations with Elapidae and Crotalidae snake venom in guinea pig denervated diaphragm on specific of cholinergic blockage by venom. *Revista Brasileira de Biologia*, v.39, p.605–610, 1979.
- NAOUM, P.C. Eletroforese: técnicas e diagnósticos. São Paulo: Livraria Santos.. 174p, 1990.
- NETO, D.M. In: FEITOSA, F.L.F. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. São Paulo, Ed. *Roca*, 2 ed., p. 201-245, 2008.

- OCARINO, N.M.; PAIXÃO, T.A.; CARVALHO, E.C.Q.; *et al.* In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. Patologia veterinária. Rio de Janeiro, Ed. *Roca*, 2 ed., p. 49-60, 2016.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T.; BATISTA, C.V.F.; RESTANO-CASSULINI, R. *et al.* Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*, v.8, p.1919-1932, 2008.
- OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T.C.; CAMARGO, F., *et al.* Eletroforese: conceitos e aplicações. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p.1129, 2015.
- OSIPOV, A.V., FILKIN, S.Y., MAKAROVA, Y.V., *et al.* A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the *Naja naja* cobra venom. *Toxicon*, 186–194, 2010.
- PAES, P.R.O.; LEME, F.O.P.; CARNEIRO, R.A. Hematologia dos animais domésticos. Belo Horizonte: *Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2010.
- PESSOA, A.M. Aspectos biológicos na avaliação dos acidentes causados por cobras corais no Brasil. Goiânia-GO. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC. Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde. p.47, 2012.
- PETERSON, M.E. Snake Bite: Coral Snakes. Elsevier Saunders. *Clinical Techniques Small Animal Practice*, v.21, p.183-186, 2006.
- PUERTA, R.C.; GONZÁLEZ, E.C.; MERCEDES, J.M. Atrioventricular nodal reentrant tachycardia. *Cuban Society of Cardiology*, v. 5, n.1, p.108-119, 2013.
- REY-SUAREZ, P.; NÚÑEZ, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; *et al.* Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *Journal Proteomic*, v.75, p.655-667, 2011.
- ROODT, A.R.; LAGO, N.R.; STOCK, R.P. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. Elsevier, *Toxicon*, v.59, p. 356–364, 2012.
- ROSOL, J.; CAPEN, C.C. Pathogenesis of calcium, phosphorus and magnesium metabolism in animal. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v26, p.1155, 1996.
- ROSSO, J.P., VARGAS-ROSSO, O., GUTIÉRREZ, J.M. *et al.* Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major alpha-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *European Journal Biochemistry*, 238, 231–239, 1996.
- SAKATE, M. Zootoxinas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO NETO, J. Toxicologia Aplicada a Medicina Veterinária. Barueri, SP. Ed. *Manole*, 1.ed. p.209-251, 2008.
- SALAZAR, A. M., VIVAS, J., SÁNCHEZ, E.S., *et al.* Hemostatic and toxinological diversities in venom of *Micrurus tener tener*, *Micrurus fulvius fulvius* and *Micrurus isozonus* coral snakes. *Toxicon*, v. 58, p.35–45, 2011.

- SAKURAI, Y., TAKATSUKA, H., YOSHIOKA, A., *et al.* Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon*, v.39, 1827–1833, 2001.
- SANTOS, G.G.L.; CASAIS E SILVA, L.L.; SOARES, M.B.P. *et al.* Antinociceptive properties of *Micrurus lemniscatus* venom. *Toxicon*, v.60, p.1005–1012, 2012.
- SANZ, L., PLA, D., PEREZ, A., RODRÍGUEZ, Y. *et al.* Venomic analysis of the poorly studied desert coral snake, *Micrurus tschudii tschudii*, supports the 3FTx/PLA2 dichotomy across *Micrurus* venoms. *Toxins*, v.8, p.178, 2016.
- SATISH, S., TEJASWINI, J., KRISHNAKANTHA, T.P., GOWDA, T.V. Purification of a Class B1 platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie*, v. 86, p. 203–210, 2004.
- SCHEZARO-RAMOS, R.; FLORIANO, R.S.; PEREIRA, B. B. Comparative neurotoxicity and cytotoxicity of some Brazilian coralsnake venoms. Anais: Internacional Symposium on coralsnakes. Ed. *Espaço Acadêmico*, Goiás, 2016.
- SILVA, C.J.; JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon*, v. 41, p. 251–255, 2009.
- SILVA J.R., N., BUCARETCHI, F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr. Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. *Sarvier & FAPESP*, São Paulo. p. 99–107, 2003.
- SMITH, S.A. In: WEIS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology. Iowa-USA, Ed. *Wiley-BlackWell*, 6 ed., p.635-654, 2010.
- TANAKA, G.D.; FURTADO, M.F.; PORTARO, F.C. *et al.* Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. 3<sup>a</sup> ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.4, p. e622, 2010.
- TAYLOR, S.M. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. (traduzido) Rio de Janeiro, Ed. *Elsevier*, 4 ed., p. 985-1008, 2010.
- THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; *et al.* Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins*, p. 518, 2012.
- THOMSON, C.; HAHN, C. Regional neuroanatomy. In: THOMSON, C.; HAHN, C. Veterinary Neuroanatomy. A clinical approach. London, Ed *Elsevier*, 1 ed, p.1-10, 2012.
- THOMPSON, J.P. Moléstias imunológicas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4ed. São Paulo: *Manole*, p.2616-2666, 1997.
- TUDURY, E.A.; CAMACHO, A.A.; VIDAL, L.M. *et al.* Diagnóstico e tratamento das arritmias de cães e gatos, observadas no monitor cardíaco. Brasília- DF, *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v.IX, n.30, p.25-38, 2003.



TILLEY, L.P.; BURTINICK, N.L. ECG Eletrocardiograma para o clínico de pequenos animais. São Paulo, Ed. *Roca*, 1a ed, 2004.

VALBERG, S.J. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of domestic animals. 5.ed. San Diego: *Academic Press*, p.896, 2008.

VENTURA, A.L.M.; ABREU, P.A.; FREITAS, R.C.C. *et al.* Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v.3, n.2, p.66-72, 2010.

VERGARA, I.; PEDRAZA-ESCALONA, M.; PANIAGUA, D., *et al.* Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. *J. Proteom*, v.105, p.295-306, 2014.

VITAL BRAZIL, O.; VIEIRA, R. J. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases. São Paulo, SP. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*, vol.38, n.1, p. 61-67, 1996.

VITAL-BRAZIL, O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. São Paulo, SP. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.29, p.119-26, 1987.

VITAL BRAZIL, O. & M. D. FONTANA. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. São Paulo, SP. *Memórias do Instituto Butantan*, v.40/41, p.221-240, 1984.

VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Revista da Associação Medica Brasileira*, v.26, p.212-218, 1980.

WARE, W.A. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina interna de pequenos animais. Rio de Janeiro, Ed. *Elsevier*, 4 ed., p. 12-32, 2010.

WEIS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology. Iowa-USA, Ed. *Wiley-BlackWell*, 6 ed., p.893-899, 2010.

WEIS, R., Mc ISAAC, R.J. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. *Toxicon*, v.9, p.219-228, 1971.

## 8 - ANEXO

### 8.1 – Certificado do CEUA

**CEUA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais - UFMG



Cleuza Maria de Faria Rezende [Minha Conta](#) [Sair](#)

[Página Inicial](#) | [Protocolos](#) | [Usuários](#) | [Relatórios](#)



**UFMG**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 192 / 2016, relativo ao projeto intitulado "Estudo clínico do envenenamento por *Micrurus surinamensis* (coral verdadeira)", 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 08/07/2016. Este certificado expira-se em 08/07/2021.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 192 / 2016, related to the Project entitled "Clinical evaluation after *Micrurus surinamensis* (coral snake) envenomation", 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 08/07/2016. This certificate expires in 08/07/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 22/08/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
[www.ufmg.br/bloetica/cetea/ceua](http://www.ufmg.br/bloetica/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/bloetica/cetea](http://www.ufmg.br/bloetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

[CEUA](#) | [Regimento](#) | [Calendário de Reuniões](#) | [Resoluções](#) | [Notícias](#) | [Contato](#) | [SBCAL](#) | [ICLAS](#) | [CIUCA/CONCEA](#)



Desenvolvido por **Adok Software**