

Marthin Raboch Lempek

**ALTERAÇÕES SISTÊMICAS E CARDÍACAS APÓS ENVENENAMENTO
EXPERIMENTAL POR COBRA CORAL *Micrurus frontalis* 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: Prof^a. Dr^a. Marília Martins Melo.

**Belo Horizonte – MG
Escola de Veterinária – UFMG
2018**

L561a

Lempek, Marthin Raboch, 1987-
Alterações sistêmicas e cardíacas após envenenamento experimental por cobra coral
Micrurus frontalis em cobaias (*Cavia porcellus*) / Marthin Raboch Lempek. – 2018.
87 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Porquinho-da-índia como animal de laboratório – Teses. 2. Veneno de cobra – Efeito fisiológico – Teses. 3. Envenenamento – Teses. 4. *Micrurus* – Veneno – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

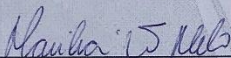
CDD – 615.9

FOLHA DE APROVAÇÃO

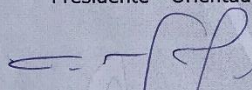
MARTHIN RABOCH LEMPEK

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 MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

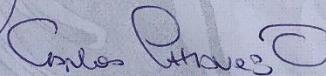
Aprovada em 29 de Janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



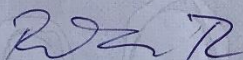
Prof^a. Marília Martins Melo
Presidente - Orientador



Prof. Vitor Márcio Ribeiro
Pontifícia Universidade Católica - PUC-MINAS



Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtegui
Instituto de Ciências Biológicas -ICB- UFMG



Prof. Benito Soto Blanco
Escola de Veterinária - UFMG



Dedico esse trabalho *in memoriam*
à minha amada avó Selly Bruch Raboch.

*“...Talvez você case, talvez não.
Talvez tenha filhos, talvez não.
Talvez se divorcie aos quarenta, talvez dance ciranda em suas
bodas de diamante.
Faça o que fizer não se auto congratule demais, nem
seja severo demais com você,
As suas escolhas tem sempre metade das chances de dar certo,
É assim para todo mundo...
Dedique-se a conhecer seus pais. É impossível prever quando eles
terão ido embora, de vez.
Seja legal com seus irmãos. Eles são a melhor ponte
com o seu passado e
possivelmente quem vão sempre mesmo te apoiar no
futuro...”*

Filtro Solar - Tim Cox - Nigel Swatson

AGRADECIMENTOS

Sempre aprendi que a gratidão é um dever, pois na vida não realizamos nada sozinhos. Temos que ser gratos a tudo. Por isso agradeço a todos que me proporcionaram esta vitória!

Primeiramente quero agradecer a Deus, por ter me dado o dom da vida. Agradeço a Deus por toda a minha caminhada, pois muitas vezes no decorrer da vida não entendemos os nossos percursos. Entretanto, quando olhamos para trás tudo faz sentido...

Agradeço imensamente aos meus pais, César Lempek e Maide Raboch Lempek por terem me dado a oportunidade de uma nova reencarnação, cheia de amor e carinho desde o princípio. Agradeço em especial a minha mãe, mulher batalhadora, de fibra, uma verdadeira heroína, por sempre ter lutado por mim.

Agradeço ao meu irmão Christian Raboch Lempek pela oportunidade de conviver com ele e aprender a dividir a vida. Agradeço por ele cuidar dos meus pais quando não estou por perto.

Como falei do meu irmão de sangue, não poderia de esquecer da minha irmã que a vida me proporcionou, minha irmã Thuanny Soares, a qual dividimos bons e maus momentos durante a graduação. Agradeço pelo seu amor fraternal, pelo seu cuidado comigo durante todos esses anos e não posso esquecer de falar da ótima companheira de viagem que ela é... Coco Bongo!

Quero agradecer aos meus avós Marcus Adam Raboch e Selly Bruch Raboch por sempre estarem do meu lado, independentemente de que plano espiritual estejam. Agradeço a eles, pois foram meus maiores incentivadores a ter contato com os animais, desde os gansos, patos, galinhas, cavalos, bois, vacas, coelhos, ganizes, codornas e porcos. Agradeço por terem feito a minha infância mais feliz.

Quero agradecer a todos os animais que passaram pela minha vida em especial minha primeira coelha, minhas gatas, meus cães em especial, ao Pingo, a Kika, a Nina e minha filhota: Vida.

Agradeço a Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, por ter me proporcionado um aprendizado de excelência em Medicina Veterinária. Em especial a professora e amiga Mere Erika Saito, minha orientadora durante a graduação com a qual aprendi muito e devo muito a ela. Agradeço ao meu amigo e orientador de iniciação científica James Newton Bizetto Meira de Andrade, que me orientou e ajudou nos estudos em cardiologia veterinária, o qual serei grato pelo resto da minha vida.

Agradeço a Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro – UTAD, Portugal, por ter me proporcionado um período incrível de aprendizado científico e humano durante a minha graduação sanduíche.

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG por ter me proporcionado a realização da Residência Multiprofissional em Clínica Médica de Animais de Companhia, na qual aprimorei meus conhecimentos e pude colocar em prática toda a teoria aprendida. Agradeço ao meu orientador e amigo do peito Rubens Antônio Carneiro, o qual tenho muito orgulho de ter sido seu orientado, pois me ensinou muito além da Medicina Veterinária: me ensinou a ser uma pessoa melhor.

Não poderia de esquecer da minha amiga e orientadora Gleidice Lavallo, agradeço por seus ensinamentos e por ter me ajudado durante períodos difíceis da minha vida, saiba que te admiro como profissional e ainda mais como pessoa.

Agradeço ao meu amigo e orientador Júlio Cambraia Veado por ter me introduzido no mundo da Nefrologia Veterinária, além de poder compartilhar de um vasto conhecimento na área. Não poderia esquecer é claro da ótima companhia de viagens, cafés, jantares e congressos, além de agradecer pelo resto da vida, pelas indicações feitas. Vou agradecer sempre pela oportunidade dada em palestrar no Congresso Nacional da ANCLIVEPA em Goiânia e Recife.

Agradeço as minhas eternas R2, Marina, Anne, Renata, Gabriela e Karina por terem me acolhido durante a residência e compartilharem comigo seus conhecimentos e ensinamentos, os quais levarei para toda Vida.

Agradeço a minha amiga e orientadora Marília Martins Melo, por ter me dado um voto de confiança e ter me orientado durante o Mestrado e, me aceitado para o Doutorado. Saiba que tenho o maior orgulho de ser seu orientado, pois te admiro como profissional e muito mais como pessoa. Agradeço por todos os conselhos dados e pelas boas conversas tarde afora.... Espero que eu tenha correspondido às suas expectativas e, só tenho a te agradecer por tudo!

Não poderia de esquecer dos meus amigos, em especial ao Afonso Perez e ao Luiz Eduardo Ristow pela sua amizade e pela confiança em mim depositada. Agradeço ao Laboratório TECSA pelo patrocínio desta pesquisa. Sem essa ajuda seria impossível a realização da mesma com tanta riqueza de detalhes.

Agradeço ao meu amigo e orientador Vitor Márcio Ribeiro pela oportunidade dada e de poder aprender no dia-a-dia uma Medicina Veterinária de excelência, de perfeição, de ética, de profissionalismo e recheada de muita ciência. Agradeço pela confiança em mim depositada e pelo empréstimo dos equipamentos para a realização desta pesquisa.

Não poderia esquecer nunca das minhas duas competentes estagiárias, Amandinha e Maria Angélica, que me ajudaram com brilhantismo na execução desta pesquisa, pela noite adentro. Agradeço por toda ajuda prestada! Sem vocês não conseguiria realizar toda a parte clínica experimental com tamanha habilidade e rapidez!

Agradeço aos meus colegas Luiz Telles e Benjamim Maciel pela amizade e acolhimento durante esses dois anos de companheirismo. Agradeço pelos conselhos dados e muitas vezes pelas broncas também! Saibam que tenho muito orgulho dos profissionais que são e pela amizade de vocês!

Agradeço a todos que me ajudaram no experimento, em especial aos amigos Ana Flávia Machado Botelho e ao Prof. Benito Soto Blanco, os quais foram fundamentais para a realização de algumas etapas, com todos os requintes e detalhes proporcionados por suas análises.

Agradeço aos coordenadores e funcionários do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais pelo amparo administrativo.

Agradeço à agência de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida.

Agradeço a todos os animais que fizeram parte de alguma forma do meu aprendizado, seja ele profissional ou pessoal. E, em especial, agradeço aos animais que fizeram parte desse experimento, pois com os resultados alcançados teremos a possibilidade de salvar vidas: de outros animais e dos homens.

Agradeço a todos os animais que de alguma forma fizeram, fazem ou farão parte de experimentos nesse mundo...

Dedico essa dissertação as pessoas que mais amo e respeito nesse mundo, aos meus pais!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE QUADROS.....	17
LISTAS DE ABREVIATURAS.....	18
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Geral.....	27
2.2 Específicos.....	27
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
3.1 Serpentes.....	28
3.2 Família Elapidae.....	28
3.2.1 <i>Micrurus sp.</i>	29
3.2.2 <i>Micrurus frontalis</i>	30
3.3 Veneno.....	31
3.4 Mecanismo de ação.....	33
3.4.1 <i>Three finger toxin</i> (3FTx).....	33
3.4.2 Fosfolipase A ₂	34
3.4.3 Metaloproteases.....	35
3.5 Sistema cardiovascular.....	36
3.5.1 Coração.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Local.....	38
4.2 Animais.....	38
4.3 Veneno.....	38
4.4 Protocolo experimental.....	38
4.5 Eletrocardiograma (ECG).....	39

4.6 Ecocardiograma (ECO).....	39
4.7 Perfil sanguíneo.....	40
4.8 Eutanásia.....	40
4.8.1 Análise histopatológica.....	40
4.9 Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Quadro clínico.....	42
5.2 Alterações laboratoriais.....	44
5.2.1 Eritrograma.....	44
5.2.2 Leucograma.....	45
5.2.3 Coagulograma.....	47
5.2.4 Perfil bioquímico.....	48
5.2.4.1 Proteinograma e ionograma.....	51
5.2.4.2 Biomarcadores cardíacos.....	54
5.3 Eletrocardiograma.....	56
5.4 Ecocardiograma.....	61
5.5 Avaliação anatomopatológica.....	68
5.5.1 Microscopia óptica.....	68
5.5.2 Microscopia eletrônica.....	72
6. CONCLUSÕES.....	77
7. PERSPECTIVAS.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Valores médios e desvio padrão do eritrograma de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....44
- Tabela 2:** Valores hematológicos de referência para cobaias.....45
- Tabela 3:** Valores médios e desvio padrão do leucograma de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....46
- Tabela 4:** Valores de referência do leucograma para cobaias.....46
- Tabela 5:** Valores médios e desvio padrão do número de plaquetas/ μ l, TTPa (seg), TP (seg), concentração de fibrinogênio (mg/dl) e d-dímero de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....48
- Tabela 6:** Valores séricos médios e desvio padrão de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, ALT, FA, GGT, triglicérides de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após TF (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....49
- Tabela 7:** Valores séricos médios e desvio padrão de CK, LDH e AST de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....49
- Tabela 8:** Valores séricos médios e desvio padrão de ureia e creatinina de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....50
- Tabela 9:** Valores séricos médios e desvio padrão de PCR, procalcitonina e glicose de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....51
- Tabela 10:** Valores séricos médios e desvio padrão das proteínas totais, albumina, globulina, relação albumina/globulina (A/G) de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....52
- Tabela 11:** Valores séricos médios e desvio padrão dos eletrólitos, cálcio, fósforo, potássio, sódio e cloro de cobaias, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....53
- Tabela 12:** Valores séricos médios e desvio padrão da CK-MB, troponina I e BNP, antes (tempo zero) e 2h após (tempo final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....56

Tabela 13: 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), ângulo QRS (°) e FC (frequência cardíaca) (bpm) obtidas a partir do exame eletrocardiográfico de cobaias, antes (tempo zero) e 2h (tempo final) após a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....57

Tabela 14: Alterações eletrocardiográficas encontradas em cobaias, antes (tempo zero) e 2h (tempo final) após a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....59

Tabela 15: Média e desvio padrão de medidas do septo interventricular em sístole e diástole, cavidade do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, parede livre do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, fração de encurtamento, fração de ejeção, distância do ponto E ao septo, átrio esquerdo, aorta, relação átrio esquerdo/aorta, pico de velocidade da onda E mitral, pico de velocidade da onda A mitral, relação onda E/A, pico de velocidade do fluxo aórtico e pico de velocidade do fluxo pulmonar de cobaias, antes (tempo zero) e 2h (tempo final) após a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle).....65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Dentição proteróglifa presente nas serpentes do gênero *Micrurus* com ilustração do sulco por onde passa o veneno para inoculação na presa. Fonte: <http://biologiaeterna.blogspot.com.br/>.....28
- Figura 2.** Mapa do Brasil dividido em regiões com suas respectivas espécies de elapídeos. AC: Acre; AL: Alagoas, AM: Amazonas; AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; DF: Distrito Federal (Capital Federal); ES: Espírito Santo; GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; PA: Pará; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RO: Rondônia; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo; TO: Tocantins. Adaptado de Bucarechi et al., 2016.....29
- Figura 3.** Principais espécies de *Micrurus* no Brasil e sua disposição geográfica. A - *M. corallinus*, B - *M. frontalis* e C - *M. lemniscatus*. Fonte: Ministério da Saúde, 2001.....30
- Figura 4.** Cobra-coral (*Micrurus frontalis*). Observa-se o padrão de sequência de três anéis pretos pelo corpo, denominado de tríades. Fonte: <http://www.herpetofauna.com.br/Corais.htm>.....30
- Figura 5.** Estrutura proteica das principais toxinas *three finger toxin*. A - Erabutoxina, B - α -bungarotoxinas, C - Cardiotoxina, D - κ -bungarotoxinas, E - Candoxina, F - Fasciculina, G - Toxina Muscarínica, H - Toxina FS2, I - Dendroaspina. Fonte: Kini, (2002).....31
- Figura 6.** Distribuição geográfica das espécies de *Micrurus* no continente americano de acordo com a sua principal fração, fosfolipase A₂ ou *three finger toxin*. Fonte: Lomonte et al., (2016).....32
- Figura 7.** Mecanismo de ação das α -neurotoxinas e das fasciculinas. Fonte: Prieto da Silva (2002).....34
- Figura 8.** Tipos de metaloproteases presentes no veneno de serpentes. Fonte: Fox JW e Serrano SMT. FEBS Journal. 2008; 275:3016.....35
- Figura 9.** Esquema da despolarização cardíaca e o influxo de íons. Fonte: Guyton e Hall, (1998).....36
- Figura 10.** Realização do eletrocardiograma computadorizado em cobaia (animal 1). Destaca-se a posição dos eletrodos.....42
- Figura 11.** Presença de midríase ocular irresponsiva a luz e secreção translúcida periocular em cobaia (animal 3), 1 hora e 30 minutos após a inoculação do veneno de *Micrurus frontalis*.....43

- Figura 12.** Traçado eletrocardiográfico de cobaia (animal 5) do grupo veneno (tempo zero) evidenciando o ritmo sinusal. Derivação D2, 25 mm/s, N.....56
- Figura 13.** Traçado eletrocardiográfico de cobaia (animal 5) do grupo veneno (tempo final) com amplitudes de onda R reduzidas. Derivação D2, 25 mm/s, N.....59
- Figura 14.** Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) em cobaia (animal 1) do grupo veneno, 20 minutos após a inoculação de veneno de *Micrurus frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.....60
- Figura 15.** Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) em cobaia (animal 6) do grupo veneno, 34 minutos após a inoculação do veneno de *Micrurus frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.....60
- Figura 16.** Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) em cobaia (animal 4) do grupo veneno, 37 minutos após a inoculação do veneno de *Micrurus frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.....60
- Figura 17.** Extrassístoles ventriculares (ou complexo ventricular prematuro) em cobaia (animal 2) do grupo veneno, 45 minutos após a inoculação do veneno de *Micrurus frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.....60
- Figura 18.** Ecodopplercardiograma de cobaia, em corte paraesternal longitudinal, visualizando-se o septo interventricular, valva mitral, folhetos septal e parietal, átrio esquerdo e ventrículo esquerdo.....61
- Figura 19.** Ecodopplercardiograma de cobaia, em modo M no corte paraesternal do ventrículo esquerdo ao nível dos músculos papilares. Destacam-se, septo interventricular na parte superior do monitor, músculo papilar póstero-medial à esquerda e o ântero-lateral à direita, enquanto que a parede livre do ventrículo esquerdo, figura-se na região inferior do monitor.....62
- Figura 20.** Ecodopplercardiograma de cobaia, em modo M no corte paraesternal do ventrículo esquerdo, ao nível da valva mitral, para mensurar a distância do ponto E ao septo interventricular.....62
- Figura 21.** Ecodopplercardiograma de cobaia, corte paraesternal transversal ao nível da valva aórtica para avaliar a relação átrio esquerdo/aorta.....63
- Figura 22.** Ecodopplercardiograma de cobaia, realizando-se corte paraesternal transversal ao nível da valva aórtica para avaliar com o doppler pulsado o fluxo pulmonar.....63
- Figura 23.** Ecodopplercardiograma de cobaia, realizando-se corte apical cinco câmaras para avaliar por doppler pulsado o fluxo aórtico.....64

- Figura 24.** Ecodopplercardiograma de cobaia, realizando-se corte apical cinco câmaras para avaliar por doppler pulsado onda E e onda A da valva mitral.....64
- Figura 25.** Ecodopplercardiograma de cobaia antes (Figura A) e duas horas após envenenamento por *Micrurus frontalis* (Figura B). Realização em modo M no corte paraesternal do ventrículo esquerdo, ao nível dos músculos papilares, demonstrando a diminuição da fração de encurtamento e fração de ejeção após envenenamento.....66
- Figura 26.** Ecodopplercardiograma de cobaia antes (Figura A) e duas horas após envenenamento por *Micrurus frontalis* (Figura B). Realização de corte paraesternal transversal no nível da valva aórtica para avaliação do fluxo pulmonar com o doppler pulsado.....67
- Figura 27.** Ecodopplercardiograma de cobaia antes (Figura A) e duas horas após (tempo final) o envenenamento por *Micrurus frontalis* (Figura B). Avaliação do fluxo transmitral em via de entrada de ventrículo esquerdo, demonstrando-se uma diminuição da relação da onda E:A no tempo final quando comparado com o tempo zero.....68
- Figura 28.** Secção histológica de tecido muscular esquelético cardíaco, região de músculo papilar, de *Cavia porcellus* (animal 6) após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*, setas indicam presença de vacúolos intracitoplasmáticos multifocais moderados (Aumento 200x).....69
- Figura 29.** Secção histológica de tecido muscular esquelético cardíaco, região de músculo papilar, de *Cavia porcellus* (animal 6) após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*, observando congestão multifocal moderada. (Aumento 100x).....70
- Figura 30.** Secção histológica de rim de *Cavia porcellus* após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Seta preta indicando a presença de material amorfo eosinofílico intratubular em túbulos proximais multifocal discreto. Seta vermelha indicando a presença de vacúolos intracitoplasmáticos de túbulos proximais multifocal moderado (Aumento 200x).....71
- Figura 31.** Secção histológica do pulmão de *Cavia porcellus* após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Seta preta indicando a presença de material basofílico intra-alveolar multifocal discreto, sugestivo de edema pulmonar (Aumento 400x).....72
- Figura 32.** Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo controle. Amostra controle: destaque para as estriações (E) e a alternância entre filamentos e mitocôndrias (M) ricas em cristas e intensamente elétron-densas. Verifica-se a presença de continuidade entre as fibras cardíacas e as estruturas mitocondriais preservadas.....73
- Figura 33.** Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo de cobaia, duas horas após inoculação de veneno da serpente *Micrurus*

frontalis. Evidencia-se a perda de continuidade das fibras esqueléticas cardíacas (setas). Fibras esqueléticas cardíacas (E). Mitocôndria preservada (M).....74

Figura 34. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo de cobaia, duas horas após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Evidencia-se a perda de continuidade das fibras esqueléticas cardíacas (setas). Fibras esqueléticas cardíacas (E).....74

Figura 35. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo de cobaia, duas horas após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Observa-se ruptura da membrana mitocondrial (setas). Fibras esqueléticas cardíacas (E). Mitocôndria preservada (M)75

Figura 36. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo de cobaia, duas horas após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Observa-se mitocôndria tumefeita, sem definição de cristas e pouco elétron-densas (setas). Fibras esqueléticas cardíacas (E). Mitocôndria preservada (M)75

Figura 36. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo duas horas após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Observa-se mitocôndria tumefeita, sem definição de cristas e pouco elétron-densas (setas). Fibras esqueléticas cardíacas (E). Mitocôndria preservada (M)76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação das proteínas encontradas por proteômica no veneno de espécies de *Micrurus*.
M. sur: *M. surinamensis*, *M. alt*: *M. alternatus*, *M. cor*: *M. corallinus*, *M. fro*: *M. frontalis*, *M. ibi*: *M. ibioboboca*, *M. lem*: *M. lemniscatus*, *M. spi*: *M. spixii*, *M. mul*: *M. multifaciatus*, *M. mip*: *M. mipartitus*, *M. all*: *M. alleni*, *M. cla*: *M. clarki*. Fonte: Lomonte et al., 2016.....33

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Microgramas

3FTx: *three finger toxin*

A/G: Relação albumina/globulina

ACh: *Acetylcholinesterase*

AD: Átrio direito

AE: Ao: Relação átrio esquerdo aorta

AE: Átrio esquerdo

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

aVF: Derivação unipolar aumentada do pé

aVL: Derivação unipolar aumentada do braço esquerdo

aVR: Derivação unipolar aumentada do braço direito

BNP: Peptídeo natriurético do tipo B

bpm: Batimentos por minuto

BSA: *Bovine serum albumine*

Ca⁺⁺: Cálcio iônico

Cavidade Vent. E/D: Cavidade do ventrículo esquerdo em diástole

Cavidade Vent. E/S: Cavidade do ventrículo esquerdo em sístole

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CK: Creatina quinase total

CK-MB: Isoenzima MB da creatina quinase

Cl: Cloro

cm: Centímetros

Con: *Conotoxin*

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação

CRISP: *Cysteine-rich secretory protein*

CTL: *C-type lectin/lectin-like*

DI: Derivação bipolar um
DII: Derivação bipolar dois
DIII: Derivação bipolar três
DL: Dose letal
DL50: Dose letal para 50% de animais
DVED: Diâmetro ventricular esquerdo em diástole
DVES: Diâmetro ventricular esquerdo em sístole
ECG: Eletrocardiograma
EIC: Espaço intercostal
EV: Escola de Veterinária
FA: Fosfatase alcalina
FC: Frequência cardíaca
FE: Fração de encurtamento
Fej: Fração de ejeção
FUNED: Fundação Ezequiel Dias
g: Grama
GGT: Gama-glutamyltransferase
GPx: *Glutathione peroxidase*
h: Hora
HCM: Hemoglobina corpuscular média
HDL: *High density lipoprotein*
HE: Hematoxilina-eosina
HGB: Hemoglobina
Hya: *Hyaluronidase*
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IM: Intramuscular
K: Potássio
K3EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
kg: Quilograma

Kun: *Kunitz-type serine protease inhibitor*

kV: Quilovolt

L: Litro

LAO: *L-amino acid oxidase*

LDH: Lactato desidrogenase

LDL: *Low density lipoprotein*

Lip: *Lysosomal acid lipase A*

M. all: Micrurus alleni

M. alt: Micrurus alternatus

M. cla: Micrurus clarki.

M. cor: Micrurus corallinus

M. fro: Micrurus frontalis

M. ibi: Micrurus ibiboboca

M. lem: Micrurus lemniscatus

M. mip: Micrurus mipartitus

M. mul: Micrurus multifaciatus

M. spi: Micrurus spixii

M. sur: Micrurus surinamensis

mEq: Miliequivalente

ml: Mililitro

mm: Milímetros

MP: *metalloproteinase*

mV: Milivolts

Na: Sódio

nAChR: receptor nicotínico da acetilcolina

ng: Nanograma

NGF: *Nerve growth fator*

NMG: *Neuronal membrane glycoprotein*

Nuc: *Nucleotidase*

Oha: *Ohanin-like*

OMF: *Oocyte maturation fator*

OMS: Organização mundial da saúde

P: Fósforo

Parede Vent. E/D: Parede do ventrículo esquerdo em diástole

Parede Vent. E/S: Parede livre do ventrículo esquerdo em sístole

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PCR: Proteína C reativa

PDE: *Phosphodiesterase*

PLB: *Phospholipase B*

QTc: Período QT corrigido

RBC: Eritrócitos

rpm: Rotação por minutos

RyR: rianodina

s: Segundos

SAN: *Sea anemone Na⁺-channel inhibitory toxin.*

Septo D: Septo interventricular em diástole

Septo S: Septo interventricular em sístole

SINAN: Sistema de Informação de Agravos e Notificação

SP: *Serine proteinase*

SSC: *Short scorpion Cl⁻channel inhibitor;*

T0: Tempo zero

TF: Tempo final

Tn: Troponina

TnC: Troponina C

TnI: Troponina I

TnI: Troponina I

TnT: Troponina T

TP: Tempo de protrombina

TTPa: Tempo de tromboplastina parcial ativada

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UI: Unidades Internacionais

VCM: Volume corpuscular médio

VD: Ventrículo direito

VE: Ventrículo esquerdo

VG: Volume globular

VLDL: *Very low density lipoprotein*

WAP: *whey acid protein*

RESUMO

Micrurus frontalis, espécie de serpente da família Elapidae, é uma das principais responsáveis pelos acidentes elapídicos em humanos no Brasil. Seu veneno, composto por três frações, *three finger toxin*, fosfolipase A₂ e metaloproteases, é conhecido por possuir alta toxicidade, causador de grave sintomatologia clínica. Sua ação principal é neurológica levando à paralisia flácida das vítimas e, conseqüentemente óbito, devido a insuficiência respiratória. Contudo, raros são os relatos na literatura científica sobre sua atividade específica sobre o sistema cardiovascular. Diante deste contexto, este trabalho tem como objetivo a avaliação das alterações cardíacas causadas pelo veneno de *M. frontalis* em cobaias (*Cavia porcellus*). Doze animais machos, adultos foram distribuídos em dois grupos (n=6) denominados, grupo veneno e grupo controle. Os animais do grupo veneno receberam 0,45 µg/g de peso vivo de veneno de *M. frontalis* diluídos em 0,2 ml de PBS/BSA por via intramuscular (IM) e, o grupo controle recebeu 0,2 ml de PBS/BSA por via IM. Os animais foram avaliados clinicamente, antes (tempo zero) e duas horas após, tempo final (TF), a inoculação do veneno ou PBS, por meio de exames de eletrocardiograma (ECG), ecodopplercardiograma (ECO) e perfil sanguíneo (hemograma e bioquímica sérica e plasmática). Após o TF, os animais foram eutanasiados, realizando-se necropsia e coleta de material para microscopias óptica e eletrônica. O ECG revelou a presença de arritmias, extrasístoles ventriculares, em 100% dos animais envenenados. Nesses mesmos animais, no ECO verificou-se um efeito inotrópico negativo do veneno de *M. frontalis* sobre a musculatura cardíaca reduzindo aproximadamente 25% da fração de ejeção cardíaca, além de uma vasoconstrição da artéria aorta e aumento do fluxo da artéria pulmonar. No perfil bioquímico cardiovascular observou-se um aumento significativo dos valores de troponina I, creatina quinase fração MB no TF de todos os animais envenenados. No coagulograma, observou-se diminuição do tempo de tromboplastina parcial ativada e dos valores de D-dímero no TF dos animais do grupo veneno. Conclui-se que, o veneno de *M. frontalis* possui atividade cardiotóxica e arritmogênica, capaz de causar lesão de fibras cardíacas, além de provocar um efeito inotrópico negativo sobre o coração.

Palavras chaves: *Micrurus frontalis*, *three finger toxin*, cardiotoxicidade, inotropismo, *Cavia porcellus*.

ABSTRACT

Micrurus frontalis is one of the main snakes responsible for elapidic accidents in humans in Brazil, however rare cases are described in the veterinary literature. Its venom is known for its high toxicity, with every elapidic accident being considered serious. The venom is composed of three fractions: three finger toxin (3FTx), phospholipase A₂ and metalloproteases. Its main action is neurological, leading to flaccid paralysis of the victims and consequently death due to respiratory insufficiency. However, there is no description in the literature of its activity in the cardiovascular system. For this reason, this study evaluates the cardiac alterations of the venom of *M. frontalis* in the experimental envenomation of *Cavia porcellus*. Twelve animals were distributed in two groups (n = 6), denominated venom group and control group. Animals of the venom group received a dose of 0.45 µg / g live weight of venom of *M. frontalis* diluted in 0.2 ml of PBS / BSA intramuscularly (IM), while the control group received 0.2 ml of PBS / BSA IM. The electrocardiogram (ECG), Doppler echocardiogram (ECO) and blood profile were performed in two moments; time zero (T0) and two hours after the envenomation, final time (FT). After FT, the animals were euthanized, necropsied and collected for optical and electron microscopy. The ECG revealed the presence of arrhythmias, ventricular extrasystoles, in 100% of the envenoming animals. The ECO showed a negative inotropic effect of the venom of *M. frontalis* on the cardiac musculature, reducing approximately 25% of the cardiac ejection fraction, as well as vasoconstriction of the aortic artery and increased pulmonary artery flow. In the cardiovascular biochemical profile, a significant increase of troponin I and creatine kinase MB in FT of the envenomed animals was observed. The activated partial thromboplastin time and the D-dimer were decreased, in the FT in the envenomed group. It was concluded that the venom of *M. frontalis* has cardiotoxic and arrhythmogenic activity. In addition to causing heart damage, the venom acts, causing a negative inotropic effect on the heart.

Key words: *Micrurus frontalis*, tree finger toxin, cardiotoxicity, inotropism, *Cavia porcellus*.

1. INTRODUÇÃO

Na clínica médica humana e veterinária, os acidentes com animais peçonhentos possuem um lugar de destaque devido a frequência e a gravidade dos casos. Dentre esses, os acidentes ofídicos se destacam (Warrell, 2004, Bucarechi et al., 2006). O ofidismo é uma doença tropical negligenciada, que constitui um problema de saúde pública, principalmente nos países subdesenvolvidos e emergentes. De acordo com a *Global Snakebite Initiative* (GSI) (2010), quase cinco milhões de pessoas do mundo sofrem acidentes com serpentes, resultando em 2,7 milhões de casos graves e, 125 mil de óbitos por ano (Swarrop e Grad, 1954, Chippaux, 1998, Paula, 2010).

Estima-se que existam 3.600 espécies de serpentes no mundo, das quais 10-14% sejam peçonhentas (Cardoso e Brando, 1982; Uetz, 2016). Apesar de nas Américas, do Norte, Central e do Sul, a maior incidência de casos registrados de ofidismo serem decorrentes da família Viperidae, os acidentes causados por espécies da família Elapidae são considerados graves e muitas vezes letais (Warrel, 2004, Bucarechi et al., 2006).

A família Elapidae é composta por 325 espécies, divididas em 61 gêneros de serpentes apresentando-se de diversas formas e tamanhos. Possuem preses fixas, ocas e proteróglifas, as quais utilizam para inocular o veneno de toxicidade elevada. A subfamília Elapinae está representada pelos gêneros *Micruroides* (sul dos EUA e México), *Leptomicrurus* (América do Sul) e *Micrurus* (Américas). Este último gênero, *Micrurus*, é o mais prevalente no Brasil e como as serpentes possuem coloração vermelha nos anéis, são popularmente denominadas de cobra-coral ou cobra verdadeira (Cardoso et al., 2003).

No Brasil, as espécies do gênero *Micrurus* apresentam ampla distribuição por quase todo o território nacional, e, especialmente nas regiões mais populosas como o sudeste e sul, uma das espécies de maior importância é a *M. frontalis* (Cardoso et al., 2009).

Segundo os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAM), envenenamento humano causado por serpentes do gênero *Micrurus* são relativamente raros, entretanto apesar de a baixa incidência, são sempre considerados graves (SINAM, 2016; Andrade Filho et al., 2013). Também, deve-se destacar a escassez de relatos publicados em medicina veterinária. No Brasil, apenas dois acidentes por serpentes do gênero *Micrurus* foram relatados na literatura científica: um em cão e um outro num gato (Moreira et al., 2004). Essa baixa incidência se deve ao hábito semifossorial da *Micrurus*, além do comportamento não agressivo. Todavia, a equipe da Toxicologia Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais teve acesso a diversos casos de cães envenenados por serpentes da espécie *M. ibiboboca* que ocorreram nos anos de 2015 e 2016, na Unidade Federativa de Pernambuco, o que demonstra a variabilidade e a subnotificação na medicina veterinária.

As vítimas acometidas de envenenamento por *Micrurus spp.* manifestam sinais clínicos sistêmicos, graves e muitas vezes letais. Como o veneno elapídico possui atividade neurotóxica na junção neuromuscular, o qual impede a liberação e/ou a ação da acetilcolina (Ach), obviamente, o quadro clínico caracteriza-se pela presença de sinais neurológicos (Silva e Bucarechi, 2009). Esses são os mais estudados e difundidos na comunidade científica, tanto nos animais como em humanos. Contudo, a ação cardiotoxica é pouquíssimo estudada e foi descrita em gatos envenenados experimentalmente com peçonha de *M. fulvius* (Weis e MsIsaac, 1971) e por Reis (2017) após envenenamento experimental de cobais com peçonha de *M. surinamensis*, uma espécie de coral verdadeira encontrada na região amazônica.

Como não existem estudos que descrevam as alterações cardíacas causadas pelo veneno de *M. frontalis*, tanto na medicina veterinária como na medicina humana, e por ser essa uma das espécies elapídicas de maior letalidade no Brasil, torna-se imperativo o estudo deste envenenamento com foco especial na toxicologia cardiovascular.

2. OBJETIVOS

2.1 – Geral

Pesquisar as alterações cardíacas decorrentes do envenenamento experimental por *M. frontalis* em cobaias (*Cavia porcellus*).

2.2 – Específicos

Avaliar as alterações clínicas de cobaias após o envenenamento experimental por *M. frontalis*.

Estudar a função cardíaca de cobaias por meio de exames eletrocardiográficos, ecocardiográficos e laboratoriais (biomarcadores cardíacos) após o envenenamento experimental por *M. frontalis*.

Investigar o perfil sanguíneo (alterações hematológicas e bioquímicas) de cobaias após o envenenamento experimental por *M. frontalis*.

Determinar as alterações histológicas do coração de cobaias por microscopia óptica e eletrônica após envenenamento experimental por *M. frontalis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Serpentes

As serpentes muito provavelmente tenham surgido no período Cretáceo, contudo tiveram o seu maior desenvolvimento no período Cenozóico. A sua origem é muito discutida, entretanto acredita-se que tenham se originado a partir de alguns lagartos de vida subterrânea, os quais sofreram alongamento do corpo, redução das patas e olhos semi atrofiados. As serpentes são classificadas taxonomicamente em Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Ophidia ou Serpentes (Lee, 1997, Franco, 2003).

As serpentes podem ser classificadas em dois grupos básicos: as peçonhentas, que são aquelas que conseguem inocular seu veneno no corpo de uma presa ou vítima, e as não peçonhentas. Ambas encontradas no Brasil, nos mais diferentes tipos de habitat, inclusive em ambientes urbanos. A serpente peçonhenta possui aparelho inoculador de peçonha, o qual é composto pela glândula Duvernoy desenvolvida (glândula de veneno), onde a peçonha é produzida e estocada, ligada por ductos ou dentes inoculadores. Para otimizar a inoculação da peçonha as serpentes utilizam seus dentes para potencializar a inoculação (Jackson, 2003). As serpentes do gênero *Micrurus* possuem dentição proteróglifa (Fig. 1) que se caracteriza pela presença de dois dentes inoculadores de peçonha na parte anterior da maxila superior, estes dentes são fortes e não retráteis (Cardoso et al., 2003).

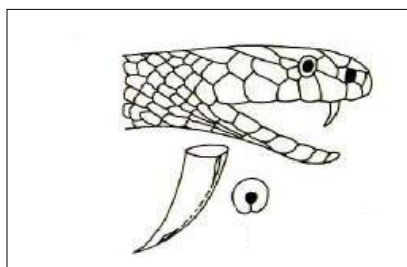


Figura 1. Dentição proteróglifa presente nas serpentes do gênero *Micrurus*, com ilustração do sulco por onde passa o veneno para a inoculação na presa.

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

3.2 Família Elapidae

A família Elapidae é composta por mais de 300 espécies de serpentes catalogadas em todo mundo. Essa Família engloba serpentes pequenas com 16 cm (*Drysdalia*) até serpentes com seis metros (*Ophophagus*) de comprimento. Essa Família é composta por serpentes muito conhecidas como as cobras-corais e najas, subdivididas em três gêneros, *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides*. No Brasil encontram-se cerca de 30 espécies de *Micrurus* (Fig. 2), as quais são denominadas como coral-verdadeira ou cobra-coral (Bucarechi et al., 2016; Silva, 2016).

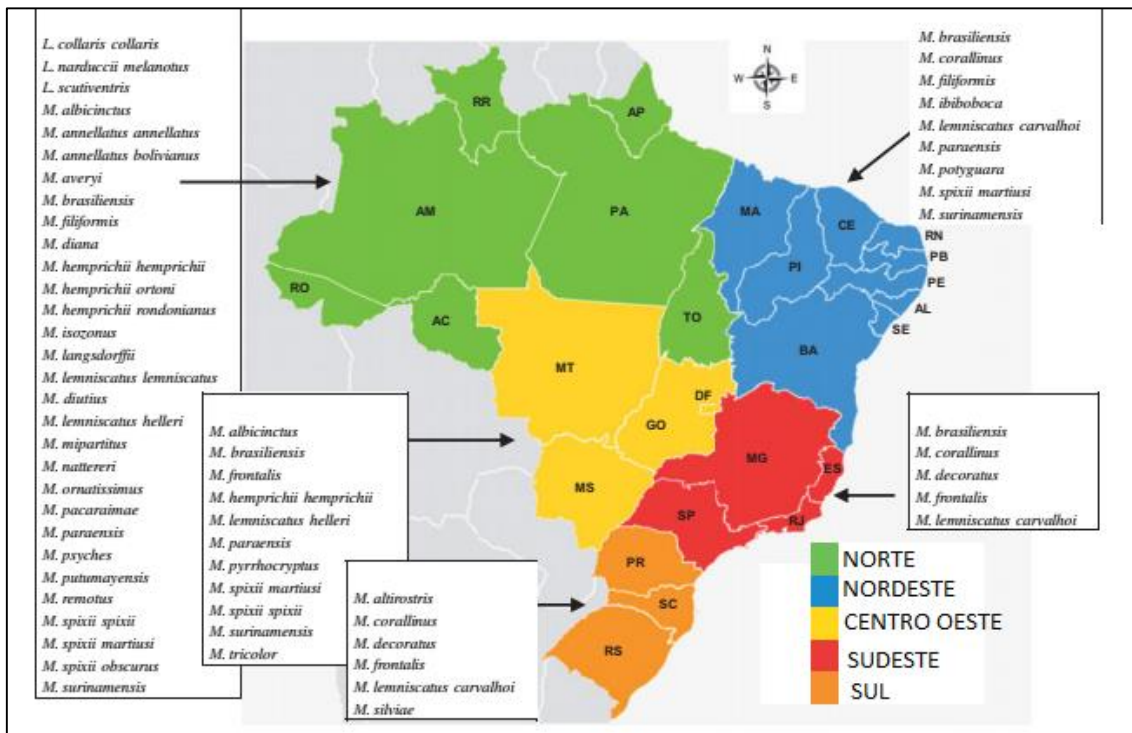


Figura 2. Mapa do Brasil dividido em regiões e suas respectivas espécies de elapídeos encontrados. AC: Acre; AL: Alagoas, AM: Amazonas; AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; DF: Distrito Federal (Capital Federal); ES: Espírito Santo; GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; PA: Pará; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RO: Rondônia; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo; TO: Tocantins. Fonte: Bucarechi et al., (2016).

3.2.1 *Micrurus* sp.

O gênero *Micrurus* (Micro= pequeno e urus=cauda) se destaca pela gravidade dos acidentes provocados pelo seu veneno, principalmente pela sua ação neurotóxica e muitas vezes causando o óbito da vítima acometida. Sua distribuição é continental, do sudeste dos Estados Unidos até o centro da Argentina. (Campbell e Lamar, 2004, DiBernardo et al., 2007, Silva, 2016). No Brasil encontramos um grande número de exemplares de *Micrurus* (Fig.1), totalizando 33 espécies (Bucarechi et al., 2016).

Dentre todas as *Micrurus* encontradas no Brasil, há três espécies responsáveis pela maioria dos envenenamentos em humanos, sendo elas: *M. frontalis*, *M. corallinnus* e *M. lemniscatus* (Fig.3). *M. frontalis* se distribui geograficamente na região sul, sudeste e centro-oeste do País; *M. corallinnus* é encontrada na região sul e sudeste e *M. lemniscatus* localiza-se na região norte, principalmente na região da Amazônia (Ministério da Saúde, 2015).

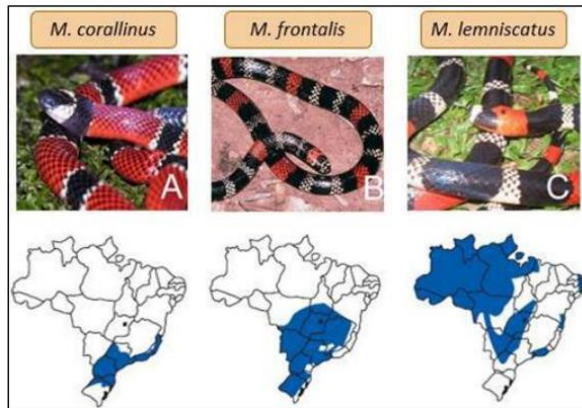


Figura 3. Principais espécies de *Micrurus* no Brasil e sua disposição geográfica. A - *M. corallinus*, B – *M. frontalis* e C – *M. lemniscatus*. Fonte: Ministério da Saúde, 2001.

3.2.2 *Micrurus frontalis*

A serpente *M. frontalis* (Fig.4) é uma das mais conhecidas cobras-corais do Brasil, principalmente pela sua ampla distribuição geográfica e pela gravidade do acidente ofídico. Essa serpente caracteriza-se por possuir de 70-100 cm de comprimento e apresentar de 10-15 tríades (sequência de três anéis pretos pelo corpo) pelo corpo (Paula, 2010, Silva, 2016).

O habitat natural das *M. frontalis* são as florestas primárias, entretanto são descritas em ambientes alterados como lavouras e pastagens, local onde ocorrem os principais acidentes ofídicos. Apresentam hábitos fossoriais e criptozoicos. Seu hábito alimentar caracteriza-se pela predação de vertebrados alongados, como outras serpentes, lagartos, anfisbenas e gimnofionos (Silva, 2016).



Figura 4. Cobra-coral (*M. frontalis*). Observa-se o padrão de sequência de três anéis pretos pelo corpo, denominado de tríades. Fonte: <http://www.herpetofauna.com.br/Corais.htm>

3.3 Veneno

A composição do veneno é muito variável entre as cobras corais, pois a composição do mesmo está relacionada com os aspectos alimentares, sendo presa específica, idade, sexo, sazonalidade e a sua origem geográfica (Aird e Silva, 1991).

Devido a essas inúmeras variáveis o veneno das cobras-corais é formada por uma grande variedade de substâncias, as quais o conferem a sua toxicidade elevada. Entre essas substâncias observa-se uma gama de proteínas biologicamente ativas (70 – 90%), peptídeos de alta massa molecular e outras moléculas inorgânicas e orgânicas atuando em várias vias metabólicas (Aird e Silva, 1991, Ciscotto et al., 2011; Moreira et al., 2010; Silva, 2016). As proteínas são as frações de maior importância, em especial as classificadas estruturalmente como *three finger toxin* (3FTx) e as fosfolipases A₂ (PLA₂). Contudo, no veneno de *M. frontalis* além dessas duas frações de proteínas, foi descrita uma terceira fração proteica, denominada de Miwaprin (Moreira et al., 2010).

As toxinas *three finger toxin* (3FTx) (Fig. 5) são formadas por sequências de 60-74 peptídeos e pontes dissulfetos sem atividade biológica. Devido a presença de três alças ou *loops* em sua estrutura são denominadas de *three finger toxin*. Fazem parte dessa família: α -neurotoxinas, κ -bungarotoxinas, toxinas muscarínicas, fasciculinas, calciseptinas, cardiotoxinas e as dendroaspinas (Kini, 2005).

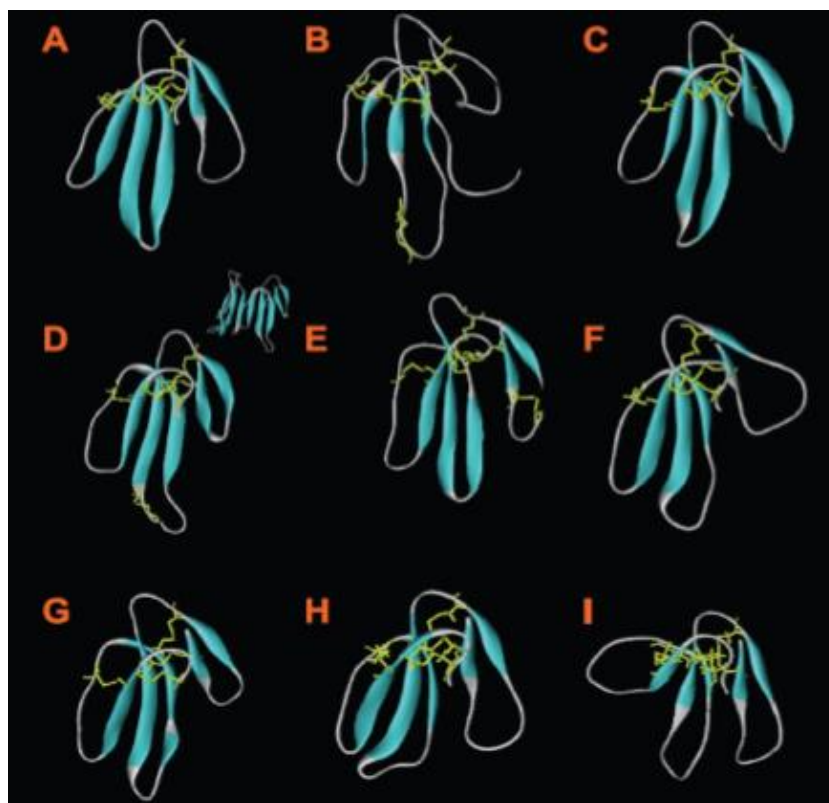


Figura 5. Estrutura proteica das principais toxinas *three finger toxin*. A – Erabutoxina, B - α -bungarotoxinas, C – Cardiotoxina, D - κ -bungarotoxinas, E – Candoxina, F – Fasciculina, G – Toxina Muscarínica, H – Toxina FS2, I – Dendroaspina. Fonte: Kini, 2002.

As PLA₂ (Fig.6) elapídicas são formadas por 120 resíduos de aminoácidos, seis ou sete ligações dissulfetos e são compostas por cinco α -hélices e duas estruturas em folhas β -pregueadas curtas (Kini, 1997).

As waprinas ou WAP (*whey acid protein*) são compostas por cerca de 50 resíduos de aminoácidos com oito resíduos de cisteína e quatro ligações dissulfeto. Essas metaloproteases são descritas apenas nas famílias Colubridae e Elapidae (Moreira et al., 2010).

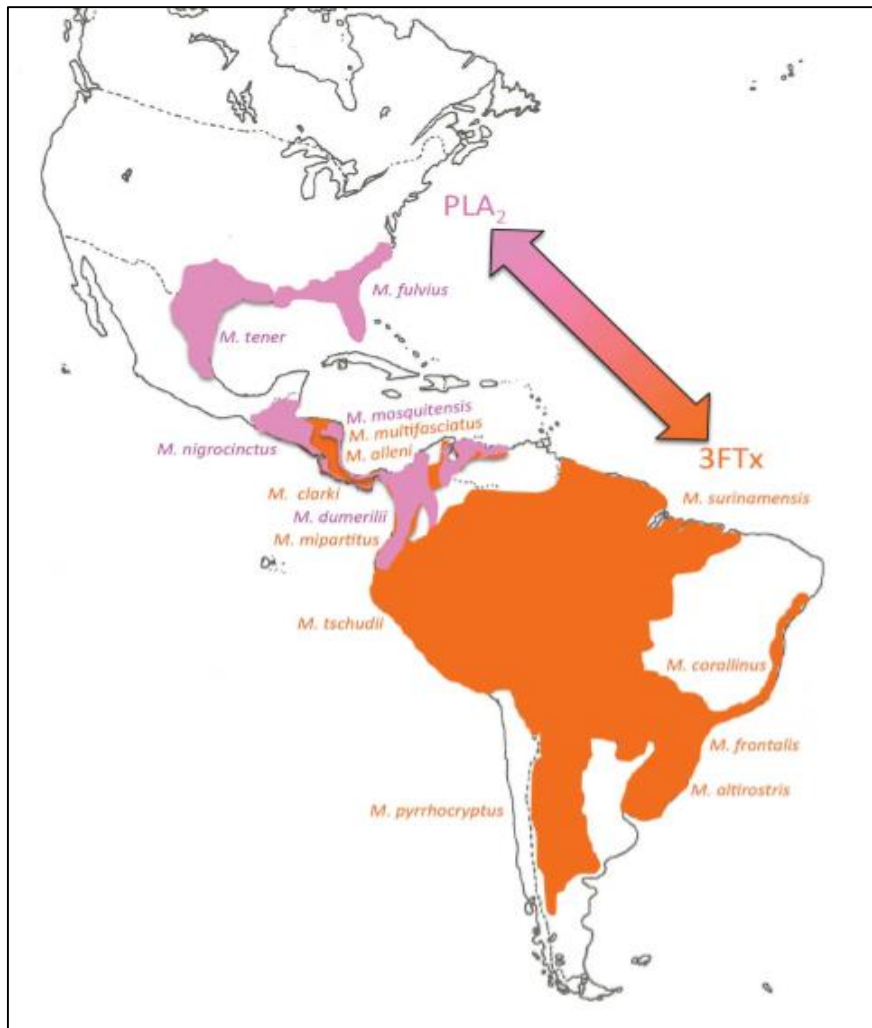


Figura 6. Distribuição geográfica das *Micrurus* no continente americano de acordo com a composição do veneno e a sua principal fração, fosfolipase A₂ ou 3FTx. Fonte: Lomonte et al., (2016).

Quadro 1. Relação das proteínas encontradas por proteômica no veneno de espécies de *Micrurus*. *M. sur*: *M. surinamensis*, *M. alt*: *M. alternatus*, *M. cor*: *M. corallinus*, *M. fro*: *M. frontalis*, *M. ibi*: *M. ibioboboca*, *M. lem*: *M. lemniscatus*, *M. spi*: *M. spixii*, *M. mul*: *M. multifaciatus*, *M. mip*: *M. mipartitus*, *M. all*: *M. alleni*, *M. cla*: *M. clarki*. Fonte: Lomonte et al., (2016).

Proteínas	Micrurus especies										
	M.sur	M.alt	M.cor	M.fro	M.ibi	M.lem	M.spi	M.mul	M.mip	M.all	M.cla
3FTx	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
PLA ₂	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
MP	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•
LAO	•	•	•			•	•	•	•	•	•
Kun	•	•				•		•	•	•	•
CTL		•	•				•		•	•	•
SP			•						•		•
Oha										•	
CRISP		•									
Lip		•									
Nuc											
ACh								•			
PDE											
Hya										•	
NGF										•	
PLB											•
GPx										•	•
NMG											
OMF	•										
Con	•										
SAN	•										
SSC	•										
Total	9	8	6	3	3	5	4	6	7	9	9

3.4 Mecanismo de ação veneno

Como descrito por estudo de Lomonte, 2016, o veneno da serpente *M. frontalis* é composto por três frações de proteínas, sendo elas: *three finger toxin* (3FTx), PLA₂ e metaloproteases.

3.4.1 Three Finger Toxin (3FTx)

A maior concentração de proteínas no veneno da *M. frontalis* é a porção 3FTx como descrito por Moreira et al., (2010) e Ciscotto et al., (2011) após análise por *high performance liquid chromatography* (HPLC).

As α -neurotoxinas ou toxinas curaremiméticas ou ainda denominadas de toxinas pós-sinápticas são abundantes na porção 3FTX, as quais atuam no sistema nervoso periférico ligando-se aos receptores colinérgicos da placa motora (Fig.7), inibindo a abertura do canal iônico associada ao receptor em resposta aos agonistas colinérgicos, bloqueando desta forma o impulso nervoso e, consequentemente ocasionando a paralisia da presa (Paterson e Nordberg, 2000; Tu et al. 2002).

As α -neurotoxinas são classificadas de acordo com a sua estrutura, α -neurotoxinas de cadeia curta, α -neurotoxinas de cadeia longa e α -neurotoxinas *three finger* não convencionais. O principal alvo das α -neurotoxinas (Fig.7) é o receptor nicotínico da acetilcolina (nAChR) muscular, entretanto algumas α -neurotoxinas interagem com o nAChR neuronal. Desta forma são

heterogêneas no mecanismo de ação, o que possibilita que novos mecanismos de ação ainda sejam descobertos (Nirthanan e Gwee, 2004).

Além das α -neurotoxinas, existe um outro grupo de neurotoxinas (κ - neurotoxinas), como a κ -bungarotoxina, que reconhecem os receptores nicotínicos neuronais, as toxinas muscarínicas (isoladas das mambas africanas) que selecionam os receptores muscarínicos (Bradley, 2000), as fasciculinas que agem diretamente no antagonismo da acetilcolinesterase, as calciseptinas que são antagonistas dos receptores de cálcio tipo L, as cardiotoxinas formando poros nas membranas celulares e as dendrospinas, as quais inibem a adesão celular (Kini, 2002).

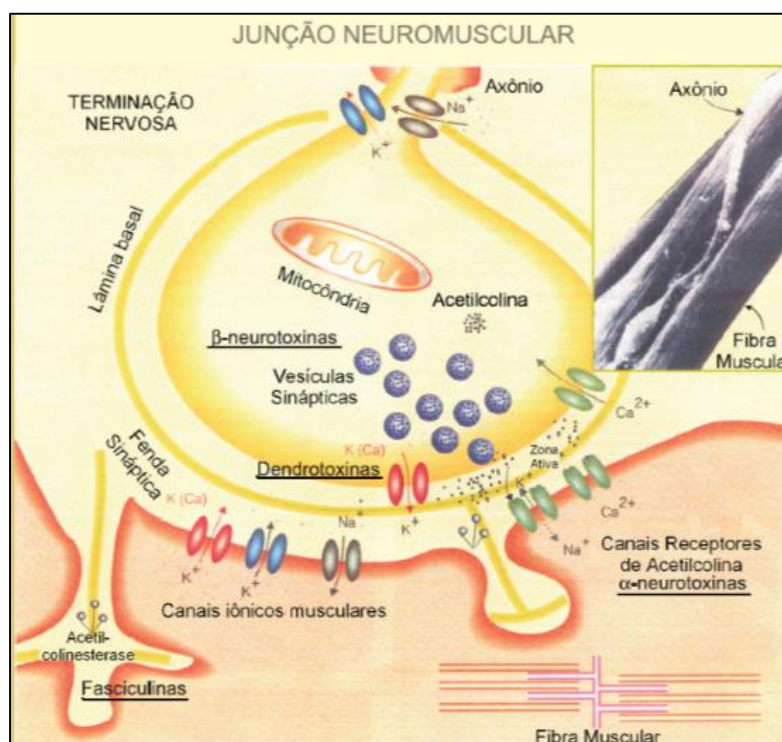


Figura 7. Mecanismo de ação das α -neurotoxinas e das fasciculinas. Fonte: Prieto da Silva (2002).

3.4.2 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As PLA₂ elapídicas são responsáveis pela ativação de várias vias metabólicas e consequentemente responsáveis por vários efeitos farmacológicos como a neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeito coagulante, atividade hemolítica, edematogênica e hipotensora (Kini, 1997).

A neurotoxicidade das PLA₂ deve-se as β - neurotoxinas que atuam nas junções neuromusculares inibindo a liberação de neuromediadores. A neurotoxicidade pré-sináptica das PLA₂ se deve ao fato delas se ligarem a membrana nervosa e catalisarem a hidrólise fosfolipídica em lisofosfolípídeos e ácidos graxos (Kini, 1997; Rosseto et al., 2006).

A miotoxicidade do veneno elapídico deve-se ao fato do veneno atuar diretamente no sarcolema, levando à um aumento da concentração de cálcio citosólico e, consequentemente, uma

hiperconcentração dos microfilamentos, causando danos mitocondriais e ativação de fosfolipases dependentes de cálcio. Estudos comparativos demonstraram que a capacidade de mionecrose do veneno da *M. frontalis* é maior que o da *M. surinamensis* (Gutierrez et al., 1983; Arroyo et al., 1987; Mebs, 1990).

Além da ação miotóxica do veneno elapídico, é descrito a atuação local das PLA₂ diretamente e indiretamente na formação do edema, devido a ativação da cascata da inflamação e hemorragia local como descrito por Lomonte et al., (1993). Da mesma forma, Sanchez et al., (1992) observaram ação edematogênica no veneno de *M. frontalis* e compararam com outras espécies de serpentes: *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus*. Entretanto, Gutierrez et al., (1983) relataram que o veneno da *M. frontalis* não induz edema e hemorragia, devendo ser salientado que esses autores utilizaram exemplares capturados na Costa Rica.

Weis e McIsaac, (1971) foram os primeiros a relatarem a ação cardiotoxica do veneno de *M. fulvius* em gatos após inoculação experimental. Ressalta-se que essa espécie, *M. fulvius*, é uma naja encontrada em solo norte-americano. Os autores relataram um efeito direto do veneno sobre a musculatura cardíaca. Houve despolarização direta do músculo esquelético e diminuição contratilidade cardíaca e do seu potencial de ação. Posteriormente, Francis et al., (1993), também descreveram a atividade cardiotoxica do veneno de *M. fulvius*.

Francis et al., (1997) estudando o veneno de *M. frontalis* relataram a presença de PLA₂ responsáveis por efeitos hipotensores. Entretanto, o efeito hemorrágico observado não foi atribuído a uma determinada fração do veneno.

3.4.3 Proteases

As proteases encontram-se amplamente distribuídas nos venenos das serpentes da família Viperidae e, em menor escala, na família Elapidae. Geralmente, são componentes de alto peso molecular, com tendências a formar dímeros, trímeros e tetrâmeros. As proteases (Fig.8) podem ser de ação múltipla ou específica. Proteases específicas podem ser collagenases, elastases e enzimas que afetam os mecanismos da coagulação sanguínea ou os do sistema do complemento. Não são descritas serinoproteases no veneno de *M. frontalis*, apenas as metaloproteases (Lomonte et al., 2016).

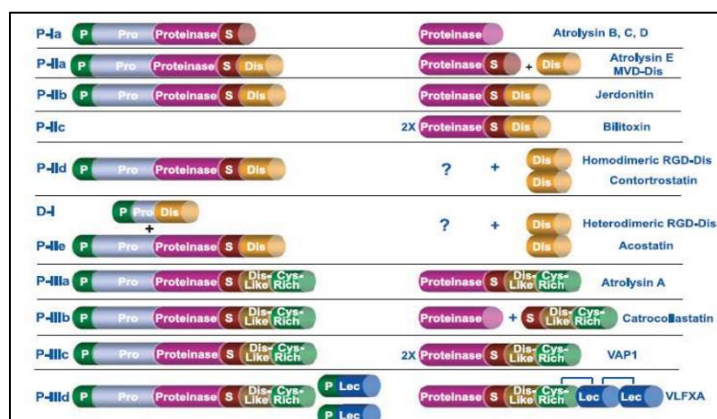


Figura 8. Tipos de proteases presentes no veneno de serpentes. Fonte: Fox JW e Serrano SMT. FEBS Journal. 2008; 275:3016.

As metaloproteases estão envolvidas nos processos hemorrágicos, de hipotensão, inflamação e necrose tecidual (Fox e Serrano, 2008). As metaloproteases apresentam três domínios específicos denominados de domínio proteolítico, domínio do tipo desintegrina e o domínio rico em cisteína (Marcinkiewicz, 2005).

3.5 Sistema cardiovascular

3.5.1 Coração

O coração é um órgão oco, o qual é composto por quatro câmaras cardíacas: átrio esquerdo, átrio direito, ventrículo esquerdo e ventrículo direito (Fig. 9). O fluxo sanguíneo cardíaco é controlado pela diferença de pressão entre as câmaras cardíacas e pelas valvas atrioventriculares, a tricúspide (lado direito) e mitral (lado esquerdo) (Neto, 2008).

O sangue chega ao coração pelas veias cavas (caudal e cranial) no átrio direito, percorrendo a valva tricúspide, ventrículo direito, artéria pulmonar, pulmão, veias pulmonares, átrio esquerdo, mitral, ventrículo esquerdo, aorta e corpo, chegando novamente ao átrio direito (Neto, 2008).

A parede cardíaca é dividida em três partes: o endocárdio, o miocárdio e o epicárdio. O endocárdio é a camada mais interna do coração, sendo uma fina camada de tecido composto por epitélio pavimentoso simples sobre uma camada de tecido conjuntivo. O miocárdio é a camada média e a mais espessa do coração, composto de músculo esquelético cardíaco. O epicárdio é a camada mais externa do coração, sendo uma delgada lâmina de tecido seroso (Neto, 2008)

O coração possui dois marcapassos cardíacos naturais, o nodo sinoatrial (SA) e o nodo atrioventricular (AV). O impulso elétrico é originado no nodo SA, o qual localiza-se na parte superior do átrio direito, percorrendo os átrios e, conseqüentemente, originando a contração atrial. O impulso alcança o nodo AV, o qual ocasiona uma nova despolarização e, conseqüentemente, a contração ventricular (Guyton e Hall, 1998, Camacho e Mucha, 2008).

A contração da musculatura cardíaca depende da despolarização dos cardiomiócitos. Essa despolarização é provocada pela abertura dos canais rápidos de sódio e os canais lentos de cálcio. Os canais de cálcio permanecem abertos por um tempo maior, o que permite a entrada de uma grande quantidade de íons de cálcio e sódio para o interior dos cardiomiócitos (Fig. 9). Concomitantemente, há uma diminuição da permeabilidade de potássio na membrana das células cardíacas. Resumindo, na despolarização cardíaca há um aumento da concentração de sódio e cálcio intracelular e aumento da concentração de potássio extracelular (Guyton e Hall, 1998).

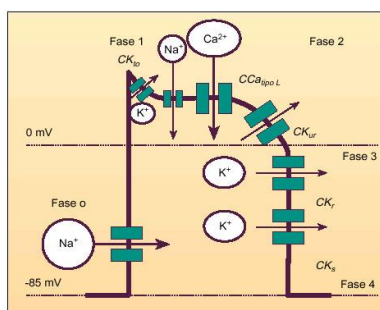


Figura 9. Esquema da despolarização cardíaca e o influxo de íons. Fonte Guyton e Hall, (1998).

Após a contração cardíaca há um período de relaxamento cardíaco; esse ciclo é denominado de sístole (contração cardíaca) e diástole (relaxamento). O ciclo cardíaco é controlado pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. Desta forma, o simpático aumenta a frequência e a contração cardíaca, já o parassimpático reduz a frequência cardíaca e diminui a contração da musculatura cardíaca (Guyton e Hall, 1998).

Para avaliar a frequência cardíaca e o ritmo pode-se realizar o eletrocardiograma, entretanto para avaliação morfológica e funcional do coração, utiliza-se o ecodopplercardiograma, ambos os métodos são não invasivos e complementares (Camacho e Mucha, 2008; Ware, 2010).

O eletrocardiograma (ECG) é a forma gráfica da despolarização e repolarização cardíaca, a qual é expressa pelas ondas P, Q, R, S e T (Tilley, 1992).

Ecodopplercardiograma é um exame complementar baseados no uso de ultrassom, ou seja, as ondas acústicas com frequência maiores 20 mil Hz. Esse método diagnóstico possibilita imagens bidimensionais (modo B), imagens em movimento (modo M) e o Modo Doppler color o qual possibilita o mapeamento e a direção do fluxo sanguíneo. Realizando-se o modo M é possível avaliar a atividade inotrópica do coração e conseqüentemente o efeito de substâncias na atividade inotrópica cardíaca (Boon, 2011).

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), Protocolo nº 192/2016 UFMG.

4.1 Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Toxicologia Experimental da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no Hospital Veterinário da Clínica Santo Agostinho e no Laboratório TECSA, em Belo Horizonte, MG.

4.2 Animais

Foram utilizadas 12 cobaias (*Cavia porcellus*), machos albinos da linhagem *English Short Ear*, com peso entre 950-1050 gramas. Os animais foram acomodados 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) com água e ração comercial (Nutrópica®) *ad libitum*.

4.3 Veneno

O *pool* de veneno, liofilizado, das serpentes da espécie *Micrurus frontalis* foi gentilmente fornecido pelo Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtegui, Laboratório de Imunologia e Bioquímica, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

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%. Este procedimento se deve às características isotônicas destas substâncias 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. frontalis* utilizada (0,45 µg/g de peso vivo) foi baseada Tanaka et al. (2010), o qual demonstraram uma dose letal 50 (DL₅₀) para camundongo 22 µg/20g de peso vivo de camundongo. Ou seja, a dose administrada nas cobaias (450 µg / cobaia), foi bem menor que a DL₅₀ (que seria de 1100 µg / cobaia).

O modelo experimental escolhido (cobaias), deve-se à fácil manipulação dos animais, o porte médio para a realização do ecocardiograma e a possibilidade de coletar sangue suficiente para a avaliação do perfil sanguíneo.

4.4 Protocolo experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=6). O grupo controle recebeu 0,2 ml de PBS/BSA e o grupo veneno recebeu 0,2 ml de solução contendo 450 µg/kg do *Micrurus frontalis*.

A aplicação de veneno ou PBS / BSA foi feita utilizando seringa de insulina (1 ml) e agulha 13 x 4,5 mm (Descarpack) na coxa esquerda, região do músculo bíceps femoral, por via

intramuscular (IM), após tricotomia e assepsia da área para visualização de possíveis alterações locais.

4.5 Eletrocardiograma (ECG)

A avaliação eletrocardiográfica foi realizada por meio de eletrocardiografia computadorizada (TEB-ECG®). Os eletrodos foram conectados por meio de garras metálicas presas à pele na região das articulações úmero-rádio-ulnar e fêmoro-tíbio-patelar, para as derivações de membros. Foram registradas as derivações bipolares DI, DII e DIII, as derivações unipolares aumentadas aVR, aVL e aVF. A velocidade utilizada foi de 50 mm/s e o aparelho calibrado para 1mV= 1cm (N). Avaliou-se a frequência e o ritmo cardíacos, a duração (s) e amplitude (mV) da onda P e do complexo QRS, a duração (s) dos intervalos PR e QT, o nivelamento do segmento ST, a polaridade da onda T e o eixo elétrico do QRS. As medidas foram realizadas na derivação II. O eixo elétrico do QRS foi obtido a partir da soma das deflexões positivas e negativas das derivações I e III de acordo com Tilley (1992). O traçado eletrocardiográfico foi realizado antes e após (continuamente) a administração do veneno e do PBS/BSA por duas horas.

4.6 Ecocardiograma (ECO)

Realizou-se a ecocardiografia bidimensional e em modo M e ecocardiopplergrafia pulsátil e contínua. Foi realizada a tricotomia nos hemitórax direito e esquerdo e aplicado gel aderente para melhorar a condução das ondas de ultrassom. Com o animal em decúbito lateral direito, posicionando-se o transdutor na janela ecocardiográfica paraesternal direita, localizada entre o 3° e 6° espaços intercostais (EIC) direitos, entre o esterno e a articulação costo-condral, foram obtidas as imagens do eixo-longo e do eixo-curto e realizadas as medidas ecocardiográficas. A partir do eixo-longo foram obtidas as visões quatro-câmaras e trato de saída do ventrículo esquerdo, e, quando no eixo-curto, foram observados os cortes nos níveis apical, papilar, cordal, mitral e aórtico.

As imagens foram inicialmente obtidas em modo-B, avaliando-se as relações anatômicas entre as estruturas, a contratilidade, os aspectos morfo-funcionais valvares, a presença de jatos de regurgitação com o Doppler colorido e o gradiente de pressão da valva pulmonar. O eixo curto serviu de orientação para a obtenção das imagens em modo-M, com exposição simultânea do modo bidimensional na tela. Foram medidos o átrio esquerdo e a aorta e calculada a relação átrio esquerdo/aorta (AE : Ao). Com a linha do cursor sobre o nível das cordas tendíneas, obteve-se as medidas do diâmetro ventricular esquerdo em diástole (DVED) e sístole (DVES). A partir dessas medidas obteve-se a fração de ejeção (Fej) e a fração de encurtamento (FE). Além de avaliar a distância da válvula septal mitral ao septo interventricular.

Pela janela paraesternal caudal esquerda (apical), em modo bidimensional, foram observadas as relações anatômicas entre as estruturas cardíacas, os aspectos morfofuncionais valvares e a contratilidade miocárdica.

Avaliou-se ainda na ecocardiografia o fluxo da valva pulmonar, fluxo da valva aórtica e a relação onda E/A da valva mitral. Todas essas e as outras medidas foram realizadas em triplicadas e realizado a média aritmética entre elas. Os cortes e as janelas ecocardiográficas foram seguindo o modelo descrito pela Boon (2011).

4.7 Perfil sanguíneo

As coletas sanguíneas foram realizadas em dois tempos, antes da inoculação do veneno (T0) e no tempo final (TF) determinado, período duas horas após a inoculação do veneno. Foi puncionada a veia jugular utilizando-se seringa de 10 ml e agulha 25 x 7 mm (BD Solomed) e o sangue foi acondicionado em tubos com ácido etilendiaminotetracético tripotássico (K₃EDTA) 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 Experimental da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras foram aliqüotadas, identificadas e armazenadas a -20°C até o processamento.

O hemograma foi feito em analisador hematológico automático (Pentra DF 120) 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 e a concentração de proteínas totais foi estimada por refratometria (Thrall et al., 2012).

Para os testes de coagulação utilizou-se as amostras citradas e 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®.

Os parâmetros séricos de creatina quinase total (CK) e sua isoenzima MB (CK-MB), colesterol total e suas frações *high density lipoprotein* (HDL), *low density lipoprotein* (LDL), *very low density lipoprotein* (VLDL), lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), ureia, creatinina, triglicerídeos, cálcio total, cálcio total corrigido, cálcio iônico (Ca²⁺), fósforo (P), potássio (K), cloro (Cl) e sódio (Na) foram realizados por método colorimétrico cinético utilizando kits comerciais (Labtest®), no analisador bioquímico semi-automático (Labmax plenno).

Foram avaliadas troponina I (TnI), peptídeo natriurético do tipo B (BNP), proteína C reativa (PCR), d-dímero e procalcitonina pela técnica de Imunofluorescência com o aparelho da mLabs® Immuno Meter.

4.8 Eutanásia

Após a última coleta sangue (TF), os animais foram submetidos à eutanásia seguindo as normas do Guia Brasileiro de Boas Práticas Para Eutanásia dos Animais e as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e recomendações do CEUA/UFMG. Desta forma as cobaias foram eutanasiadas com a administração de tiopental pela via intravenosa com dose superior a 100 mg/kg.

4.8.1 Análise histopatológica

Foram realizadas as coletas de fragmentos do coração, rim, fígado, pulmão de todos os animais, os quais foram acondicionados em frascos contendo formol 10%, para posterior processamento pela técnica rotineira de inclusão em parafina e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para análise em microscopia óptica.

Outros fragmentos (0,5 cm) foram acondicionados imediatamente no glutaraldeído a 2% durante 24 horas e depois em tampão fosfato de sódio. Após encaminhados para o Laboratório de Microscopia eletrônica da Universidade Federal de Minas Gerais. 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.

Após as coletas as carcaças serão encaminhadas para descarte de acordo com o protocolo do Hospital Veterinário da UFMG.

4.9 Análise estatística

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 Quadro clínico

Os sinais clínicos observados nas cobaias após a inoculação de veneno de *M. frontalis* apareceram rapidamente, tanto os neurológicos como os cardiovasculares. Dezoito minutos após a inoculação IM do veneno, observou-se paralisia flácida (Fig. 10) dos membros posteriores e anteriores de um animal (cobaia 1) e dois minutos após (20 minutos após a inoculação do veneno), nesse mesmo animal, foram detectados, arritmia e complexo ventricular prematuro. De forma semelhante, Bucarechi et al., (2016) descreveram rápido aparecimento dos sinais clínicos neurológicos (20 minutos) em humanos após acidentes por *Micrurus sp.* Entretanto, os autores afirmaram que o tempo médio para o aparecimento da sintomatologia neurológica, está em torno de 3 horas.

Reis, (2017) estudando os efeitos do veneno de *M. surinamensis* em cobaias, relatou o aparecimento de sintomatologia neurológica somente uma hora após o envenenamento. Portanto, percebe-se que o veneno de *M. frontalis* apresenta ações neurológica e cardiovascular mais precoces quando comparado ao de *M. surinamensis*. Deve ser salientado que, nesse experimento foi utilizada mesma dose de Reis (2017).



Figura 10. Realização do eletrocardiograma computadorizado em cobaia (animal 1). Destaca-se a posição dos eletrodos.

Essa diferença de tempo entre os dois venenos, muito provavelmente, se deve ao fato do veneno da espécie *M. surinamensis* possuir apenas neurotoxinas pós-sinápticas, toxinas 3FTx que atuam nos receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina de forma reversível (Olamendi-Portugal et al., 2008). Todavia, o veneno de *M. frontalis*, além de possuir a atividade pós-sináptica, atua também nos receptores pré-sinápticos acelerando a manifestação dos sinais clínicos (Moreira et al., 2010).

Além da sintomatologia neurológica visualizada nas cobaias do grupo veneno, também foram vistas arritmias mais precocemente, quando comparado com o veneno de *M. surinamensis*. Apesar de ambas as espécies, possuírem toxinas 3FTx e PLA₂ com atividade cardiotoxica (Reis, 2017), apenas o veneno de *M. frontalis* tem uma fração denominada de cardiotoxina (com ação cardiotoxica), farmacologicamente e estruturalmente diferente das 3FTx (Moreira et al., 2010). Estudos demonstraram que os venenos de serpentes dos gêneros *Micrurus* apresentam variações individuais na composição, relacionados à sua distribuição geográfica. Ressalta-se que o veneno de *M. surinamensis*, uma serpente da floresta amazônica, não possui atividade proteolítica como apresentado pelo veneno de *M. frontalis* (Tanaka et al., 2010).

As cobaias envenenadas apresentaram um mesmo padrão de sinais clínicos neurológicos: inicialmente apresentaram paralisia flácida dos membros anteriores e posteriores. Observou-se logo após, fasciculações, seguidas de respiração restritiva e de padrão costo-abdominal. Cerca de uma hora após a injeção do veneno, os animais apresentavam midríase pupilar irresponsiva à luz e secreção translúcida ocular (Fig.11). E, 1 hora e 30 minutos após a administração do veneno verificou-se padrão respiratório restritivo e superficial, além ausência de reflexo medial e lateral palpebrais. Entretanto, diferente de Reis (2017), os animais não vieram à óbito nas primeiras duas horas de envenenamento, mas como estavam em estado comatoso foram eutanaziados. Toda essa sintomatologia neurológica é esperada e verificada nos acidentes elapídicos, tanto em humanos como em animais, pois o veneno possui frações neurotóxicas que atuam nos receptores colinérgicos nicotínicos de acetilcolina, além da ação das fasciculinas e dendroaspinas (Moreira et al., 2004, Manso, 2010, Moreira et al., 2010).



Figura 11. Presença de midríase ocular irresponsiva a luz e secreção translúcida periocular em cobaia (animal 3), 1 hora e 30 minutos após a inoculação do veneno de *Micrurus frontalis*.

5.2 Alterações laboratoriais

5.2.1 Eritrograma

Avaliando-se o eritrograma dos animais envenenados com *M. frontalis* e do grupo controle nos dois momentos, T0 e TF, verificou-se que em ambos os grupos houve uma diminuição significativa do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do do hematócrito. Tal evento também foi relatado por Reis (2017), no envenenamento experimental por *M. surinamensis* em cobaias (*Cavia porcellus*).

Existem algumas hipóteses para a diminuição significativa do eritrograma: hemorragia ou hemólise. Alguns autores relataram hemorragia em envenenamentos experimentais com *M. fulvius* e *M. frontalis* (Barros et al., 1994; Francis et al., 1997; Arce-Bejarano et al., 2014). Entretanto como não foi observada hemorragia *in vivo* e nem no exame *pos mortem*, essa hipótese foi descartada. Em relação à atividade hemolítica, foi relatado que as PLA₂ provenientes de serpente *M. fulvius* (espécie de serpente presente somente nos Estados Unidos) possuem ampla atividade hemolítica demonstrada em ratos e cães (Arce-Bejarano *et al.*, 2014). Todavia, a diminuição nos valores do eritrograma também foi observada no grupo controle, então a hipótese de hemólise causada pelo veneno, também foi descartada. Uma terceira hipótese seria uma resposta fisiológica da cobaia após manipulação, resultando num quadro de estresse agudo, que poderia levar a um sequestro esplênico dos eritrócitos. Tal sequestro, inclusive, poderia levar a um temporário aumento do tamanho do órgão (Owusu-Ofori e Hirst, 2013).

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão do eritrograma de cobaias, antes T0 (tempo zero) e 2h após TF (tempo Final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
RBC (x 10 ⁶ /μl)	T0	5,37±0,55 A	5,40±0,43 A
	TF	4,13±0,71 B	4,26 ±0,58 B
HGB (g/dl)	T0	15,20±1,70 A	15,06±0,37 A
	TF	11,88±1,66 B	12,15±0,61 B
VG (%)	T0	48,03±4,52 A	48,43±1,18 A
	TF	36,50±5,75 B	36,89 ±1,82 B
VCM (fL)	T0	89,48±2,23	90,16±7,50
	TF	88,59±2,88	90,63±8,07
HCM (pg)	T0	28,74±1,16	26,53±3,58
	TF	28,90±1,20	29,78±3,02
CHCM (g/dl)	T0	32,10±0,60	32,62±1,28
	TF	32,61±0,66	32,85±1,29
Reticulócitos (mm ³)	T0	58.000±25.170	58.550±25.224
	TF	62.131±33.634	56.138±21.971

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.

Tabela 2: Valores hematológicos de referência para cobaias

Parâmetros	Trall et al. (2012)	Weiss e Wardrop (2010)
RBC (x10 ⁶ /µl)	4,1 – 6,1	5,49 – 8,69
HGB (g/dl)	10,50 – 15,30	11,40 – 13,5
VG (%)	35,9 – 48,30	37,50 – 44,20
VCM (fL)	75 – 91	54,60 - 62
HCM (pg)	-	16,50 – 18,80
CHCM (%)	28,20 - 33	26,10 – 34,10

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

Avaliando os valores de ambos os grupos nos dois momentos, observou-se que mesmo com a redução do número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, esses encontram-se dentro dos valores de normalidade para espécie (Thrall et al., 2012).

Também é importante salientar que a quantidade de sangue total coletada (5 ml em cada coleta) foi inferior ao volume permitido (10 ml), portanto não houve alteração na distribuição dos eritrócitos no organismo dos animais. Desta forma, pode-se afirmar que o veneno de *M. frontalis* não causou hemólise nem hemorragias nas primeiras duas horas do envenenamento, sendo a hipótese de sequestro esplênico a mais provável.

5.2.2. Leucograma

Apesar de o número de leucócitos totais ter aumentado nos animais que receberam veneno de *M. frontalis* no TF (2h após), esses valores encontram-se dentro dos padrões de normalidade para espécie *Cavia porcellus* conforme descrito por Schemer (1967) e Mitruka e Rawnsley (1977). Os resultados desta pesquisa são semelhantes aos relatados por Peterson (2006) e por Reis (2017), nos envenenamentos por *Micrurus*. Possivelmente, essa discreta leucocitose seja decorrente da fração de PLA₂ presente no veneno que resultaria numa resposta inflamatória aguda, levando à uma neutrofilia como observado no TF dos animais envenenados (Kini, 2002, Peterson, 2006, Reis, 2017). Mas, o mais plausível seja uma resposta frente a um agente estressante no organismo: o veneno elapídico.

Tabela 3: Valores médios e desvio padrão do leucograma de cobaias, antes T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
Leucócitos totais (x 10 ³ /mm ³)	T0	8,45±3,91 A	7,78±1,37
	TF	12,78±6,34 Ba	8,38±1,84 b
Neutrófilos (x 10 ³ /mm ³)	T0	4,90±2,59 A	4,95±0,98
	TF	10,54±5,31 Ba	4,88±1,09 b
Eosinófilos (x 10 ³ /mm ³)	T0	0,11±0,08	0,15±0,06
	TF	0,21±0,20	0,14±0,07
Linfócitos (x 10 ³ /mm ³)	T0	3,09±1,33 A	3,30±0,79
	TF	1,30±0,55 Ba	3,03±0,82 b
Monócitos (x 10 ³ /mm ³)	T0	0,32±0,30 A	0,28±0,07
	TF	0,80±0,66 Ba	0,32±0,10 b
Basófilos (x 10 ³ /mm ³)	T0	0,00±0,00	0,00±0,00
	TF	0,00±0,00	0,00±0,00

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 $p < 0,05$.

Tabela 4: Valores de referência do leucograma para cobaias

Parâmetros	Mitruka e Rawnsley (1977)	Schermer (1967)
Leucócitos (x10⁶/µl)	3,2 – 15,00	7,8 – 20,7
Neutrófilos (%)	18 - 35	21,7 -47,7
Eosinófilos (%)	1 – 5	2,1 – 7,8
Linfócitos (%)	55 - 75	41,3 – 68,5
Basófilos (%)	0 - 3	0,6 – 2,7
Monócitos (%)	3 - 12	2,46 – 5,84

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

A neutrofilia observada no TF do grupo de animais envenenados não foi verificada no grupo controle. Essa neutrofilia é devido ao componente inflamatório, entretanto não podemos descartar o estresse ocasionado pelo veneno que pode levar a uma migração do *pool* de neutrófilos (Couto, 2010, Thrall et al., 2012).

Avaliando-se o número absoluto de linfócitos nos dois momentos e em ambos os grupos, verificou-se uma diminuição significativa no grupo de animais envenenados no TF, fato também relatado por Reis, (2017) no envenenamento por *M. surinamensis*. Essa diminuição dos linfócitos com neutrofilia é clássico de processo inflamatório agudo, pois leva a uma migração dos linfócitos para os órgãos linfoides (Thrall et al., 2012).

Outro achado comum nos processos inflamatórios agudos é o aumento do número de monócitos, como observado no TF dos animais do grupo veneno, pois com a ativação da cascata de inflamação ocorre um aumento dos monócitos circulantes (Thrall et al., 2012).

5.2.3. Coagulograma

A hemostasia compreende uma série de eventos fisiológicos que visam manter o sangue em estado fluido no interior dos vasos sanguíneos, e deste modo, impedir o seu extravasamento. Para que isto ocorra de modo efetivo, é necessário que se tenha um equilíbrio entre fatores pró-coagulantes e anticoagulantes (Smith, 2010). Participam do sistema hemostático, o endotélio vascular, plaquetas e fatores de coagulação. Para um entendimento didático, divide-se a hemostasia em três fases: (a) primária, com ênfase na atividade plaquetária; (b) secundária, com o envolvimento dos fatores de coagulação propriamente dito; e (c) terciária ou fibrinólise, que após a formação do coágulo, esse é degradado por um sistema fibrinolítico. Adicionalmente, o modelo clássico da coagulação, (cascata) é dividido em via intrínseca, extrínseca e comum (Macfarlane, 1964; Davie e Ratnoff, 1964).

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

Ainda que os testes de TP e TTPa não demonstrem o que ocorre totalmente *in vivo* na hemostasia, eles devem continuar sendo realizados como testes de triagem da hemostasia, sobretudo para os distúrbios de hipocoagulabilidade.

Avaliando-se o coagulograma verificou-se que 2 h após a administração do veneno de *M. frontalis* (grupo veneno) ocorreu uma diminuição significativa de TTPa e D-dímeros. Todavia, não houve diferença significativa no TP e no número de plaquetas entre tempos e grupos (diferentes desafios).

A diminuição de D-dímeros no grupo de animais envenenados sugere uma ação anticoagulante do veneno de *M. frontalis*. Os D-dímeros são originados após coagulação, a qual é ativada por uma lesão vascular, gerando trombina. A trombina transforma o fibrinogênio em fibrina. Posteriormente a fibrina é degradada pelo sistema fibrinolítico em Produtos de Degradação da Fibrina (PDFs) precoces e tardios. Esses PDFs são degradados em fragmentos menores de 240 kDa chamados de D-dímeros. A presença de D-dímeros no plasma de um animal é prova de uma fibrinólise consecutiva à ativação do Fator XIII da coagulação (Smith, 2010; Baker, 2012). Este estudo é pioneiro na dosagem de D-dímeros em plasma de animais envenenados com peçonha de *M. frontalis*. Não se sabe qual o real mecanismo de ação, mas essa diminuição revela uma atividade anti-coagulante deste veneno, sendo necessários mais estudos para identificar o real mecanismo de ação.

Tabela 5: Valores médios e desvio padrão do número de plaquetas/ μl , TTPa (seg), TP (seg), concentração de fibrinogênio (mg/dl) e d-dímero de cobaias de sangue de cobaias, antes T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
TP (seg)	T0	75,80 \pm 26,02	78,83 \pm 11,36
	TF	79,20 \pm 19,57	77,33 \pm 6,12
TTPa (seg)	T0	36,50 \pm 8,88 A	37,66 \pm 8,16
	TF	26,11 \pm 4,96 Ba	38,66 \pm 8,73 b
Fibrionogênio (mg/dl)	T0	255 \pm 53,94	233 \pm 26,99
	TF	280 \pm 59,32	256 \pm 44,90
D-dímero (mg/L)	T0	0,16 \pm 0,05 A	0,15 \pm 0,05
	TF	0,11 \pm 0,04 B	0,13 \pm 0,05
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	T0	183 \pm 51,74	200 \pm 47,32
	TF	165 \pm 48,39	200 \pm 30,80

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 $p < 0,05$.

O TTPa é um exame utilizado para avaliação dos mecanismos intrínsecos da coagulação, avaliando os Fatores XII, XI, IX, VIII, X, protombina e o fibrinogênio (Smith, 2010, Baker, 2012). Como ocorreu uma diminuição dos D-dímeros nos animais envenenados, sugere-se uma atividade anti-coagulante do veneno de *M. frontalis* corroborando os resultados de TTPa nesses animais.

Avaliando o coagulograma do envenenamento por *M. frontalis* no presente estudo, observa-se resultados bem diferentes de animais envenenados com outros tipos de serpentes, como as do gênero *Bothrops* e *Crotalus* que atuam em vários sítios da cascata de coagulação, aumentando TP e TTPa e diminuindo de forma significativa o fibrinogênio (Melo e Soto-Branco, 2014). Diferente de Francis et al., (1997), que verificaram ações hipotensora e hemorrágica, da fração PLA₂ do veneno da *M. frontalis* em ratos, não se observou qualquer tipo de hemorrágia nos animais deste experimento. Esses resultados corroboram a composição do veneno de *M. frontalis*, já que o mesmo não possui serinoproteases.

5.2.4. Perfil Bioquímico

O colesterol e suas frações LDL, VLDL e HDL e os triglicerídeos diminuíram significativamente nos animais envenenados no TF (Tab.6), o que não foi observado no grupo controle. Esse fato, possivelmente se deve a fração PLA₂ presente no veneno da *M. frontalis* (Kini, 2002). A PLA₂ catalisa e hidrolisa os ésteres de colesterol (Guyton e Hall, 1998) ocorrendo uma diminuição dos triglicerídeos e do colesterol e suas frações no envenenamento por *M. frontalis*.

Tabela 6: Valores séricos médios e desvio padrão de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, ALT, FA, GGT e triglicerídeos de cobaias no Tempo zero (T0) e 2h após Tempo Final (TF) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
Colesterol total (mg/dl)	T0	47,50±10,70 A	50,00±8,63
	TF	10,60±5,92 Ba	51,18±8,68 b
HDL (mg/dl)	T0	3,81±0,84 A	3,96±0,86
	TF	1,83±1,03 B, a	4,92±0,74 b
LDL (mg/dl)	T0	24,88±12,44 A	26,85±10,56
	TF	2,06±2,19 B, a	27,33±10,15 b
VLDL (md/dl)	T0	18,80±3,38 A	19,18±3,63
	TF	3,76±3,74 Ba	19,85±3,59 b
ALT (UI/L)	T0	94±30,53 A	90,66±11,43
	TF	116±23,50 B	90,83±10,60
FA (UI/L)	T0	84±61,59	72,16±16,29
	TF	187±189,98	78,16±8,10
GGT (UI/L)	T0	12±3,84	11,80±2,31
	TF	9±3,55	10±1,26
Triglicerídeos (mg/dl)	T0	94±16,91 A	90,16±9,78
	TF	30±12,54 Ba	94,50±8,87 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 $p < 0,05$.

Tabela 7: Valores séricos médios e desvio padrão de CK, LDH e AST de cobaias, T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
CK (UI/L)	T0	1627±1340 A	1464±689
	TF	10399±2980 Ba	1443±565 b
LDH (UI/L)	T0	878±318 A	757±269
	TF	1572±1199 Ba	780±281 b
AST (UI/L)	T0	118±60,97 A	84,66±13,33
	TF	673±293 Ba	94,00±13,97 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 $p < 0,05$.

Comparando-se o resultado de CK no grupo de animais envenenados no T0 e no TF por *M. frontalis*, verificou-se um aumento significativo das enzimas após o envenenamento (Tab.7). A enzima CK é importante para a avaliação de lesões musculares da musculatura esquelética (Thrall et al., 2012). Resultados semelhantes foram descritos no envenenamento de *M. surinamensis*, no qual se observou um aumento significativo de CK e CK-MB corroborando o presente estudo (Reis, 2017).

Esse aumento de CK deve-se ao fato do veneno da *M. frontalis* ter uma ação miotóxica direta nas fibras musculares. Estudos avaliando a cinética do CK descrevem que o pico sérico se dá em 6 a 12 horas após o agravo no músculo (Allison, 2012). Então, como o veneno da *M. frontalis* elevou significativamente a enzima CK em apenas duas horas, pode-se inferir que entre 6 a 12 horas após, os níveis séricos de CK estariam mais aumentados.

A enzima LDH é encontrada nos eritrócitos, hepatócitos, músculo e cardiomiócitos, dessa forma, LDH é um biomarcador sistêmico do organismo por possuir ampla distribuição no mesmo. E, também por este motivo, a avaliação de LDH deve ser realizada concomitantemente com os outros resultados bioquímicos (Thrall et al., 2012). Nessa pesquisa, observou um aumento significativo da enzima LDH nas cobaias após administração do veneno de *M. frontalis*, sugerindo lesão muscular e corroborando com o aumento de CK.

Também houve aumento das enzimas AST e ALT (Tab.6) que apesar de não serem órgão específicas, podem ter origem muscular e hepática (Thrall et al., 2012). Salienta-se que o veneno ofídico é metabolizado no fígado, podendo justificar o aumento destas enzimas (Barraviera et al., 1991). Todavia, foram dosadas as enzimas FA e GGT, enzimas presentes nos ductos biliares, indicadoras de colangite obliterante. Como não houve aumento destas enzimas, pode-se inferir que o aumento da AST e ALT seja proveniente de lesão muscular. Mas, as cobaias (*Cavia porcellus*) apresentam uma particularidade: a atividade de AST e ALT em células cardíacas é equivalente à atividade hepática (Campbell, 2012). Então, o aumento de ALT no grupo dos animais envenenados pode ser decorrente da cardiotoxicidade do veneno de *M. frontalis* confirmado pelo aumento de troponina I (lesão miocárdica) no TF, que será descrito adiante.

Tabela 8: Valores séricos médios e desvio padrão de ureia e creatinina de cobaias, T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
Ureia (mg/dl)	T0	58±12,98	56,83±4,30
	TF	69±24,68	55,16±5,91
Creatinina (mg/dl)	T0	1,25±0,19	1,17±0,09
	TF	1,22±0,35	1,09±0,07

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 $p < 0,05$.

No presente estudo utilizou-se a dosagem de uréia e creatinina sérica para avaliação de função renal das cobaias (Campbell, 2012). Entretanto, não foram observadas variações significativas (Tab.8) após administração do veneno (no TF). Muitos venenos de serpentes são causadores de injúrias renais por diferentes ações. Seja devido à lesão muscular, com liberação de mioglobina na circulação, levando a um quadro de insuficiência renal aguda e diminuição da taxa de filtração glomerular (Braun e Lefebvre, 2003); seja por hipotensão acentuada e abrupta ou pela presença de coágulos de fibrina (Melo e Soto-Branco, 2014). Entretanto, para melhor avaliação da lesão renal é necessária a dosagem de uréia e creatinina por um período maior, além de utilizar marcadores precoces de injúria renal como o GGT urinário.

Tabela 9: Valores séricos médios e desvio padrão de PCR, procalcitonina e glicose de cobaias, T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
PCR (mg/dl)	T0	<5	<5
	TF	<5	<5
Procalcitonina (ng/dl)	T0	0,11±0,02	0,12±0,03
	TF	0,11±0,01	0,11±0,01
Glicose (mg/dl)	T0	116±15,83 A	115±13,48
	TF	157±52,85 Ba	115±11,03 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 proteína C reativa (PCR) é um marcador precoce de inflamação (Thall et al. 2012). Como não houve alteração dos níveis de PCR nas cobaias após injeção do veneno de *M. frontalis*, estes resultados confirmam que o aumento do número de leucócitos totais nos animais envenenados relatado anteriormente, seja decorrente de uma resposta frente a um quadro de estresse (Tab.9). Ressalta-se que o método de dosagem de PCR utilizado, têm sensibilidade reduzida para detecção de baixos níveis de inflamação, sendo a concentração sérica mínima de 5 mg/dL e, com apenas duas horas de envenenamento espera-se valores inferiores de PCR.

A procalcitonina (PCT) é um pró-hormônio que em condições normais não é detectado no sangue, encontrado apenas no interior das células C da tireóide, sendo um precursor da calcitonina. A PCT pode ser encontrada na circulação em situações de estresse como em infecções disseminadas e processos inflamatórios extensos. Entretanto, sua detecção no sangue é a partir de 4 horas do evento, mantendo-se elevada por até 24 horas (Meisner et al., 1999). Verificou-se no presente estudo que não houve aumento significativo da PCT após injeção do veneno, corroborando com os resultados de PCR.

Em relação a glicemia, verificou-se que houve aumento significativo de glicose nos animais do grupo veneno no TF (Tab.9). Novamente, este resultado é explicado pelo estresse ocasionado pelo veneno de *M. frontalis*. O estresse leva a um aumento do cortisol circulante e, conseqüentemente, uma hiperglicemia devido ao antagonismo do cortisol com os receptores de insulina (Guyton e Hall, 1998).

5.2.4.1 Proteinograma e Ionograma

Analisando o proteinograma dos grupos nos dois momentos, observou-se uma redução das proteínas totais e suas frações albumina e globulina no grupo de animais envenenados no TF, quando comparado ao T0 (Tab.10). As proteínas exercem funções vitais no organismo, pois participam da manutenção da pressão osmótica e viscosidade sanguínea, transportam substâncias,

fazem a regulação do pH sanguíneo e participam da cascata da coagulação sanguínea (González e Scheffer, 2003).

Quando se tem um processo inflamatório agudo, as proteínas de fase aguda que são classificadas em positivas e negativas. As proteínas positivas são aquelas que a concentração plasmática aumenta durante o processo inflamatório e as negativas são aquelas que diminuem (González e Scheffer, 2003).

Durante o processo inflamatório agudo temos a liberação de diversas citocinas na corrente sanguínea como as interleucinas IL1, IL6 e IL8, além de TNF α . O fígado então produz diversas substâncias reagentes de fase aguda. Entretanto, há uma redução na produção de outras proteínas, denominadas de reagentes negativos da fase aguda como a albumina, fato que explica a redução da albumina no TF dos animais envenenados (Ritchie et al, 1999).

Observa-se a redução de albumina em diversas alterações metabólicas e fisiológicas, a sua redução pode ser pela baixa síntese desta proteína pelo fígado, pode ser motivada pelas perdas renais, intestinais ou cutâneas. Além dessas causas temos a subnutrição, má absorção, a caquexia e os processos inflamatórios agudos, como é o caso verificado dos animais envenenados no TF (Ritchie et al, 1999).

Reis (2017) não observou redução das albuminas e das globulinas no seu experimento. Portanto, pode-se inferir que o processo inflamatório agudo da *M. frontalis* é mais intenso que o processo inflamatório da *M. surinamensis*.

As gamaglobulinas são proteínas do sistema imunológico, que aumentam nos processos infecciosos e não são proteínas precoces de processo inflamatório agudo, por este motivo não se espera o seu aumento no envenenamento de *M. fontalis* (González e Scheffer, 2003).

O fato da relação A/G ter aumentado é devido a uma maior diminuição das globulinas em relação as albuminas, como as globulinas são inversamente proporcionais a relação A/G, temos o seu aumento significativo.

Tabela 10: Valores séricos médios e desvio padrão das proteínas totais, albumina, globulina, relação albumina/globulina (A/G) de cobaias, antes T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a administração de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Grupos/desvio padrão			
Parâmetros	Momentos	Veneno	Controle
Proteínas totais (g/dl)	T0	5,86±0,50 A	5,95±0,19
	TF	4,21±0,67 B, a	5,70±0,26 b
Albumina (g/dL)	T0	2,87±0,30 A	2,89±0,30
	TF	2,15±0,32 B, a	2,87±0,30 b
Globulina (g/dL)	T0	2,99±0,22 A	3,01±0,22
	TF	2,05±0,35 B, a	2,81±0,16 b
A/G (g/dL)	T0	0,95±0,05 A	0,92±0,07
	TF	1,05±0,07 B, a	1,03±0,14 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 $p < 0,05$.

Tabela 11: Valores séricos médios e desvio padrão dos eletrólitos, cálcio, fósforo, potássio, sódio e cloro de cobaias, antes T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a administração de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
Cálcio total (mg/dL)	T0	9,36±0,72 A	9,75±0,82
	TF	8,05±0,75 B, a	9,78±0,29 b
Cálcio iônico (mg/dL)	T0	5,48±0,30	5,70±0,46
	TF	5,27±1,10	5,70±0,26
Cálcio total corrigido (mg/dL)	T0	10,15±0,80	10,70±0,64
	TF	9,23±1,76 a	10,50±0,35 b
Fósforo (mg/dL)	T0	8,78±2,80 A	7,71±0,77
	TF	11,68±2,00 B, a	7,70±0,60 b
Potássio (mmol/L)	T0	8,15±1,22 A	6,90±0,60
	TF	6,25±1,60 B	6,01±0,88
Sódio (mmol/L)	T0	159±8,07 A	158±8,66
	TF	151±7,52 B, a	158±9,12 b
Cloro (mEq/L)	T0	121±18,25 A	119±15,76
	TF	107±23,90 B	118±12,27

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 $p < 0,05$.

O cálcio foi avaliado de três formas, cálcio total, cálcio total corrigido e o cálcio iônico, contudo não houve diferença estatística entre o T0 e o TF de ambos os grupos (Tab.11). Só houve diferença significativa comparando o TF de ambos os grupos para o cálcio total e o cálcio corrigido.

O cálcio total está vinculado cerca de 40-45 % as proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, por este motivo quando há uma redução significativa das albuminas espera-se que o cálcio total sérico também reduza (Bohn, 2012). Avaliando os resultados de cálcio total, observa-se uma redução significativa entre o T0 e o TF dos animais do grupo veneno, devido a menor circulação de cálcio ligado as albuminas pelo processo inflamatório. Como o cálcio corrigido é diretamente proporcional aos valores de cálcio total, conseqüentemente ocorre sua redução. Como os valores de referência para cálcio variam de 8,2-12,0 mg/dl, percebe-se que os valores médios encontrados nos animais do grupo veneno e controle, estão dentro da normalidade (Campbell, 2012).

Outros eletrólitos que tiveram alterações significativas entre o T0 e o TF, foram o potássio e o sódio. O potássio apresentou um aumento entre o T0 e 0 TF no grupo controle e o sódio teve uma redução entre os dois momentos no grupo de animais envenenados (Tab.11).

Em cobaias, os valores de referência para o fósforo variam de 3,0-7,6 mg/dl (Campbell, 2012). Quando se avalia os valores encontrados tanto no grupo e no grupo de animais envenenados, pode-se verificar que os valores estão acima dos descritos por Campbell (2012). Reis (2017) relatou valores para fósforo superiores aos de Campbell (2012). O aumento do fósforo pode ser relacionado ao início de uma injúria renal, pois a sua excreção diminuiu com a redução

da taxa de filtração para equilibrar o balanço de cálcio e fósforo (Rosol e Carpen, 1996; Martos et al., 2012).

O sódio reduziu significativamente no grupo de animais envenenados no TF e, esta diminuição, pode ser explicada pelo estresse provocado pela inoculação do veneno de *M. frontalis*. Numa situação de estresse há aumento do hormônio da vasopressina circulante e consequentemente um aumento da excreção de sódio pela urina (Sttele et al, 1997). Outro mecanismo que explicaria essa diminuição é a injúria renal causada pelo veneno de *M. frontalis*, pois nos casos de insuficiência renal aguda oligúrica há uma diminuição de sódio circulante devido as lesões renais e a maior excreção de sódio pelos rins (Sterns e Silver, 2008).

O potássio e o cloro apresentaram uma diminuição significativa nos animais envenenados noTF. A redução do potássio, muito provavelmente, deve-se a liberação de catecolaminas pelo estresse após o envenenamento. As catecolaminas agem via receptores β 2-adrenérgicos, promovendo a entrada de potássio nas células por aumento da atividade da Na-K-ATPase. Como consequência, pode ocorrer hipocalemia transitória com liberação de adrenalina (Narins et al., 1993).

O cloro também apresentou uma redução significativa nos animais envenenados noTF, e essa redução pode estar relacionada ao seu desvio, do meio extracelular para o intracelular, como o que ocorre na acidose respiratória compensada, pois os animais envenenados apresentaram paralisia do diafragma e consequentemente acidose respiratória. Também deve-se destacar que a nefropatia com perda de sódio ocasionada pelo veneno de *M. frontalis*, pode levar à uma redução do cloro circulante (Morais e Biondo, 2007).

5.2.4.2 Biomarcadores cardíacos

Existem vários biomarcadores cardíacos disponíveis, alguns de lesão cardíaca ou necrose e outros de função cardíaca. Os principais biomarcadores de lesão cardíaca são: creatinoquinase isoenzima MB e as troponinas I, T e C; e o biomarcador de função cardíaca é o peptídeo natriurético tipo B (BNP) (Scheiber, 2004).

A creatinoquinase isoenzima MB é derivada da creatinoquinase CK total, sendo esta uma enzima reguladora da produção e utilização do fosfato de alta energia dos tecidos contráteis, principalmente a musculatura. A CK total é composta por duas subunidades denominadas M e B, formando assim três isoenzimas denominadas de creatinoquinase isoenzima MM (CK-MM), creatinoquinase isoenzima BB (CK-BB) e a creatinoquinase isoenzima MB (CK-MB) (Britton, 1980). A fração CK-BB está presente no cérebro, a CK-MM, nos músculos esquelético e cardíaco e a CK-MB, principalmente no coração. A CK-MB está no miocárdio, no qual representa cerca de 20% da CK contra 80% de CK-MM. A CK-MB também está presente no músculo estriado esquelético, embora em pequena proporção (entre 1% e 4%, sendo o restante CK-MM) (Thompson, 1997; Valberg, 2008).

A fração CK-MB tem sido utilizada como exame complementar para o diagnóstico de lesão cardíaca, entretanto, pode ser encontrada levemente alterada em pessoas e animais saudáveis. Todavia, o seu aumento sérico deve-se a lesão do músculo esquelético, seja este cardíaco ou não, e por este motivo a isoenzima CK-MB não é específica de lesão cardíaca e sim, sugestiva (Piegas et al., 2009).

Após a lesão muscular ocorre uma elevação da CK-MB entre 3-6 horas atingindo o pico entre 16-24 horas após a lesão. Devido a essa cinética, o aumento temporal de CK-MB não pode

ser utilizado como um marcador precoce de lesão cardíaca, já que não detecta o aumento nas três primeiras horas (Panteghini, 1998). Todavia, mesmo não sendo um marcador precoce de injúria cardíaca, na espécie *Cavia porcellus* verificou-se que pode ser utilizado como marcador precoce de lesão cardíaca pois houve um aumento significativo (129%) de CK-MB nas duas primeiras horas de envenenamento por *M. frontalis* (Tab.12). Desta forma, esse resultado corrobora o achado de Reis (2017), que também detectou um aumento precoce de CK-MB em cobaias após envenenamento experimental por *M. surinamensis*.

A lesão muscular deve-se a ação miotóxica do veneno da *M. frontalis*, causada pelas PLA₂ que atuam diretamente no sarcolema, desta forma levando a um aumento da concentração de cálcio citosólico e, conseqüentemente, uma hiperconcentração dos microfilamentos, com danos mitocondriais e ativação de fosfolipases dependentes de cálcio e, posterior necrose tecidual (Gutierrez et al., 1983; Arroyo et al., 1987; Mebs, 1990).

Além da fração de PLA₂ do veneno da *M. frontalis* ser cardiotoxica, esse possui outra fração, denominada de cardiotoxina, que está presente na fração 3FTx. A cardiotoxina age diretamente nas células cardíacas formando poros nas membranas celulares e desta forma rompendo os cardiomiócitos, aumentando troponina I e CKMB (Moreira et al., 2010).

Não se pode afirmar, apenas com a dosagem de CK-MB, que os envenenamentos de *M. frontalis* e *M. surinamensis* causam lesão cardíaca, pois observa-se CK-MB em outras musculaturas do corpo. Entretanto, esses resultados são bem sugestivos de necrose cardíaca. Para confirmar essa suspeita, o ideal é avaliar os resultados de troponina I sérica. Contudo, houve aumento significativo de troponina I, duas horas após a inoculação do veneno *M. frontalis*. Como a troponina I é considerada o biomarcador padrão ouro para o diagnóstico de lesão cardíaca (Thygesen, 2007), conclui-se que o veneno de *M. frontalis* causa lesão cardíaca com o aumento significativo de CK-MB e troponina I.

As troponinas (Tn) contituem três isoformas tecidos específicos denominados de troponina I (TnI), troponina T (TnT) e troponina C (TnC). A troponina I (subunidade inibidora da actina), troponina T (subunidade ligada à miosina – tropomiosina) e a troponina C (subunidade ligada ao cálcio e reguladora da contração). A troponina C é encontrada em tecidos de contração lenta, portanto não está presente na musculatura cardíaca, e não é relevante para o diagnóstico precoce de lesão cardíaca (Adams et al. 1993).

Nos estudos realizados com a TnI não foi possível encontrar qualquer nível dessa proteína fora do coração, em qualquer estágio de desenvolvimento do organismo. De forma contrária, a TnT pode ser detectada no plasma de indivíduos com doença músculo esquelético. Desta forma, a troponina I é considerada o biomarcador padrão ouro para o diagnóstico de lesão cardíaca (Adams et al. 1993, Bodor et al. 1995, Thygesen, 2007).

O nível sérico da troponina I começa a se elevar após duas ou três horas da lesão cardíaca, alcançando o seu pico máximo dentro $12,2 \pm 4,6$ horas como descrito por Bertichant et al., (1993). Desta forma pode-se extrapolar, que os níveis de troponina I encontradas nos animais após duas horas de envenenamento, aumentarão temporalmente até o pico máximo de 12 horas.

Tabela 12: Valores séricos médios e desvio padrão da CK-MB, troponina I e BNP, antes T0 (Tempo zero) e 2h após TF (Tempo Final) a administração de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
CK-MB (UI/L)	T0	312±68,42 A	308±58,79
	TF	717±423,27 Ba	324±31,96 b
Troponina I (ng/ml)	T0	0,11±0,04 A	0,10±0,00
	TF	0,89±0,89 Ba	0,11±0,04 b
BNP (ng/L)	T0	<18Cc	<18Cc
	TF	<18Cc	<18Cc

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 $p < 0,05$.

Além da CK-MB e da troponina I, foi realizada a mensuração sérica do peptídeo natriurético tipo B (BNP). Todavia, não houve aumento significativo deste biomarcador após o envenenamento, apresentando-se indetectável no período realizado (Tab.12).

O BNP é considerado marcador cardíaco para insuficiência cardíaca descompensada, aumentando quando o paciente apresenta alterações na função cardíaca. O BNP é um neurohormônio secretado pelos ventrículos em resposta à expansão de volume e sobrecarga de pressão. Seus níveis estão correlacionados com medidas hemodinâmicas, tais como: pressão átrio direito, pressão capilar pulmonar e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (Maisel, 2001).

Outras situações como a síndrome isquêmica aguda, insuficiência renal aguda, fibrilação atrial, doença pulmonar obstrutiva crônica e embolia pulmonar podem cursar com BNP dentro de uma zona superior ao de normalidade, entretanto próximas do limite superior (Bettencourt et al., 2002, Maisel et al., 2002.)

Como os valores de BNP mantiveram-se indetectáveis nos exames duas horas após o envenenamento por *M. frontalis* e, como esse é um biomarcador precoce de função cardíaca, aumentando nas primeiras horas e atingindo o pico com 24 horas (Ogawa et al., 2006), pode-se inferir que o veneno de *M. frontalis* não causou alterações de função cardíaca como hipertensão pulmonar, nem aumento da pressão interatrial e interventricular.

5.3 Eletrocardiograma

Todas as cobaias, no tempo zero, apresentaram um ritmo regular sinusal (Fig.12), sendo este um ritmo fisiológico para o coração, com a presença de uma onda P precedida por um complexo QRS (Tilley, 2004). Este ritmo tolera uma variação de até 10% entre os intervalos RR, e caso haja um intervalo maior de 10 % entre RR, denomina-se de arritmia sinusal. Contudo, todos os animais apresentaram seus intervalos RR dentro dos 10 % de variação (Tilley, 2004, Ware, 2010).

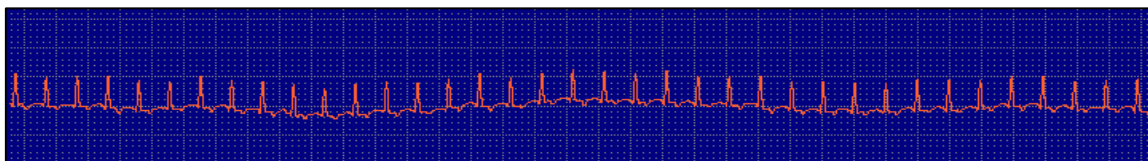


Figura 12. Traçado eletrocardiográfico evidenciando o ritmo sinusal de cobaia (animal 5) do grupo veneno (Tempo zero). Derivação D2, 25 mm/s, N.

Além da avaliação do ritmo no eletrocardiograma, também é importante avaliar a morfologia, duração e amplitude das ondas e seus respectivos intervalos. Realizando essa avaliação, verificou-se que nos animais envenenados com *M. frontalis* houve um aumento significativo ($p < 0,05$) do intervalo QT em relação ao tempo zero (T0).

O intervalo QT é definido como a medida do início do complexo QRS até o final da onda T, sendo inversamente proporcional a frequência cardíaca. Este intervalo representa a duração total da atividade elétrica ventricular e é influenciado diretamente pela frequência cardíaca, pelo tônus do sistema nervoso autônomo, anormalidade do sistema nervoso central, alterações eletrolíticas e, secundariamente ao prolongamento do QRS (Ware, 2010).

Tabela 13: 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), ângulo QRS ($^{\circ}$) e FC (frequência cardíaca) (bpm) obtidas a partir do exame eletrocardiográfico de cobaias, antes T0 (Tempo zero) e 2h TF (Tempo Final) após a administração de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
Onda P (ms)	T0	25,50±4,13	25,30±2,42
	TF	29,66±7,47	26±2,75
Onda P (mV)	T0	0,069±0,026	0,064±0,011
	TF	0,046±0,029	0,067±0,012
Intervalo PR (ms)	T0	59,33±9,93	57,66±7,55
	TF	71,16±14,94	59,33±7,57
Complexo QRS (ms)	T0	36,66±5,50	37,83±4,95
	TF	37,16±4,87	38,50±6,86
Onda R (mV)	T0	0,514±0,145	0,499±0,068
	TF	0,380±0,175	0,492±0,095
Período QT (m/s)	T0	123±14,92 A	120±9,21
	TF	136±11,99 B	123±8,80
Período QTc (m/s)	T0	264±25,74	270±11,58
	TF	277±18,30	276±25,46
Onda T (mV)	T0	0,080±0,068	0,074±0,035
	TF	0,091±0,066	0,072±0,057
Ângulo QRS ($^{\circ}$)	T0	36,33±2,25 A	34,50±2,88
	TF	33,33±1,75 B	34,16±2,13
FC (bpm)	T0	282±54	301±22
	TF	253±49	301±26

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 animais envenenados com *M. frontalis* não apresentaram diferenças estatísticas em relação a frequência cardíaca, e desta forma não ocorreu interferência direta do resultado pela diminuição da frequência cardíaca, já que essa é inversamente proporcional ao intervalo QT. Entretanto Reis, (2017) descreveu uma diminuição da frequência cardíaca significativa nos animais envenenados com *M. surinamensis*, o que não foi evidenciado no estudo com *M. frontalis*.

Além do veneno de *M. surinamensis*, Weis e McIsaac, (1971), relataram que o veneno de *M. fulvius* ocasionou uma diminuição da frequência cardíaca em gatos anestesiados, além do decréscimo da pressão arterial sistêmica e onda T bifásica, sugestivas de um QT prolongado e, presença de complexos ventriculares prematuros.

O QT aumentado nos animais envenenados com *M. frontalis* deve-se as alterações eletrolíticas ocasionadas pelo veneno *M. frontalis* e suas porções cardiotoxícas como as PLA₂ e as cardiotoxinas presentes na fração 3FTx. Pois quando ocorre lesão miocárdica, como comprovado pelo aumento de troponina I, têm-se lesões nas membranas plasmáticas dos cardiomiócitos e, conseqüentemente alterações eletrolíticas. Nesse experimento foi observado um aumento de potássio sérico. A hipercalemia leva a uma diminuição da excitabilidade do miocárdio e, conseqüentemente ocorre um maior intervalo de despolarização e repolarização e aumento do intervalo QT (Juzado, Pérez e Díez, 2012).

Além da diferença significativa entre o intervalo QT no T0 e TF, foi verificado uma mudança de eixo cardíaco. O eixo cardíaco representa o vetor resultante da somatória dos vários vetores elétricos que ocorrem em determinada fase do ciclo cardíaco. Apesar de se observar uma pequena diminuição do eixo cardíaco, essa foi significativa ($p < 0,05$), podendo estar associada à diminuição da fração de encurtamento do coração. Isso leva à uma mudança morfológica do coração com o relaxamento maior das fibras cardíacas. Todavia, deve ser salientado que, ambos os valores são clinicamente normais (Tilley, 2004).

Tabela 14: Alterações eletrocardiográficas encontradas em cobaias, antes (Tempo zero) e 2h TF (Tempo Final) após a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

ANIMAIS	T0	TF
Animais 1	Sem alterações	Extrassístole ventricular (20 min)
Animais 2	Sem alterações	Extrassístole ventricular (45 min)
Animais 3	Sem alterações	Extrassístole ventricular (52 min)
Animal 4	Sem alterações	Extrassístole ventricular (37 min)
Animal 5	Sem alterações	Extrassístole ventricular (58 min) Redução da amplitude a onda R (1h 30 min)
Animais 6	Sem alterações	Extrassístole ventricular (34 minutos)
Grupo controle	Sem alterações	Sem alterações

Avaliando-se ainda as morfologias de ondas, verificou-se apenas no animal 5, uma redução da amplitude da onda R, comparando o tempo zero e 1 hora e 30 minutos após a inoculação do veneno, como demonstrado na Figura 13.

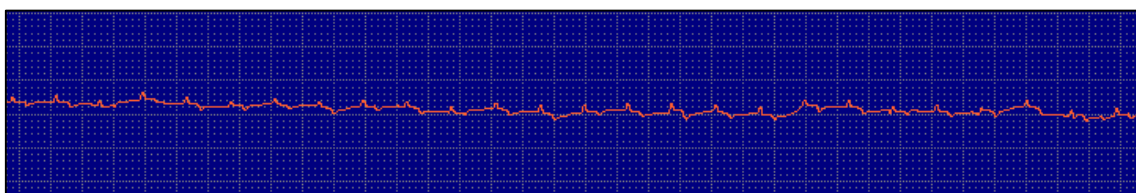


Figura 13. Traçado eletrocardiográfico com amplitudes de onda R reduzidos (animal 5) do grupo veneno (Tempo final). Derivação D2, 25 mm/s, N.

A principais causas de complexos QRS com amplitude reduzida são: derrame pericárdico, hipotireoidismo, derrame pleural, doença pulmonar obstrutiva, pneumotórax, obesidade e anasarca (Tilley, 2004). Não foram observadas efusões pericárdica ou pleural durante a necropsia dos animais. Por ser uma alteração após o envenenamento por *M. frontalis* descartou-se obesidade, anasarca, hipotireoidismo e doença pulmonar obstrutiva, pois ocorreu uma redução plasmática dos D-dímeros. Esse achado pode ser apenas uma alteração individual, mas que merece atenção especial em futuros estudos eletrofisiológicos com o veneno de *M. frontalis*.

Outra alteração eletrocardiográfica encontrada em 100% dos animais envenenados foi a presença de extrassístoles ventriculares (Figs. 14, 15, 16 e 17). Essa alteração foi observada com apenas 20 minutos após a inoculação do veneno de *M. frontalis* (Fig. 14)



Figura 14. Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) apresentado pelo animal 1 do grupo veneno após 20 min da administração do veneno de *M. frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.

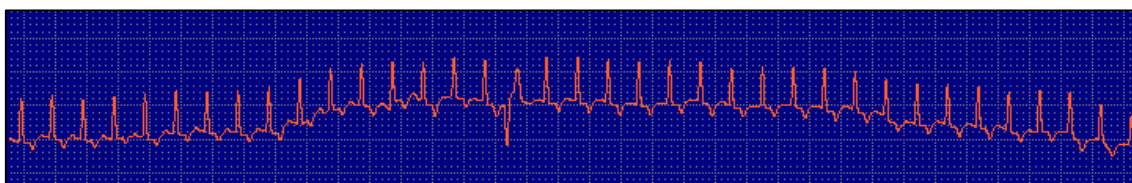


Figura 15. Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) apresentado pelo animal 6 do grupo veneno após 34 min da administração do veneno de *M. frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.

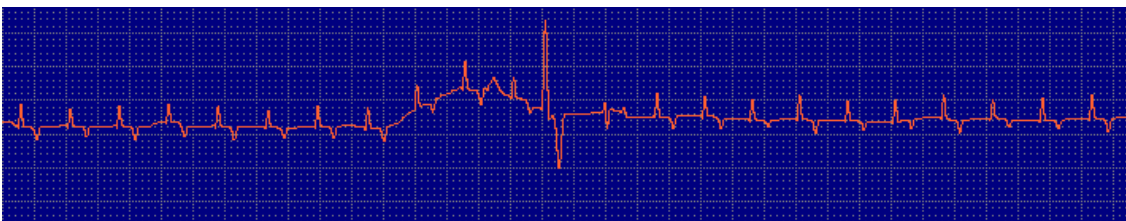


Figura 16. Extrassístole ventricular (ou complexo ventricular prematuro) apresentado pelo animal 4 do grupo veneno após 37 min da administração do veneno de *M. frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.

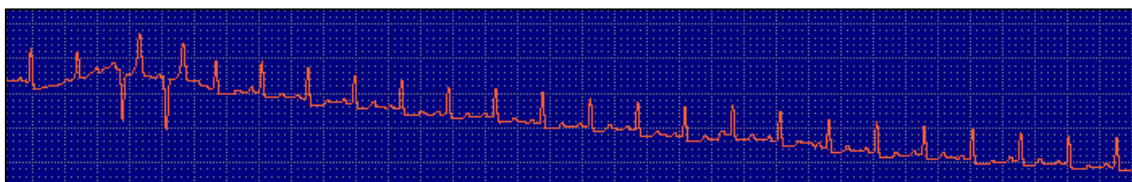


Figura 17. Extrassístoles ventriculares (ou complexo ventricular prematuro) apresentado pelo animal 2 do grupo veneno após 45 min da administração do veneno de *M. frontalis*. Derivação D2, 25 mm/s, N.

O rápido aparecimento das extrassístoles ventriculares demonstra a ação precoce do veneno de *M. frontalis* sobre a musculatura cardíaca, também verificado pelo aumento de biomarcadores cardíacos precoces, como a troponina I e CK-MB.

Geralmente, as extrassístoles ventriculares em envenenamentos, estão associadas a danos nas fibras musculares cardíacas pela atividade miotóxica e pelo comprometimento da perfusão dos tecidos cardíacos. Neste experimento, o veneno de *M. frontalis* apresentou evidente atividade cardiotoxica, com aumento da troponina I. Essa cardiotoxicidade pode ser explicada pela presença das frações 3FTx e PLA₂ presentes no veneno de *M. frontalis*. Ressalta-se que a cardiotoxina, fração que faz parte da toxina 3FTx, atua diretamente na membrana plasmática dos cardiomiócitos, rompendo-a, além da ação da PLA₂ que atuam diretamente no sarcolema, levando a um aumento da concentração de cálcio citosólico e, conseqüentemente, uma hiperconcentração dos microfilamentos, causando danos mitocondriais e a ativação de fosfolipases dependentes de cálcio (Gutierrez et al., 1983; Arroyo et al., 1987; Mebs, 1990; Moreira et al., 2010).

A presença de extrassístoles ventriculares também foi descrita por Reis (2017), no envenenamento experimental por *M. surinamensis*, que relatou outras arritmias cardíacas como os bloqueios atrioventriculares de I, II e III grau, as quais não foram observadas nos animais envenenados por *M. frontalis*.

5.4 Ecocardiograma

Para a realização do ecodopplercardiograma das cobaias realizou-se um aperfeiçoamento e adaptação da técnica, pois não existem publicações, nem valores de normalidade para o ecodopplercardiograma nessa espécie. As figuras 18, 19, 20, 21,22, 23 e 24 demonstram imagens e medidas de normalidade para a cobaia.

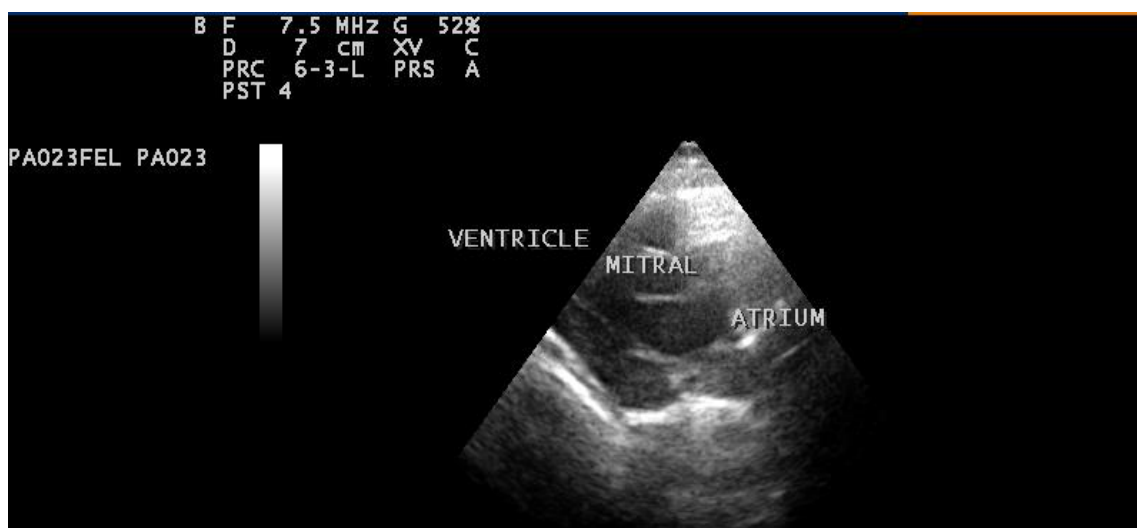


Figura 18. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus*, realizando o corte paraesternal longitudinal, visualizando-se o septo interventricular, valva mitral e os folhetos septal e parietal, átrio esquerdo e ventrículo esquerdo.

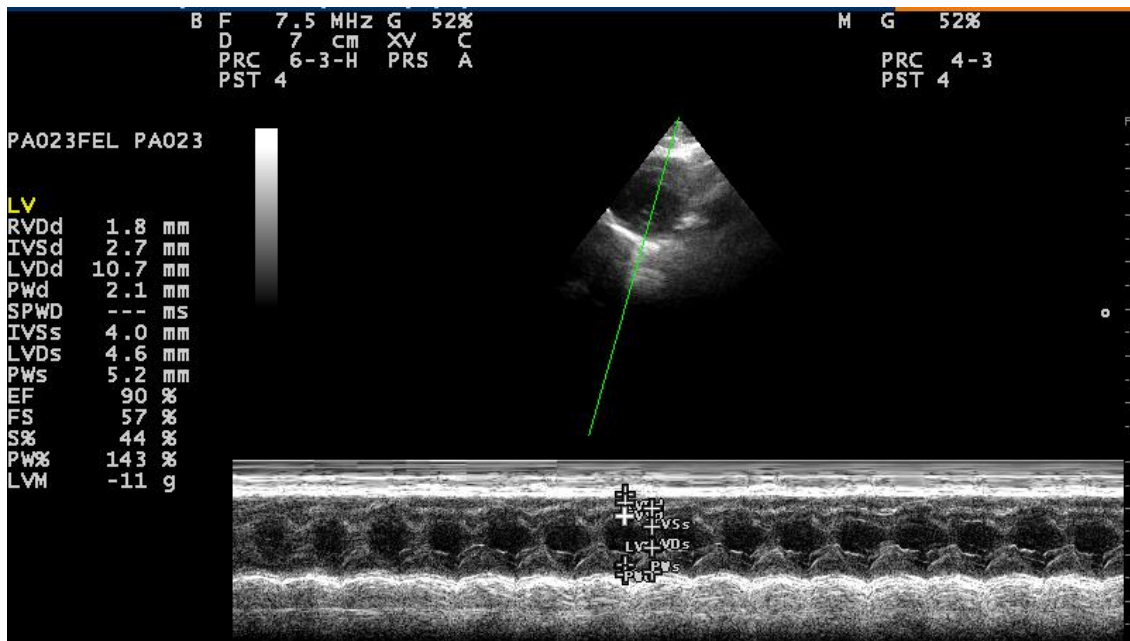


Figura 19. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus*, realizando-se modo M no corte paraesternal do ventrículo esquerdo, ao nível dos músculos papilares, o septo interventricular aparecerá na parte superior do monitor, o músculo papilar póstero-medial à esquerda e o ântero-lateral à direita, enquanto que a parede livre do ventrículo esquerdo, na região inferior do monitor.

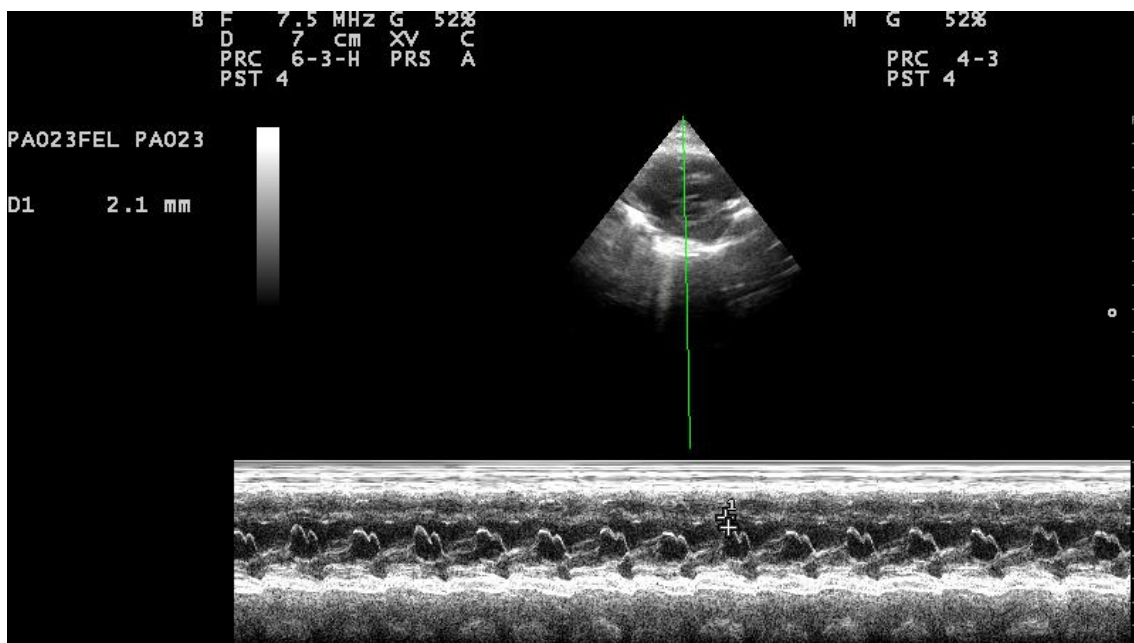


Figura 20. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus*, realizando-se modo M no corte paraesternal do ventrículo esquerdo, ao nível da valva mitral para mensurar a distância do ponto E do ao septo interventricular.



Figura 21. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus*, realizando-se corte paraesternal transversal ao nível da valva aórtica para avaliar a relação átrio esquerdo/aorta.

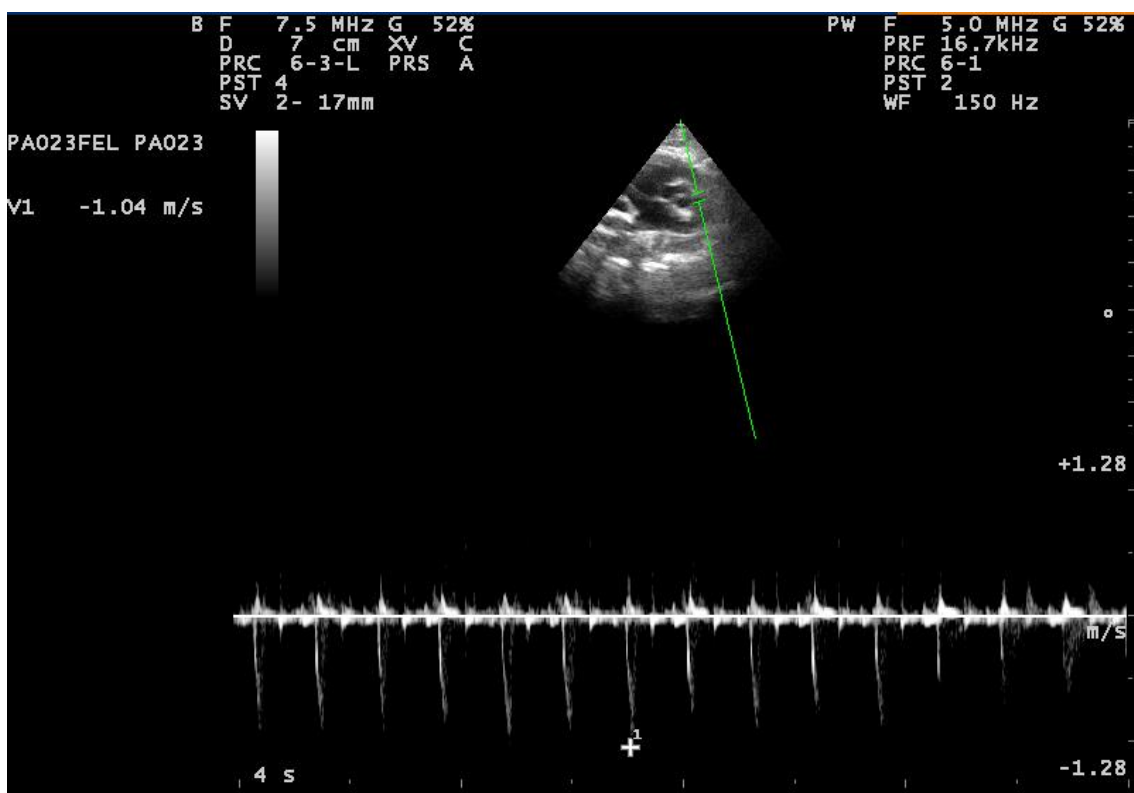


Figura 22. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus*, realizando-se corte paraesternal transversal ao nível da valva aórtica para avaliar com o doppler pulsado o fluxo pulmonar.

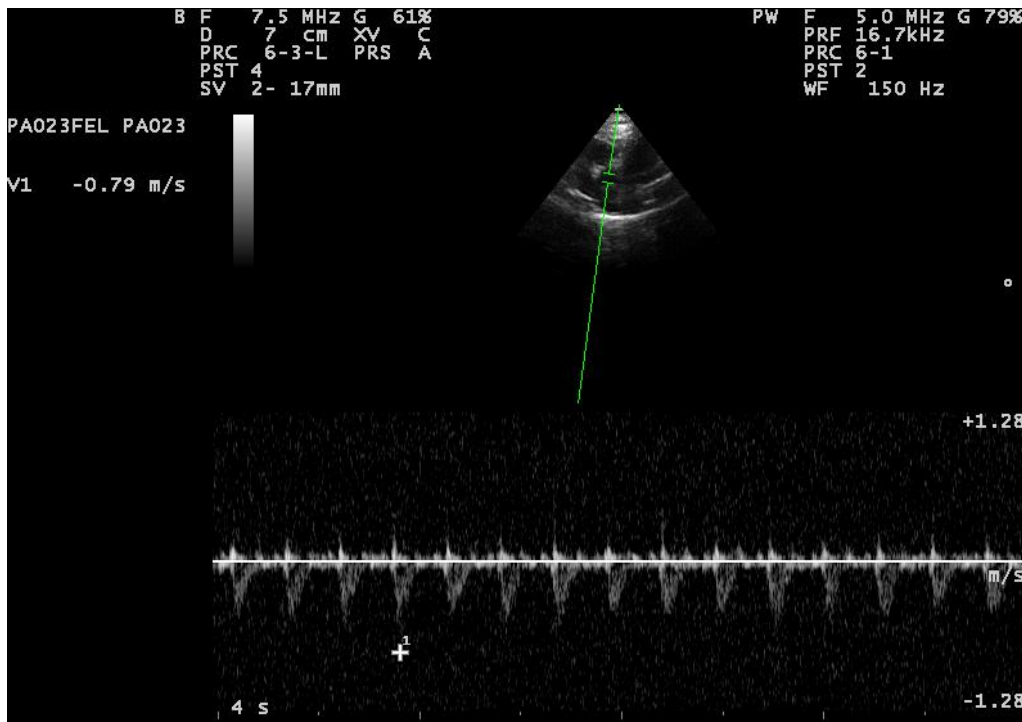


Figura 23. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus*, realizando-se corte apical cinco câmaras para avaliar por doppler pulsado o fluxo aórtico.

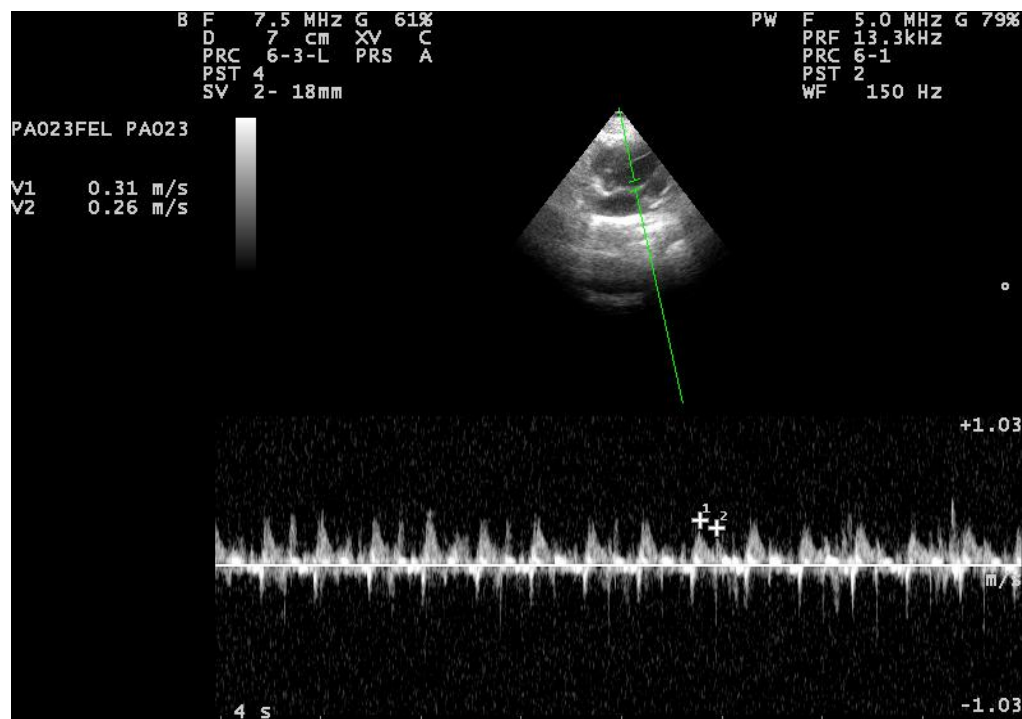


Figura 24. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus*, realizando-se corte apical cinco câmaras para avaliar por doppler pulsado onda E e onda A da valva mitral.

A Tabela 15 demonstra os valores ecocardiográficos de cobaias no tempo zero e duas horas após o envenenamento por *M. frontalis*.

Tabela 15: Média e desvio padrão de medidas do septo interventricular em sístole e diástole, cavidade do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, parede livre do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, fração de encurtamento, fração de ejeção, distância do ponto E ao septo, átrio esquerdo, aorta, relação átrio esquerdo/aorta, pico de velocidade da onda E mitral, pico de velocidade da onda A mitral, relação onda E/A, pico de velocidade do fluxo aórtico e pico de velocidade do fluxo pulmonar de cobaias, antes T0 (Tempo zero) e 2h TF (Tempo Final) após a inoculação de veneno *Micrurus frontalis* (grupo veneno) e PBS/BSA (grupo controle)

Parâmetros	Momentos	Grupos/desvio padrão	
		Veneno	Controle
Septo D (mm)	T0	2,71±0,33	2,55±0,53
	TF	2,86±0,60	2,75±0,32
Cavidade Vent. E/D (mm)	T0	7,68±1,51	7,20±0,91
	TF	7,11±1,69	6,98±0,24
Parede Vent. E/D (mm)	T0	2,93±0,68	3,15±0,76
	TF	3,20±0,64	3,13±0,26
Septo S (mm)	T0	3,75±0,48	3,66±0,47
	TF	3,93±0,92	3,45±0,38
Cavidade Vent. E/S (mm)	T0	3,86±0,40 A	3,65±0,56
	TF	4,55±1,41 B	3,38±0,29
Parede Vent. E/S (mm)	T0	4,48±0,54 A	4,26±0,74
	TF	3,58±0,79 B	4,15±0,61
Fração Encurtamento (%)	T0	49,16±4,44 A	49,83±3,16
	TF	37,16±10,59 B, a	51,50±4,67 b
Fração Ejeção (%)	T0	85±30,53 A	85±2,42
	TF	71±12,84 B, a	86±3,38 b
Distância E (mm)	T0	1,27±0,56	1,23±0,28
	TF	1,35±0,25	1,21±0,27
Átrio E (mm)	T0	5,93±0,31	6,0±0,40
	TF	6,18±0,79	5,90±0,33
Aorta (mm)	T0	5,46±0,39 A	5,18±0,33
	TF	4,65±0,23 B, a	5,18±0,17 b
Relação AE:Ao	T0	1,09±0,10 A	1,16±0,09
	TF	1,33±0,16 B, a	1,14±0,05 b
Onda E Mitral (m/s)	T0	0,72±0,27 A	0,82±0,20
	TF	0,55±0,21 B	0,81±0,21
Onda A Mitral (m/s)	T0	0,42±0,14 A	0,49±0,16
	TF	0,66±0,27 B	0,55±0,11
Relação onda E/A	T0	1,71±0,46 A	1,72±0,26
	TF	0,92±0,45 B, a	1,44±0,14 b
Fluxo Aorta (m/s)	T0	0,82±15,83	0,87±13,48
	TF	0,95±52,85	0,85±11,03
Fluxo Pulmonar (m/s)	T0	1,04±0,17 A	1,13±0,16
	TF	1,88±0,11 B, a	1,13±0,08 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 $p < 0,05$.

Ao realizar o ecodopplercardiograma das cobaias, no modo M, no corte paraesternal do ventrículo esquerdo, ao nível dos músculos papilares no tempo zero (T0) e duas horas após de envenenamento de *M. frontalis* (no tempo final), verificou-se um aumento da cavidade do ventrículo esquerdo, uma diminuição da espessura da parede livre do ventrículo esquerdo, e, conseqüentemente, uma diminuição da fração de encurtamento de 24,4% (Fig. 25). Também, observou-se uma diminuição da fração de ejeção cardíaca, justificando a ação inotrópica negativa do veneno de *M. frontalis* sobre a musculatura cardíaca. O efeito inotrópico negativo, com diminuição da contratilidade cardíaca e o seu potencial de ação, em gatos envenenados pelo veneno de *M. fulvius* foi descrito por Weis e Mcisaac (1971).

A fração 3FTx do veneno das *Micrurus* é composta por várias proteínas biologicamente ativas, dentre elas temos as calciseptinas que são antagonistas dos receptores de cálcio tipo L (Kini, 2002). Sabe-se que potencial de ação cardíaco exibe um “platô” de várias centenas de milissegundos de duração com posterior despolarização rápida inicial. É durante esse platô que os canais de cálcio dependente voltagem tipo L são importantes, pois permitem a entrada de cálcio²⁺ no interior da célula. Essa entrada de cálcio inicial é que ativa os receptores de rianodina (RyR) para a liberação de cálcio²⁺ pelo retículo sarcoplasmático. Esse processo fisiológico denominado de amplificação de cálcio induzida por cálcio é o que permite a indução da contração cardíaca (Bers, 2001, Rang et al., 2004; Bodi et al., 2005).

Como as calciseptinas bloqueiam os receptores de cálcio dependente voltagem tipo L, ocorre relaxamento da musculatura e diminuição da contração cardíaca como descrito por Weis e Mcisaac, (1971) em gatos envenenados por *M. fulvius* e em cobaias envenenadas por *M. frontalis*, verificado nesta pesquisa.

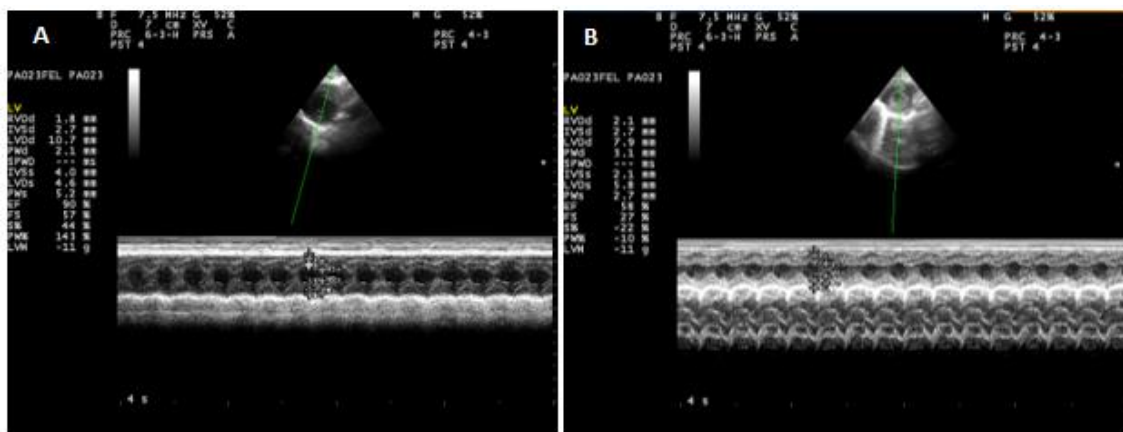


Figura 25. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus* no envenenamento por *M. frontalis* no tempo zero (Figura A) – A e tempo final (Figura B), duas horas após, realizando-se modo M no corte paraesternal do ventrículo esquerdo, ao nível dos músculos papilares, demonstrando a diminuição da fração de encurtamento e fração de ejeção no envenenamento.

Quando se compara a composição do veneno de *M. frontalis* com a de *M. fulvius*, verifica-se que a fração 3FTx é maior quantitativamente que a PLA₂ na *M. frontalis*, entretanto a fração PLA₂ é maior quantitativamente que a fração 3FTx na *M. fulvius* (Lomonte et al., 2016). Como as calciseptinas encontram-se na fração 3FTx (Kini, 2002), há uma maior probabilidade do veneno de *M. frontalis* ter uma atuação inotrópica negativa na musculatura cardíaca, mais efetiva que a *M. fulvius*.

Outras proteínas importantes do veneno de *M. frontalis* presentes na fração 3FTx são as α -neurotoxinas, as quais são antagonistas colinérgicos (Paterson e Nordberg, 2000; Tu et al. 2002). O sistema nervoso parassimpático é o responsável pela modulação da atividade cardíaca através na inervação do coração pelo nervo vago (Levy, 1977), o qual libera acetilcolina. Esse neurotransmissor liga-se ao seu receptor muscarínico (M2) que é acoplado a uma proteína Gi, promovendo a inibição da atividade da ciclase de adenilil, reduzindo os níveis de AMPc e, conseqüentemente, exerce uma atividade inotrópica negativa (Levy, 1977; Rang, 2004).

Espera-se que as α -neurotoxinas antagonistas colinérgicos causem um efeito inotrópico positivo, pois bloqueiam a atividade do sistema nervoso parassimpático no coração (Paterson e Nordberg, 2000; Tu et al. 2002). Entretanto essa atividade inotrópica positiva não foi verificada no presente estudo com *M. frontalis*, nem relatado por Weis e Mcisaac (1971) com o veneno de *M. fulvius*. Provavelmente, as α -neurotoxinas provocam um efeito inotrópico positivo no coração. Contudo, o efeito inotrópico negativo das calciseptinas deve anular esse efeito positivo se sobressaindo, verificando-se apenas um efeito negativo do veneno de *M. frontalis*.

Observou-se no ecodopplercardiograma outras alterações significativas ($p < 0,05$), como a diminuição do diâmetro da aorta e o aumento da velocidade do fluxo pulmonar (Fig. 26), sugerindo uma diminuição do diâmetro da artéria pulmonar (Boon, 2011).

A vasoconstricção observada na artéria pulmonar e na artéria aórtica pode estar associada a uma resposta do sistema nervoso simpático, frente à hipotensão causada pelo veneno de *Micrurus*, como descrito por Weis e Mcisaac, (1971) no estudo com *M. fulvius*. A hipotensão pode ser explicada pela diminuição da contração cardíaca, ocorrendo conseqüentemente, uma diminuição da pós-carga, levando à uma vasoconstricção reflexa para a manutenção da pressão arterial sistêmica (Guyton e Hall, 1998).

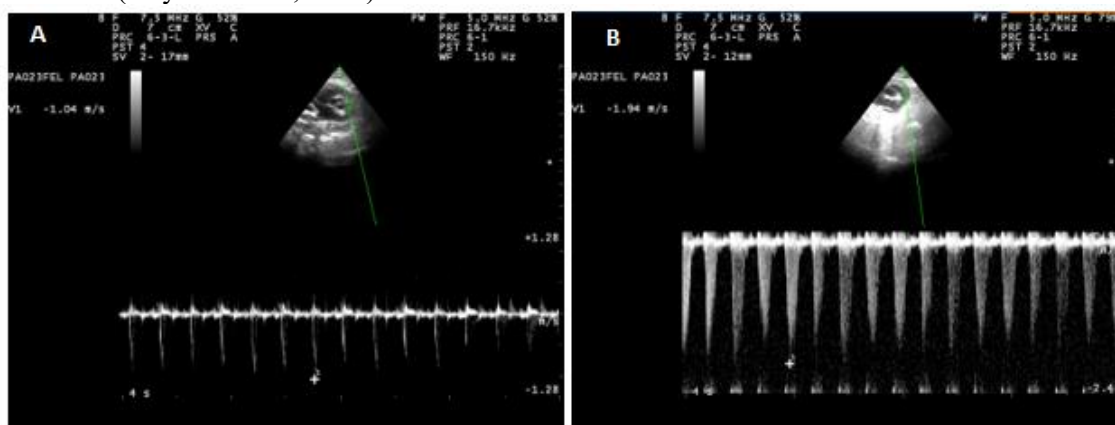


Figura 26. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus* no envenenamento por *M. frontalis* no tempo zero (figura A) e tempo final (figura B), duas horas após, realizando-se corte paraesternal transversal ao nível da valva aórtica para avaliar com o doppler pulsado o fluxo pulmonar

Na avaliação do fluxo transmitral em via de entrada de ventrículo esquerdo verificou-se uma diminuição da relação da onda E:A devido a uma diminuição da onda E e um aumento da onda A no tempo final (TF) dos animais envenenados com *M. frontalis* (Fig. 27).

As ondas E e A, que representam, respectivamente, a fase de enchimento rápido (E) e a fase de contração atrial (A), separadas pelo período de diástase. Em indivíduos jovens normais existe uma tendência a se encontrar ondas E relativamente maiores que a onda A (Bonn, 2011).

Nos animais envenenados com *M. frontalis* foi observado uma diminuição da fração de encurtamento, o que reduziu a pós carga cardíaca e, conseqüentemente, causou alterações na pré-carga cardíaca, até uma estabilização do organismo. As variações de carga cardíaca apresentam sensível influência no padrão de fluxo transmitral, sobretudo a pré-carga, a qual parece ter grande influência na onda E. Foi demonstrado que administração de nitroglicerina provoca diminuição do pico de velocidade da onda E. Desta forma, observa-se que a hipotensão leva à uma redução da velocidade de pico da onda E (Choong et al., 1998).

Outra alteração observada nos animais envenenados foi o padrão respiratório. Existem alterações fisiológicas da pressão intratorácica que ocorrem durante a respiração, entretanto, os animais estavam apresentando angustia respiratória devido a paralisia flácida da musculatura do diafragma caudado pelas α -neurotoxinas (Kini, 2002). Desta forma essa respiração patológica pode ter levado a alterações no fluxo transmitral, pois durante a inspiração, com a diminuição da pressão intratorácica, pode ocorrer a diminuição da relação E:A, devido à redução de pré-carga, diminuindo o componente de enchimento rápido (onda E) (Diabestani et al., 1988, Rigg e Snider, 1989).

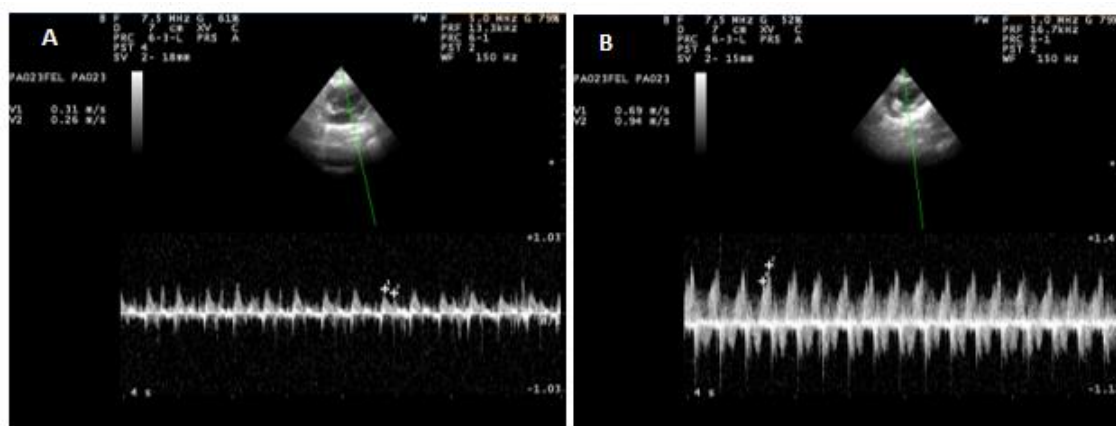


Figura 27. Ecodopplercardiograma de *Cavia porcellus* no envenenamento por *M. frontalis* no tempo zero (figura A) e tempo final (figura B), duas horas após: corte para avaliação do fluxo transmitral em via de entrada de ventrículo esquerdo, no qual verificou-se uma diminuição da relação da onda E:A no tempo final (TF) comparado com o tempo zero (T0).

5.5 Avaliação anatomopatológica

5.5.1 Microscopia óptica

Realizou-se microscopia óptica do coração, rim, fígado e pulmão do grupo controle e dos animais envenenados.

Na avaliação do coração (Fig. 28 e 29), observou-se em 100% dos animais envenenados, presença de discreta congestão multifocal e discreta hiper-eosinofilia multifocal das fibras cardíacas, sugerindo um processo degenerativo. Também foram visualizados vacúolos intracitoplasmáticos, citoplasma rarefeito multifocal discreto, além da presença de imagem de área normal com fibras longitudinais.

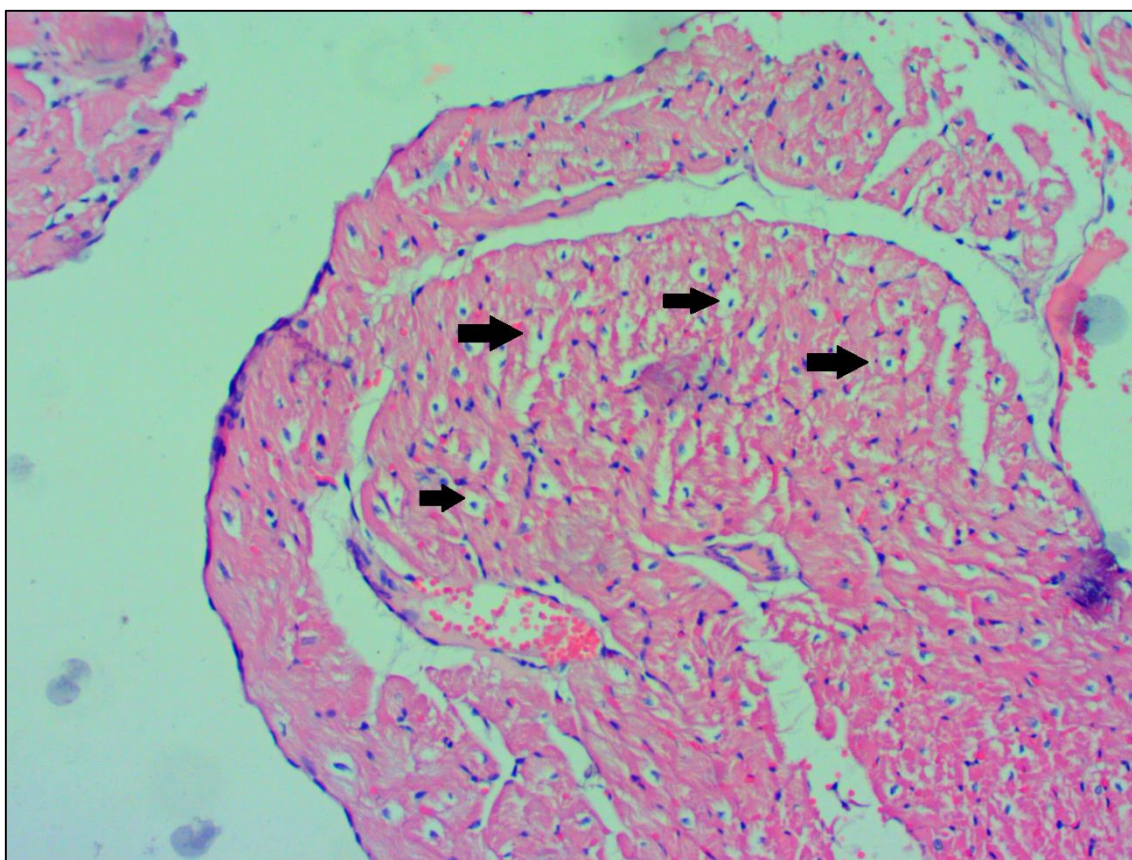


Figura 28. Secção histológica de tecido muscular esquelético cardíaco, região de músculo papilar, de *Cavia porcellus* (animal 6) após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*, setas indicam presença de vacúolos intracitoplasmáticos multifocais moderados (Aumento 200x).

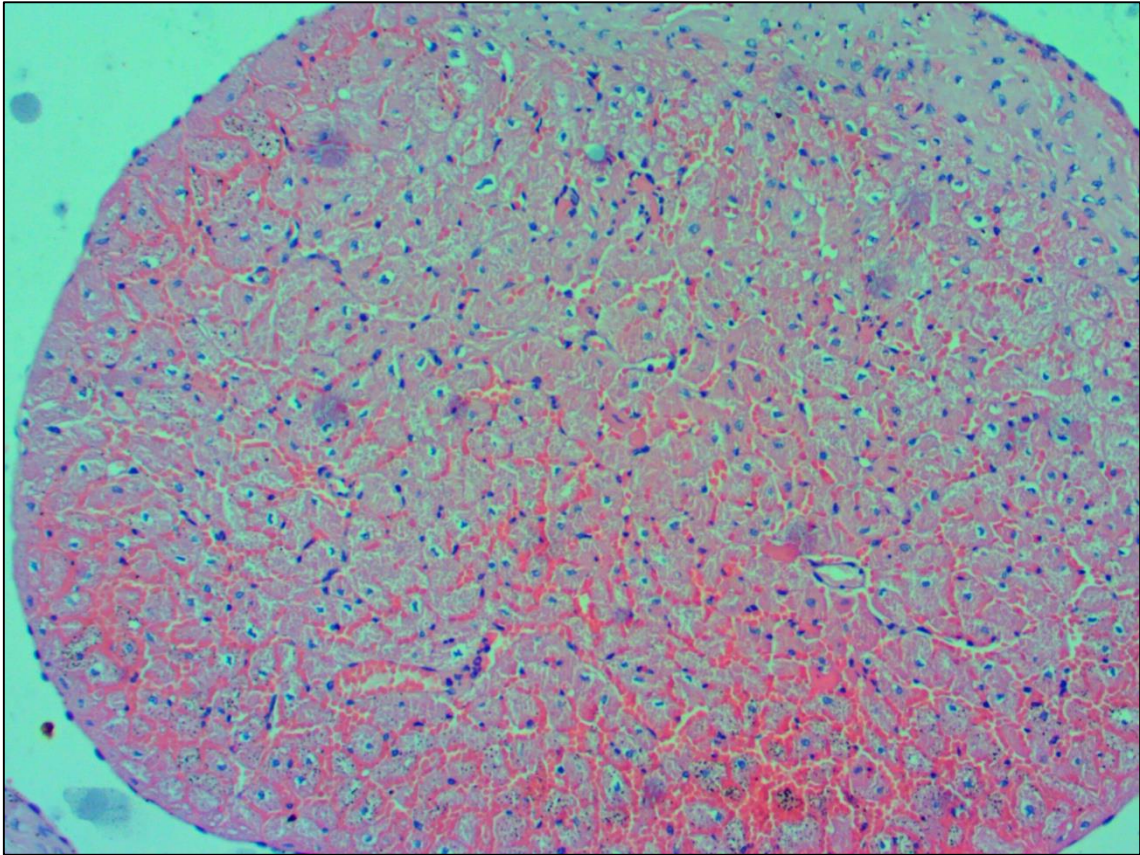


Figura 29. Secção histológica de tecido muscular esquelético cardíaco, região de músculo papilar, de *Cavia porcellus* (animal 6) após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*, observando congestão multifocal moderada. (Aumento 100x).

A presença de vacúolos intracitoplasmáticos multifocais moderados em região papilar é um indicativo de degeneração miocárdica, o que corrobora com o aumento de troponina I e CK-MB nos animais envenenados. A lesão inicial em região papilar, deve-se ao fato de ser o local de maior tração e desgaste cardíaco, sendo o primeiro local a apresentar sinais de degeneração devido a cardiotoxicidade do veneno de *M. frontalis*.

Na avaliação microscópica do fígado não foi observada nenhuma alteração digna de nota. Entretanto, na avaliação do rim (Fig.30), verificou-se discreta congestão multifocal; discreta presença de material basofílico intratubular (túbulos proximais), sugestivo de proteinúria, além da presença de vacúolos intracitoplasmáticos nos túbulos proximais, próximo da borda da lesão, em 50% dos animais envenenados.

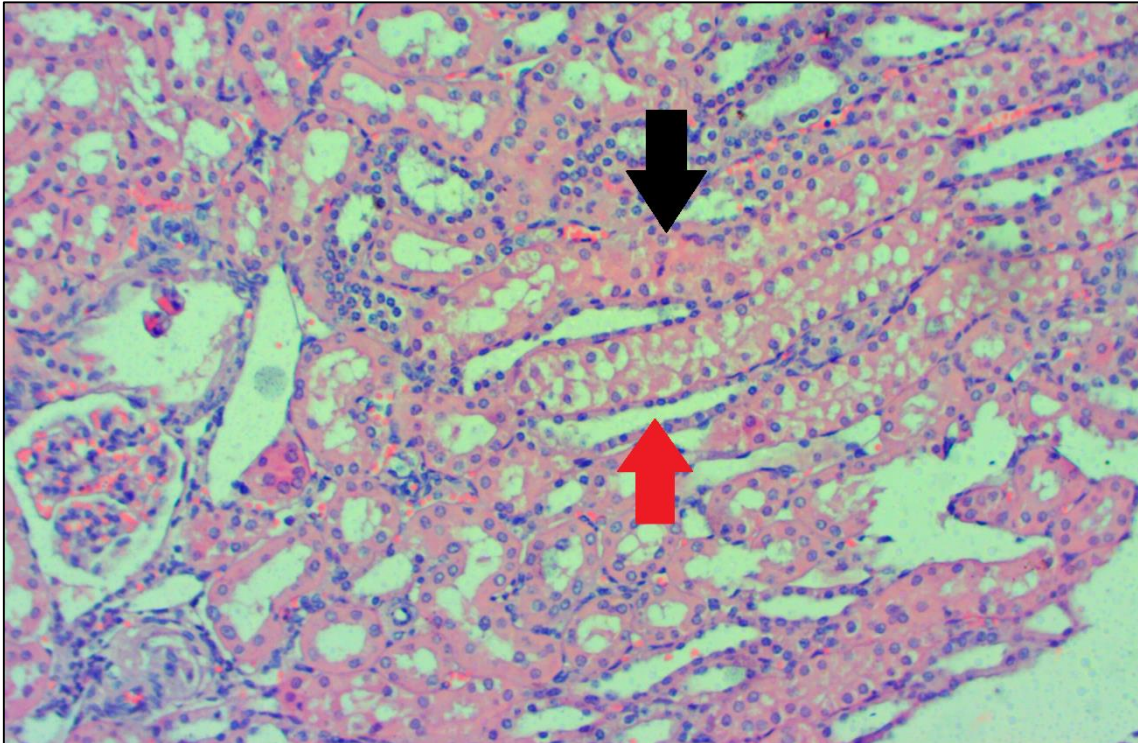


Figura 30. Secção histológica de rim de *Cavia porcellus* após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Seta preta indicando a presença de material amorfo eosinofílico intratubular em túbulos proximais multifocal discreto. Seta vermelha indicando a presença de vacúolos intracitoplasmáticos de túbulos proximais multifocal moderado (Aumento 200x).

A congestão venocapilar verificada no rim e no coração são sinais da insuficiência cardíaca ocasionada pelo veneno da *M. frontalis*, como observado na avaliação da função cardíaca no ecocardiograma com a redução da fração de encurtamento e da fração de ejeção, consequentemente há uma congestão generalizada.

A presença de material amorfo eosinofílico intratubular em túbulos proximais multifocal discreto e a presença de vacúolos intracitoplasmáticos de túbulos proximais é sugestivo de proteinúria e degeneração renal. Desta forma, há sinais iniciais de injúria renal aguda sem alteração significativa de uréia e creatinina até duas horas após o envenenamento de *M. frontalis*.

Nas secções histológicas do pulmão (Fig.31) foi verificado em 100% dos animais envenenados, presença de material eosinofílico amorfo intra-alveolar focalmente discreto, sugestivo de edema pulmonar focal.

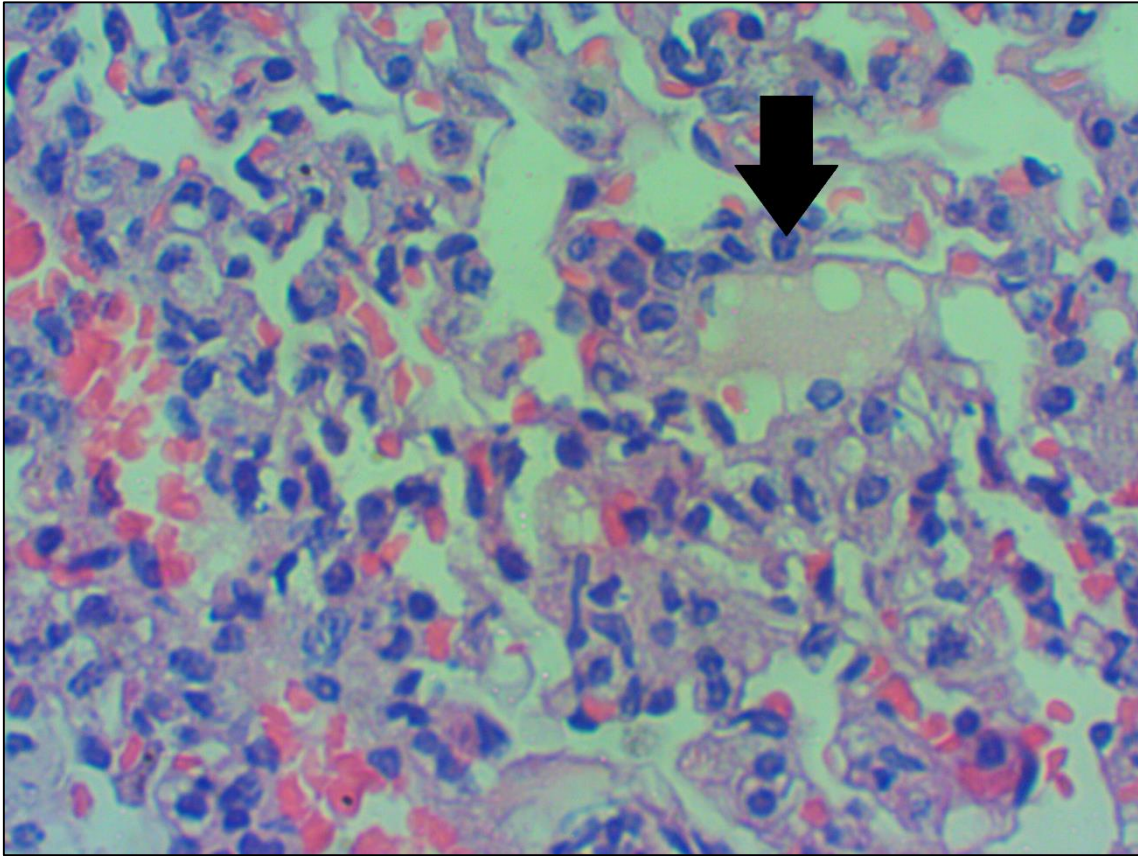


Figura 31. Secção histológica do pulmão de *Cavia porcellus* após inoculação de veneno da serpente *Micrurus frontalis*. Seta preta indicando a presença de material basofílico intra-alveolar multifocal discreto, sugestivo de edema pulmonar (Aumento 400x).

A presença de material basofílico intra-alveolar multifocal discreto é sugestivo de edema pulmonar devido a insuficiência cardíaca esquerda e paralisia da musculatura respiratória, ocasionada pelo veneno de *M. frontalis*. A insuficiência cardíaca esquerda ocasiona a congestão pulmonar e conseqüentemente o edema pulmonar agudo.

5.5.2. Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 32) foi realizada para confirmar a presença de lesão cardíaca nos animais envenenados, pois os mesmos apresentaram aumento significativos de troponina I, o que é indicativo de lesão cardíaca aguda (Adams et al. 1993, Bodor et al. 1995, Thygesen, 2007).

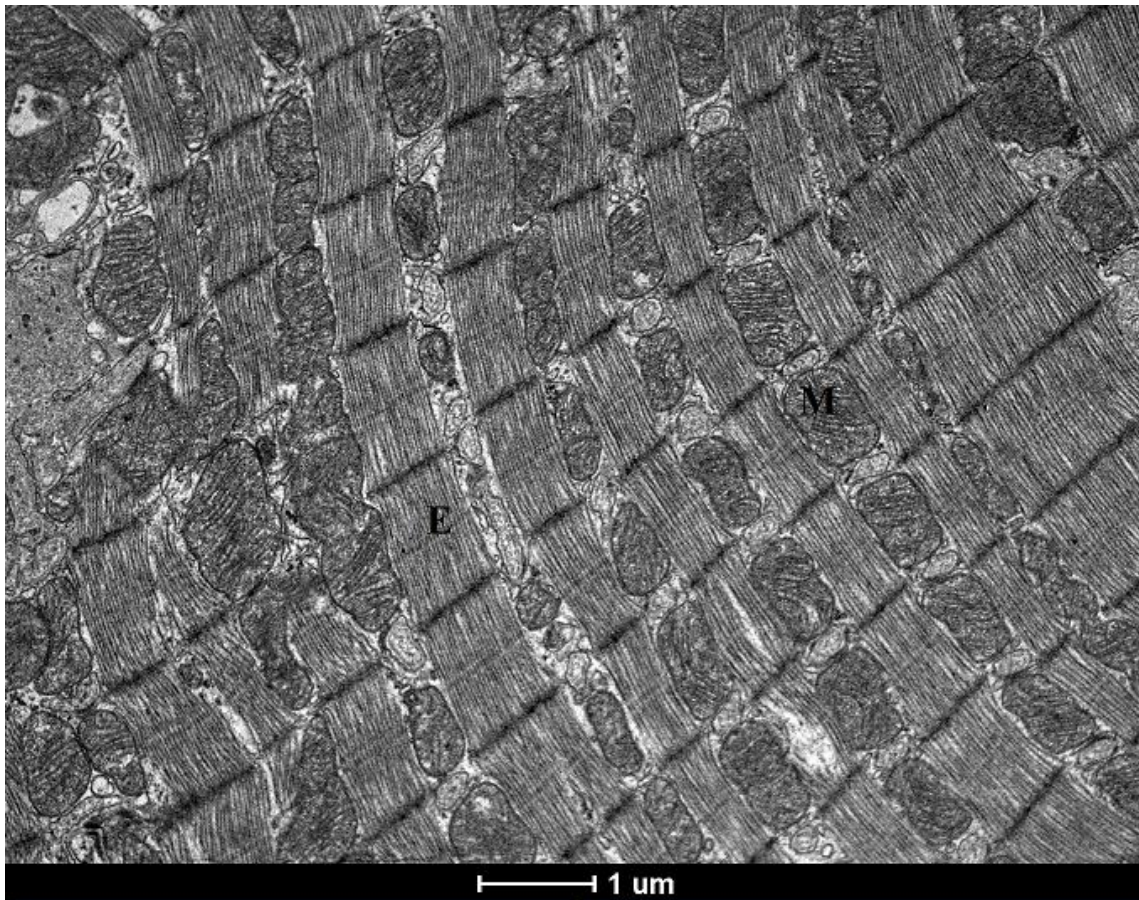


Figura 32. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo controle. Amostra controle: destaque para as estriações (E) e a alternância entre filamentos e mitocôndrias (M) ricas em cristas e intensamente elétrons-densas. Verifica-se a presença de continuidade entre as fibras cardíacas e as estruturas mitocondriais preservadas.

Na avaliação microestrutural das fibras esqueléticas cardíacas dos animais envenenados observou-se perda de continuidade das fibras (Figs. 33 e 34), presença de ruptura da membrana mitocondrial (Fig. 35) e mitocôndrias tumefeitas sem definição de cristas e pouco elétrons-densas (Figs. 36 e 37). Esses achados microestruturais também foram descritos por Reis, (2017) no envenenamento de *M. surinamensis*, corroborando os resultados do presente estudo.

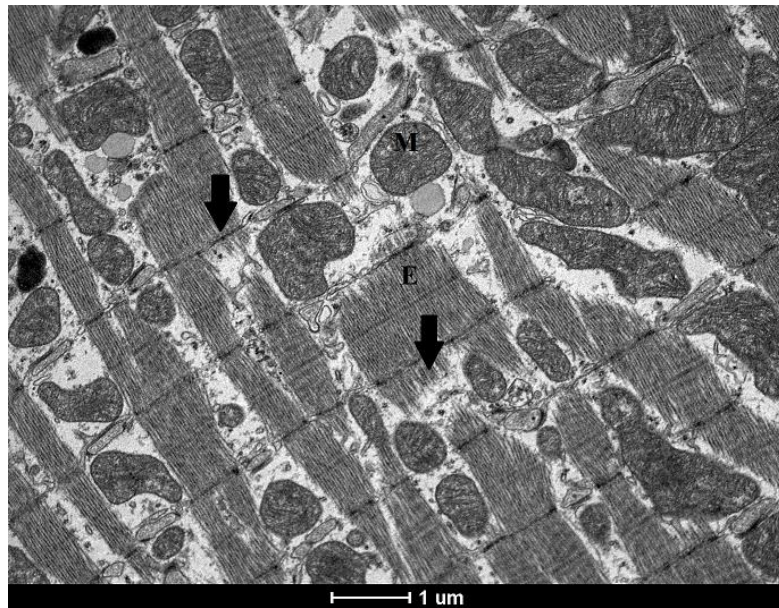


Figura 33. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo animais envenenados. Setas: evidencia-se a perda de continuidade das fibras esqueléticas cardíacas. E – fibras esqueléticas cardíaca. M – mitocôndria preservada.

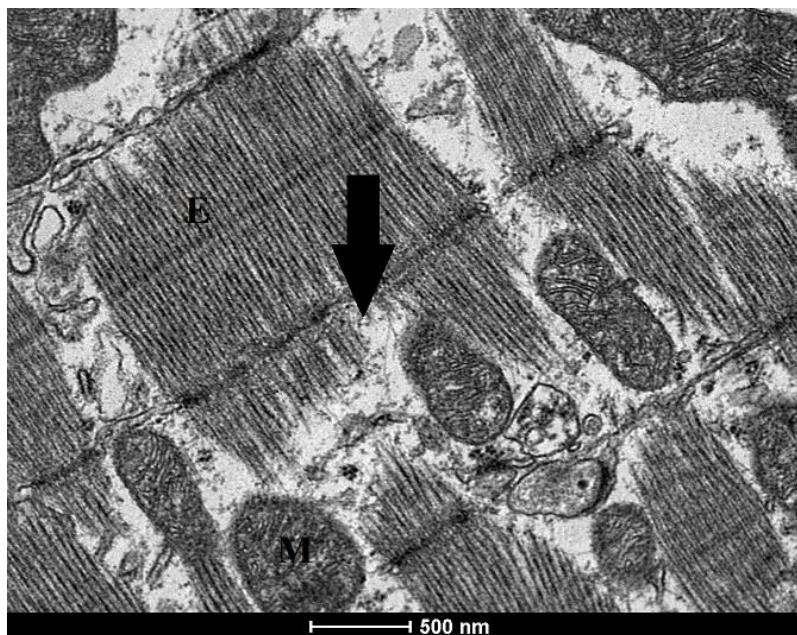


Figura 34. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo animais envenenados. Seta: evidencia-se a perda de continuidade das fibras esqueléticas cardíacas. E – Fibras esqueléticas cardíaca.

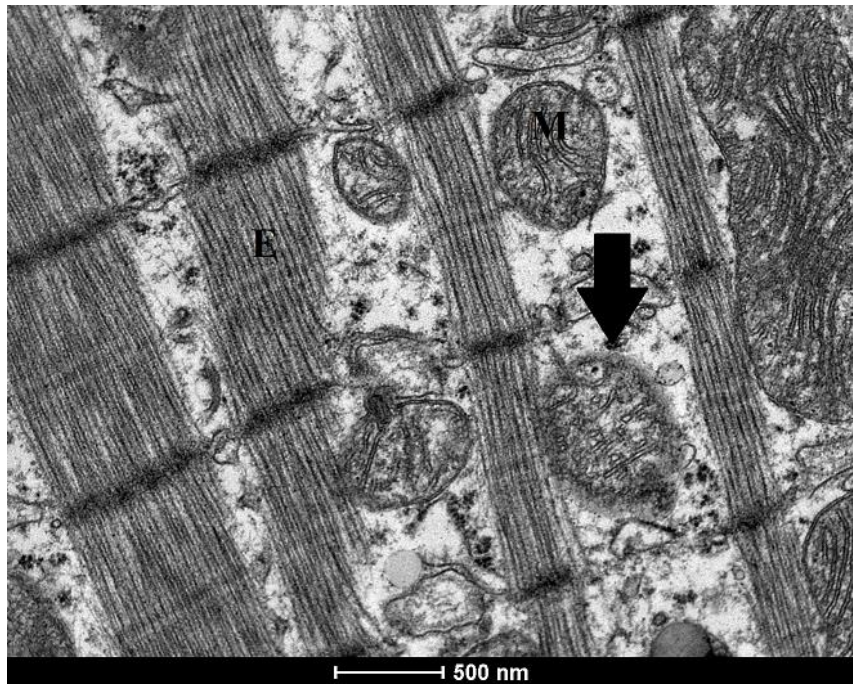


Figura 35. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo animais envenenados. Seta: verifica-se a ruptura da membrana mitocondrial. E – Fibras esqueléticas cardíaca. M – Mitocôndria preservada.

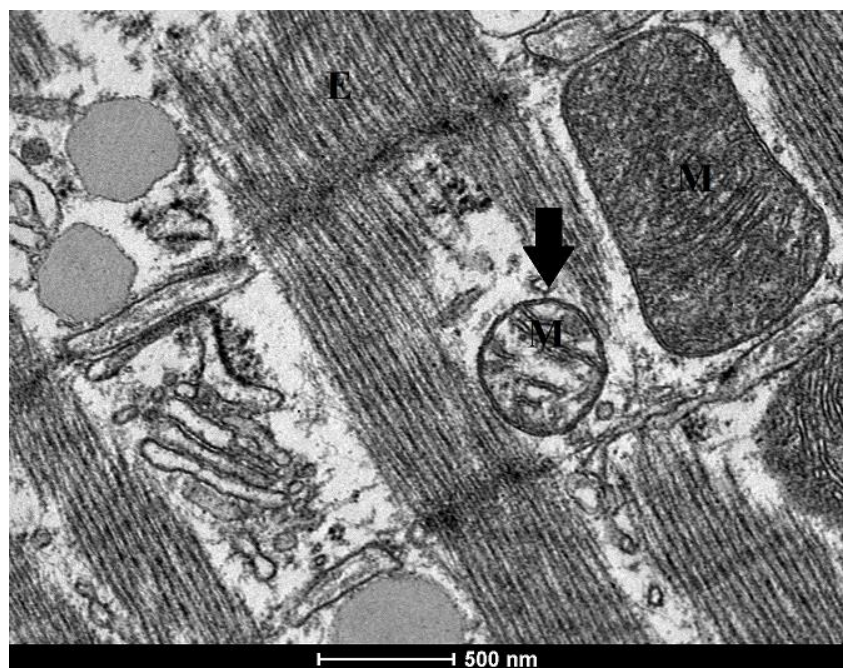


Figura 36. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo animais envenenados. Seta: observa-se mitocôndria tumefeita, sem definição de cristas e pouco elétron-densas. E – Fibras esqueléticas cardíaca. M – Mitocôndria preservada.



Figura 37. Micrografia eletrônica de transmissão de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo animais envenenados. Seta: observa-se mitocôndria tumefeita, sem definição de cristas e pouco elétron-densas. E – Fibras esqueléticas cardíaca. M – Mitocôndria preservada.

Na avaliação microestrutural das fibras esqueléticas cardíacas verificou-se lesão cardíaca evidente, demonstrando que o veneno da *M. frontalis* é capaz de lesionar as fibras musculares cardíacas em apenas duas horas de envenenamento, o que não foi possível verificar com a microscopia óptica. Desta forma, a lesão cardíaca evidenciada corrobora os resultados do perfil bioquímico cardíaco com a elevação de CK-MB e troponina I.

Diante deste contexto, fica clara a ação cardiotóxica do veneno de *M. frontalis* demonstrada pela primeira vez neste experimento.

6. CONCLUSÕES

Cobaias inoculadas com veneno da *Micrurus frontalis* manifestaram rápida sintomatologia clínica com paralisia flácida dos membros anteriores e posteriores, fasciculações, respiração restritiva e de padrão costo-abdominal, midríase pupilar irresponsiva à luz e secreção translúcida ocular, progredindo para o estado comatoso.

O veneno da *Micrurus frontalis* possui ação arritmogênica, direta e rápida no sistema cardiovascular de cobaias, causando arritmias cardíacas do tipo extrassístoles ventriculares, comprovadas pelos aumentos de troponina I, da enzima CK-MB, AST e LDH.

O veneno da *M. frontalis* apresenta uma ação inotrópica negativa no coração de cobaias, com uma redução de aproximadamente 25% da fração de encurtamento.

O perfil sanguíneo de cobaias inoculadas com veneno da *Micrurus frontalis* mostrou alterações como discreta leucocitose, diminuição do tempo de protrombina (TP) e de D-dímeros.

A microscopia óptica, observou-se no coração presença de congestão multifocal discreta; hiper-eosinofilia das fibras cardíacas multifocal discreta sugestivo de degeneração; presença de vacúolos intracitoplasmáticos e citoplasma rarefeito multifocal discreto mais visualizadas nas bordas do músculo papilar e congestão focalmente extensa moderada em região de fragmento de músculo papilar.

A avaliação microestrutural das fibras esqueléticas cardíacas de cobaias inoculadas com veneno de *Micrurus frontalis* revelou perda de continuidade das fibras, presença de ruptura da membrana mitocondrial e mitocôndrias tumefeitas sem definição de cristas e pouco elétrondensas.

7. PERSPECTIVAS

Este presente estudo abre caminhos para novas pesquisas no campo da toxicologia cardiovascular e farmacodinâmica do veneno de *Micrurus frontalis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.E.; BODOR, G.S.; DÁVILA-ROMÁN, V.G. et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*, v.88, n.1, p.101-6. 1993.

AIRD, S.D.; JORGE DA SILVA JR, N. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.99, n.2, p. 287-294. 1991.

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.

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, n.7, p.851–860. 2003.

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*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 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.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, p.345-355. 1991.

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.

BERS, D. M. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, 2 ed. Holanda: Kluwer Academic, 2001.

BERTINCHANT, J.P. LARUE, C. PERNEL, I. et al. – Interet du dosage de la troponine humaine dans le diagnostic de l'infarction aigu du myocarde. *Archives des Maladies Du Couer Et Des Vaisseaux*, v.89, p.63-68. 1996.

BODI, I.; MIKALA, G.; KOCH, S. E. et al. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115, n. 12, p. 3306-3317. 2005.

BODOR, G.S.; PORTERFIELD, D.; VOSS, E.M. et al. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clinical Chemistry*, v.1, n.12, p. 1710-1715. 1995.

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.

BOON, J. A. *Veterinary Ecocardiography*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley – Blackwell. 2011.

BRADLEY, K.N. Muscarin toxins from the green mamba. *Pharmacology & Therapeutics*, v.85, n.2, p.87-109, 2000.

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.

BRITTON, C.V.; HERNANDES, A.; ROBERTS, R. Plasma creatine kinase isoenzyme determinations in infants and children – Characterization in normal patients and after cardiac catheterization and surgery. *Chest*, v.77, n.6, p.758-760. 1980.

BUCARETCHI, F.S.; CAPITANI, E.M.; VIEIRA, R.J. et al. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. *Clinical Toxicology*, v.54, n.3, p.222-234. 2016.

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, n.3, 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.; BRANDO, R.B. *Acidentes por animais peçonhentos*. 1ª. Ed. Santos, São Paulo. 1982.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.D.S.; WEN F.H. et al. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. 2 ed: Sarvier. 2009.

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.

CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*, v.76, n.5, p.515–524. 1998.

CHOONG, C.Y.; HERMANN, H.C., WEYMAN, A.E. et al. Preload dependence of Doppler derived indexes of left ventricular diastolic function in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, v.10, n.4, p.800-808. 1987.

CISCOTTO, P.H.; RATES, B.; SILVA, D.A. et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *Journal Proteomics*, v.74, n.9, 1810-1825. 2011.

CONCEA. *Diretrizes da prática de Eutanásia. Ministério da ciência, tecnologia e inovação*. Brasília/DF, 2013.

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.

DIABESTANI, A.; TAKENAKA, K.; ALLEN, B. et al. Effects of spontaneous respiration on left ventricular filling as assessed by Doppler echocardiography. *American Journal Cardiology*, v.61, n.15, p.1356. 1988.

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.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *The FEBS Journal*, v.275, n.12, p.3016-3030. 2008.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases, *Toxicon*, v.45, n.8, p.969-985, 2005.

FRANCO, F.L. Origem e diversidade das serpentes, p. 13-32. In: J.L.C. CARDOSO; F.O.S. FRANÇA; F.H. WEN; C.M.S MÁLAQUE; V. HADDAD JR (Eds). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Sarvier, FAPESP, 468p. 2003.

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.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; PORTILLA, E. et al. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon*, v.21, n.6, p.777-784. 1983.

GUYTON, A.C.; HALL, J. *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.639. 1998.

KINI, R.M. *Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism*, p.1-28, 1997.

KINI, R.N. Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology Physiology*, v.29, n.9, p.815-22. 2002.

LEE, M.S.Y. Pareiasaur phylogeny and the origin of turtles. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v.120, n.3, p.197-280. 1997.

LEVY, M.N. Parasympathetic control of the heart. *Neural Regulation of the heart*. Nova Iorque: Oxford University Press, p. 97-129. 1977.

LITTELL, R.C.; HENRY, P.R.; AMMERMAN, C.B. Statistical analysis of repeatedmeasures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*, v.76, n.4, p.12-16. 1998.

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.

MAISEL, A. B-type natriuretic peptide levels: a potencial novel "white count" for congestive heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, v.7, n.2, p.183-193. 2001.

MAISEL, A.S.; KRISHNASWAMY, P.; NOWAK, R.M. et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *The New England Journal of Medicine*, v.347, n.3, p.161-167.2002.

MANSO, D.C.; RESENER, M.C.; BAROTTO, A.M. et al. Acidente elapídico em criança: relato de caso. Resumos do III Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica, Florianópolis, 2010. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.23, p.66. 2010.

MARCINKIEWICZ, C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: Potential therapeutic implication. *Current Pharmaceutical Design*, v.11, n.7, p.815-27. 2005.

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.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their Biochemical and biological activities. *Pharmacology & Therapeutics*, v.48, n.2, p.223-236. 1990.

MEISNER, M.; TSCHAIKOWSKY, K.; PALMAERS, T. et al. Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Critical Care*, v.3, n.1, p.45-50. 1999.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Fundação Nacional de Saúde. *Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais peçonhentos*. 2. ed. Brasília: Brasil, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN*. Disponível:<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>> Datasus, acesso em dezembro de 2017.

MITRUKA, B.M.; RAWNSLEY, H.M. *Clinical Biochemical and Haematological Reference Values in Normal Experimental Animals*. Masson Pub. USA Inc., N.Y. p. 21-84. 1977.

MORAIS, H.A.; BIONDO, A.W. Distúrbios relacionados ao cloro: hiper e hipocloremia. In: DiBARTOLA, S.P. *Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais*. 3 ed. São Paulo: Roca. 2007.

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, n.1, 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)

NARINS, R.G.; HEIFTS, M.; TANNEU, R.L. Paciente com hipocalemia e hipercalemia. In: SCHRIER RW. *Manual de Nefrologia, diagnóstico e tratamento*. 3ª ed. Medsi, Rio de Janeiro, p. 51-75. 1993.

NETO, D.M. In: FEITOSA, F.L.F. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. São Paulo, Ed. Roca, 2 ed. p.201-245. 2008.

NIRTHANAN, S.; GWEE, M.C. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.94, n.1, p.1-17. 2004.

OGAWA, A.; SEINO, Y.; YAMASHITA, T. et al. Difference in elevation of N-terminal pro-BNP and conventional cardiac markers between patients with ST elevation vs non-ST elevation acute coronary syndrome. *Circulation Journal*, v.70, n.11, p.1372-1378. 2006.

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, n.9, p.1919-1932, 2008.

OWUSU-OFORI S.; HIRST C. Splenectomy versus conservative management for acute sequestration crises in people with sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v.31, n.5, 2013.

PATERSON, D. NORDBERG, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology*, v.61, n.1, p.75-111. 2000.

PAULA, R.C. M. F. de. *Perfil Epidemiológico dos casos de Acidentes 335 Ofídicos atendidos no Hospital de Doenças Tropicais de Araguaína – TO (Triênio 2007-2009)*. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 338 Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PETERSON, M.E. Snake Bite: Coral Snakes. Elsevier Saunders. *Clinical Techniques Small Animal Practice*, v.21, p.183-186. 2006.

PIEGAS, L.S.; FEITOSA, G.; MATTOS, L.A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.93, n.6, p.179-264. 2009.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia*, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 904p. 2004.

REIS, L.P.G., *Estudo clínico do envenenamento experimental por Micrurus surinamensis em cobaias (Cavia porcellus) – (Dissertação)*, 2017.

RIGGS, T.W.; SNIDER, A.R. Respiratory influence on right and left ventricular diastolic function in normal children. *The American Journal of Cardiology*, v.63, n.12, p.858. 1989.

RITCHIE, R.F.; PALOMAKI, G.E.; NEVEUX, L.M. et al. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin, and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *Journal of Clinical Laboratory Analyses*, v.12, n.6. 1999.

ROODT, A.R.; LAGO, N.R.; STOCK, R.P. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon*, v.59, n.2, 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*, v.26, p.1155. 1996.

ROSSETTO, O.; MORBIATO, L.; CACCIN, P. RIGONI. Et al. Presynaptic enzymatic neurotoxins. *Journal of Neurochemistry*, v.97, n.6, p.1543-1545. 2006.

ROZE, J.A. *Coral snakes of the Americas—biology, identification, and venoms*: Krieger Pub Co; Original ed edition, p.340. 1996.

SANCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, v.30, n.1, p.95-103. 1992.

SCHERMER S. *The blood morphology of laboratory animals*. Davis. Philadelphia. Pennsylvania. 1976.

SHEIBER, D. *Use of Cardiac Markers in the Emergency Department*. [monograph on the Internet] Nebraska: emedicine; February 12. 2002.

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.

SILVA JR, N.J. *As Cobras-Corais do Brasil - Biologia, Taxonomia, Venenos e Envenenamentos*, 1 ed. Goiânia, Goiás: PUC- Goiás. 416 páginas. 2016.

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.

STEELE, A. GOWRISHANKAR, M. ABRAHAMSON, S. et al. Postoperative hyponatremia despite near-isotonic saline infusion: a phenomenon of desalination. *Annals of Internal Medicine*, v.126, n.1, p.20-25. 1997.

STERNS, R.H. SILVER, S.M. Hyponatremia. In: Alpern RJ, Hebert SC, editors. *Seldin and Giebisch's the kidney: physiology and pathophysiology*. London: Elsevier; p. 1179–1202. 2008.

SWARROP, S.; GRAD B. Snakebite mortality in the world. *Bull World Health Org*, v.10, n.1, p.35-76. 1954.

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. 3rd ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.4, p. e622, 2010.

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.

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

THYGESEN, K. ALPERT, J.S. WHITE, H.D. Universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*, v.28, n.20, p.2173-2195. 2007.

TILLEY, L.P. *Essential of canine and feline electrocardiography*. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 470p. 1992.

TU, X.; HUANG, Q.; LOU, X. et al. Purification, N-terminal sequencing, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of atratoxin, a new short-chain alpha-neurotoxin from the venom of *Naja naja atra*. *Acta Crystallographica*, v.58, n.5, p.839-842. 2002.

UETZ, T. *The EMBL reptile database*. [2016]. Disponível em: <<http://www.reptiledatabase.org/>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

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.

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

WARRELL, D.A. *Epidemiology, clinical features and management of snake bites in Central and South America*. *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*: Cornell University Press; p. 709–61. 2004.

WEIS, D.J., WARDROP, K.J. *Schalm's Veterinary Hematology*. Iowa-USA, Ed. WileyBlackWell, 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, n.3, p.219–228. 1971.

WOLFINGER, R., CHANG, M. *Comparing the SAS® GLM and MIXED procedures for repeated measures*. Cary: SAS Institute Inc., 11p. 1996.