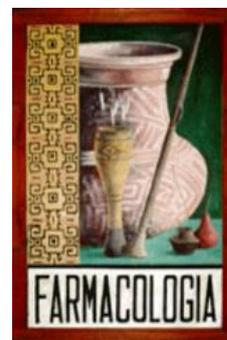




Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas



# ESTUDO DA CARDIOTOXICIDADE DAS PEÇONHAS DE SERPENTES VIPERÍDEAS.

Hilmar Dias Ricardo

2013

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Ciências Biomédicas

ESTUDO DA CARDIOTOXICIDADE  
DAS PEÇONHAS DE SERPENTES VIPERÍDEAS.

Hilmar Dias Ricardo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Farmacologia).

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Assis Melo.

Rio de Janeiro

Junho de 2013

Ricardo, Hilmar Dias.

Estudo da Cardiotoxicidade das Peçonhas de Serpentes Viperídeas / Hilmar Dias Ricardo. –Rio de Janeiro: UFRJ/ ICB, 2013.

viii, 109f; il.; 31 cm.

Orientador: Paulo de Assis Melo

Tese (Doutorado) - UFRJ/ ICB/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia), 2013.

Referências Bibliográficas: f. 81-98. 1. Venenos de Serpentes. 2. Coração Isolado de Rato. 3. Cardiotoxicidade. I. Melo, Paulo de Assis. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Farmacologia Básica e Clínica. III. Título.

## Agradecimentos

Gostaria de iniciar o meu agradecimento a Deus. Depois disso, gostaria de agradecer aos amigos que não mais lembro os seus nomes, porém, recordo com muita felicidade de todos que fizeram parte da minha vida na pré-escola, no primeiro grau e no segundo grau. Assim como, todos os professores das duas escolas que eu estudei em Governador Valadares-MG, E.E. Nelson de Sena e a E.E. Professor Joaquim Pedro Nascimento. Em especial a professora de biologia Carmen da sétima série, que na aula de tecidos biológicos me fez despertar para a área da saúde e a professora de geografia Alzira, essa era de fato comprometida com a escola e seus alunos.

A segunda fase da minha vida formal e toda ela feita na minha querida UFRJ. Nesse local abençoado pude viver, estudar e compartilhar momentos singulares junto a vários alunos e alunas nas salas de aula, no CA (Centro Acadêmico) e no DCE (Diretório Central dos Estudantes) que se tornaram amigos, colegas e conhecidos. Em relação aos professores dessa universidade e seus centros, pude vivenciar junto desses, quando fui representante do corpo discente no CEG (conselho de ensino e graduação). Para mim era como uma aula magna por sessão do conselho. Além disso, a honra e possibilidade de crescer academicamente com colaboração de professores que são em sua maioria, referência em suas áreas de pesquisas. Nesse ponto gostaria de agradecer aos professores do IBCCF (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho). Em especial aos Professores José Hamilton Matheus Nascimento, pela orientação da iniciação científica e ao Professor Geraldo Cidade, pela orientação quando era monitor de biofísica para o curso de Fisioterapia. Além desses, o Professor Hélio Mattos da Faculdade de Farmácia, pelo apoio na chegada à universidade.

Após o término da graduação ingressei no Laboratório de Farmacologia das Toxinas liderado pelo Professor Paulo de Assis Melo. Nesse momento começou a mudança em minha vida. Nesse laboratório encontrei amigos, colegas e companheiros de estudo e debates: Alexandra Dias Serafim, Bruno Lemos Cons, Camila Ziccardi El Kik, Diogo Augusto Pinheiro, Fabrício Ferreira de Albuquerque Fernandes, Fernanda de Siqueira Lece, Fernando Chagas Patrão Neto, Glauco Alexandre Gaban (in memorian), Jeison Saturnino de Oliveira, Marcos Monteiro Machado, Jair Machado Espíndola Netto, Marcelo Abrahao Strauch, Marcelo Amorim Tomaz, Matheus da Silva Tavares Henriques, Paula Alvarenga Borges, Rafael Batista da Costa Xavier, Tatiane Fernandes da Fonseca e Vinicius Vieira Martins.

Eu gostaria de agradecer em particular ao meu *Amigo, Professor de fato e fatos, Orientador, Debatedor Político, Sereno, Tenaz, Humorado e Humano* Paulo de Assis Melo. Essa pessoa singular com uma memória e dizeres proféticos. Confesso que nos últimos tempos a minha admiração, respeito e olhar pelo meu orientador mudaram muito e cresceram de maneira exponencial.

Não posso esquecer-me da minha família: dos meus pais, minha vó Cacilda (in memorian), as minhas irmãs e irmão, meus cunhados, meus sobrinhos e sobrinhas. Além desses, a minha Amanda e aos meus dois filhotes amados (Lucas e Mateus), que sem esses não teria um por cento de força para realizar as atuais empreitadas. Somados a esses, estão também em meu coração a minha segunda mãe, que a minha sogra, meu sogro e minhas cunhadas amáveis.

*“A vida só pode ser entendida para trás, mas deve ser vivida para frente”.*

**Soren Kierkegaard**

*“Bem-aventurado o que superou seu ego... o que atingiu a paz... o que encontrou a verdade”.*

**Gautama Buddha**

## Estudo da Cardiotoxicidade das Peçonhas de Serpentes Viperídeas.

Hilmar Dias Ricardo

Orientador: Prof. Dr. Paulo A. Melo

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Farmacologia).

Investigamos a cardiotoxicidade dos venenos brutos das serpentes *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *Bothrops asper*, *Bothrops atrox*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops insularis*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops moojeni* (10,0 µg/mL) em coração de rato isolado usando a preparação modificada de Langendorff e avaliação macroscópica pelo cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC). A tensão cardíaca e eletrocardiograma (EKG) foram continuamente registrados. Todos os venenos induziram significativos efeitos cardiotoxicos. Além disso, os venenos de *Bothrops jararacussu*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *Bothrops leucurus* e *Bothrops asper* (2,5-10,0 µg/mL) induziu alterações concentração-dependentes na pressão de perfusão, frequência cardíaca e eletrocardiograma, levando à fibrilação e parada cardíaca. Em 45 minutos, todos os venenos (10,0 µg/mL) reduziram a tensão do coração até 0% em relação ao controle. Além disso, foram observados os aumentos da pressão de perfusão e do intervalo PR, entretanto, ocorreu à diminuição da amplitude do complexo QRS e do ritmo cardíaco. Finalmente, testou-se o efeito da heparina e enoxaparina na inibição da cardiotoxicidade induzida por *B. asper* e veneno bruto *B. jararacussu*, respectivamente. A adição de heparina diminuiu de uma forma dependente da concentração (30,0-300,0 µg/mL) a cardiotoxicidade de veneno *B. asper*, atingindo-se a inibição de 100% com 300,0 µg/mL. Por outro lado, a enoxaparina (30,0-300,0 µg/mL) mostrou uma inibição dependente da concentração, entretanto, parcial quando associado ao veneno de *B. jararacussu*. Após a perfusão, os corações foram removidos do aparelho de Langendorff e tiveram seus ventrículos cortados e corados com TTC a 1% para mostrar áreas lesadas. Os corações expostos a *B. jararacussu*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. leucurus* e *B. asper* por 60 min. mostraram significativas áreas de lesão. A heparina foi capaz de antagonizar o aparecimento de tais áreas de lesão em corações expostos à *B. asper*.

Palavras-chave: heparina, enoxaparina, cardiotoxicidade, venenos de serpentes, toxinas.

Rio de Janeiro

Maio 2013

## Study of the Cardiotoxicity of Viperid Snake Venoms

Hilmar Dias Ricardo

Professor: Paulo A. Melo

Abstract of the thesis submitted to the Postgraduate Program of Pharmacology and Medicinal Chemistry, Institute of Biomedical Sciences, Universidade Federal do Rio de Janeiro, as part of the requirements needed to obtain the title of Doctor of Science (Pharmacology).

We investigated the cardiotoxicity of the crude venoms of snakes *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *Bothrops asper*, *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. leucurus*, *B. moojeni* (10.0 µg/mL) in isolated rat heart using the modified Langendorff preparation and macroscopic evaluation by the triphenyl tetrazolium hydrochloride (TTC). Heart tension and electrocardiogram (EKG) were continuously recorded. All venoms induced significant cardiotoxic effects. Moreover, the venoms of *B. jararacussu*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. leucurus* and *B. asper* (2.5-10.0 µg/mL) induced concentration-dependent changes in perfusion pressure, heart rate and EKG, leading to fibrillation and cardiac arrest. In 45 minutes, all venoms (10.0 µg/mL) reduced the heart tension to 0% of control, increased perfusion pressure and altered EKG waves, increasing the PR interval and decreasing the amplitude of the QRS complex and the heart rate. Finally, we tested the effect of heparin and enoxaparin in the inhibition of the cardiotoxicity induced by *B. asper* and *B. jararacussu* crude venoms, respectively. The addition of heparin decreased in a concentration-dependent way (30.0-300.0 µg/mL) the cardiotoxicity of *B. asper* venom, reaching up to 100% of inhibition with 300.0 µg/mL. On the other hand, enoxaparin (30.0-300.0 µg/mL) showed a partial concentration-dependent inhibition of *B. jararacussu* venom. After perfusion the hearts were removed from the Langendorff apparatus and had their ventricles sliced and stained with 1% TTC to show the infarcted areas. Hearts exposed to *B. jararacussu*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. leucurus* and *B. asper* for 60 min. showed significant damaged areas. Heparin was able to antagonize the appearance of such damaged areas in *B. asper*-exposed hearts.

Keywords: heparin, enoxaparin, cardiotoxicity, snake venoms, toxins.

Rio de Janeiro

May 2013

## SUMÁRIO

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
SERPENTES PEÇONHENTAS.....	1
OS VENENOS OFÍDICOS: COMPOSIÇÃO E EFEITOS.....	5
CARDIOTOXICIDADE DOS VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO BOTHROPS.....	15
POLIANIONTES E A NEUTRALIZAÇÃO DE VENENOS OFÍDICOS.....	17
O CORAÇÃO.....	19
O MÚSCULO CARDÍACO- O POTENCIAL DE AÇÃO CARDÍACO.....	19
O PROCESSO DE EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO MÚSCULO CARDÍACO.....	21
ELETROCARDIOGRAMA (EKG) NORMAL.....	23
INFARTO CARDÍACO- ARRITMIAS.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
PEÇONHAS E REAGENTES.....	26
PREPARAÇÕES DE CORAÇÃO ISOLADO DE RATO-LANGENDORFF MODIFICADO.....	27
ESTUDO DE MAPEAMENTO DA ÁREA DE LESÃO-MAPEAMENTO ENZIMÁTICO MACROSCÓPICO.....	28
TRATAMENTO.....	29
ESTATÍSTICA.....	29
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÃO.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	77

## Lista de siglas e abreviaturas

AcIMT	miotoxina da <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>
ANOVA	análise de variância
Asp49	ácido aspártico 49
ATP	trifosfato de adenosina
BthTX-I	bothropstoxina-I
BthTX-II	bothropstoxina-II
CAUAP Pesquisa	Comissão de Avaliação do Uso de Animais em
CK	creatinoquinase
CTX	cardiotoxina
EKG	eletrocardiograma
EPM	erro padrão da média
FLA <sub>2</sub>	fosfolipase A2
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
Lys49	lisina 49
MS/FUNASA Saúde	Ministério da Saúde/Fundação Nacional de
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	enzima sódio potássio ATPase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSS	solução salina fisiológica
SUS	Sistema Único de Saúde
SVMPs	metaloproteinase de veneno de serpente
TTC	cloridrato de trifetil tetrazolium
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## INTRODUÇÃO

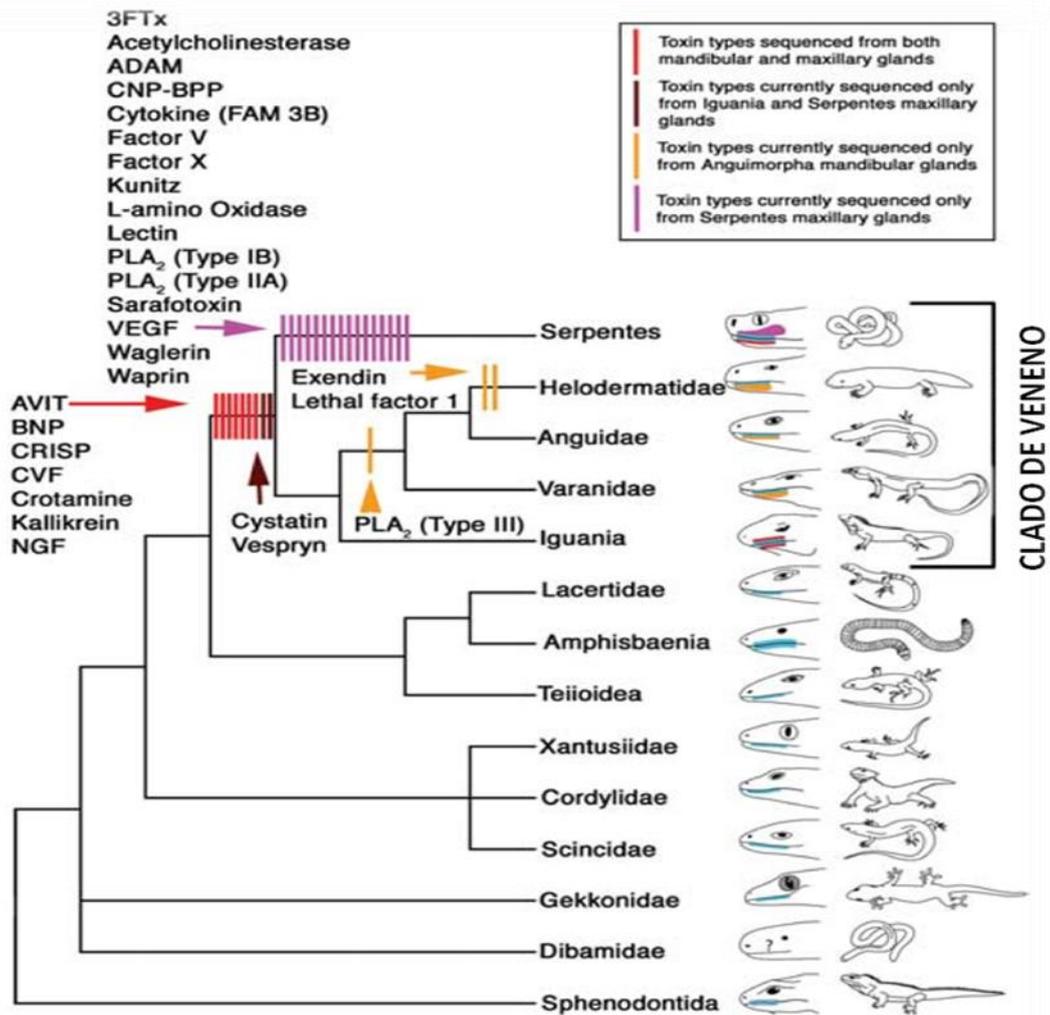
### SERPENTES PEÇONHENTAS

As serpentes, especialmente aquelas que são venenosas, são motivo de medo e fascínio para muitas pessoas. Na verdade, a relação entre os seres humanos e as serpentes venenosas parece ter influenciado o nosso passado evolutivo. Alguns pesquisadores supõem que a ameaça de serpentes peçonhentas levou ao refinamento de habilidades neurológicas em antropóides iniciais (Isbell, 2006), então algumas destas serpentes podem ter contribuído para nossa evolução. Animais peçonhentos são definidos como aqueles que injetam toxinas em outros animais, por meio de "ferrões, espinhas, ou dentes" (Greene, 1997). As serpentes venenosas têm sido tradicionalmente divididas em dois grupos principais, elapídeas e viperídeas, definidas pelo tipo de presas que a serpente tem para a inoculação do veneno. Elapídeas são caracterizadas por presas relativamente imóveis e compreendem cerca de 330 espécies, incluindo as cobras, mambas, *seakraits* e cobras coral. Em contraste, viperídeas têm presas altamente móveis que se dobram contra o céu da boca quando não estão em uso. Cascaveis e víboras estão entre as quase 230 representantes desse grupo (Greene, 1997). Um trabalho sugere que a organização de serpentes venenosas pode ser muito mais complexa, pois há algumas espécies de colubrídeos venenosos (um grupo de serpentes que são na sua maior parte não venenosa) e um terceiro grupo distinto de serpentes venenosas para além da elapídeas e víboras: o *atractaspídidas* ou serpentes *Stilleto* (Greene, 1997; Jackson, 2003). Tradicionalmente, as serpentes eram vistas como sendo uma espécie evoluída dos lagartos, e suas adaptações

especializadas para capturar a presa, tais como grampos flexíveis e sistemas de distribuição de veneno, têm sido reconhecidas como características importantes que contribuem para a sua radiação em meados dos anos Cenozoicos (Savitzky, 1980). Um grande problema para o estudo da evolução da serpente tem sido a falta de informação sólida sobre filogenia de serpentes (Jackson, 2003). Por exemplo, em relação aos três grandes grupos (viperídeas, atractaspídeas e elapídeas) acreditavam-se em uma origem comum em relação aos sistemas de distribuição de veneno e a localização das presas na frente. Agora, entretanto, acredita-se em evolução de forma independente (Jackson, 2003).

O trabalho mais recente sobre a origem do veneno em répteis foca as toxinas em si, que ao longo do tempo foram recrutados a partir de proteínas do corpo e tornou-se incorporado aos sistemas de veneno da serpente (Fry e Wuster, 2004). Estudos moleculares sugerem que os sistemas de veneno evoluíram nos animais ancestrais que, eventualmente, deram origem a alguns grupos avançados de lagartos (iguanas, monitores e helodermas) e todas as serpentes (Fry e Wuster, 2004; Fry et al., 2005). Por exemplo, evidências mostram que animais como a cobra do milho "não venenosa" (*Elaphe guttata*) são derivados de ancestrais venenosos, mas perderam grande parte da funcionalidade de suas glândulas de veneno, devido ao desenvolvimento de métodos como a captura de presas através da constrição (Fry et al., 2008). Se esta nova perspectiva filogenética de réptil associado ao veneno é correta, aproximadamente 58% de todos os squamates (escamados-4.600 de 7.900 espécies existentes) descendem do clado veneno (fig. 1) (Fry et al., 2005). Além de fundamentalmente refazer nossa compreensão sobre a evolução de

venenos de serpentes, esses estudos também sugerem que muitas serpentes tradicionalmente consideradas como não venenosas podem ser promissoras para estudos sobre toxinas (Fry e Wuster, 2004; Fry et al., 2005; Fry et al., 2008).



**Desenvolvimento Relativo glandular e tempo de recrutamento toxina eventos mapeados sobre a filogenia répteis Squamata (escamosos).** Glândulas mucosecretoras são de cor azul, a forma ancestral da glândula secretora de proteínas (serial, lobular e não compostos) vermelho, a forma, complexa derivada da glândula de veneno de serpente-superior (composto, encapsulados e com um lúmen) Magenta, e a forma, complexo derivado do mandibular anguimorfa glândula de veneno (composto, encapsulados e com um lúmen) de laranja. **3FTx**, três dedos-toxinas; **ADAM**, uma desintegrina e metaloproteínase; **CNP-BPP**, peptídeo-c natriurético tipo-bradicinina potencializando peptídeo; **CVF**, cobra venom factor; **NGF**, fator de crescimento do nervo; **VEGF**, o fator de crescimento endotelial vascular.

Figura 1: Desenvolvimento glandular na filogenia dos répteis escamosos. Fonte: Fry et al., 2006.

A evolução das toxinas no veneno de serpentes está intimamente relacionada com o desenvolvimento de dentes, esses são especializados em oferecer essas toxinas. Apesar da estreita associação de presas com a entrega de veneno, pesquisas sugerem que as presas ancestrais foram realmente utilizadas para auxiliar na deglutição da presa em vez de injetar veneno (Kardong, 1979). Os dentes maiores derivados da maxila posterior teriam sido úteis para forçar para baixo as presas de serpentes ancestrais, assim como eles são para as cobras modernas dos gêneros *Xenodon* e *Heterodon* (Kardong, 1979). Nesses dentes primitivos abriram poros através do quais secreções das glândulas orais poderiam entrar na presa, dessa maneira, preparando o palco para o desenvolvimento de víboras e elapideas (Kardong, 1979). Esta teoria baseia-se na suposição de que as presas da frente das serpentes foram obtidas a partir de dentes dilatados da região posterior da boca. Trabalhos recentes com embriões serpentes indicam que este é realmente o caso como "as presas frontais desenvolveram-se a partir da extremidade posterior do maxilar superior", sugerindo sua homologia com os dentes posteriores (Fig. 2) (Vonk et al., 2008).

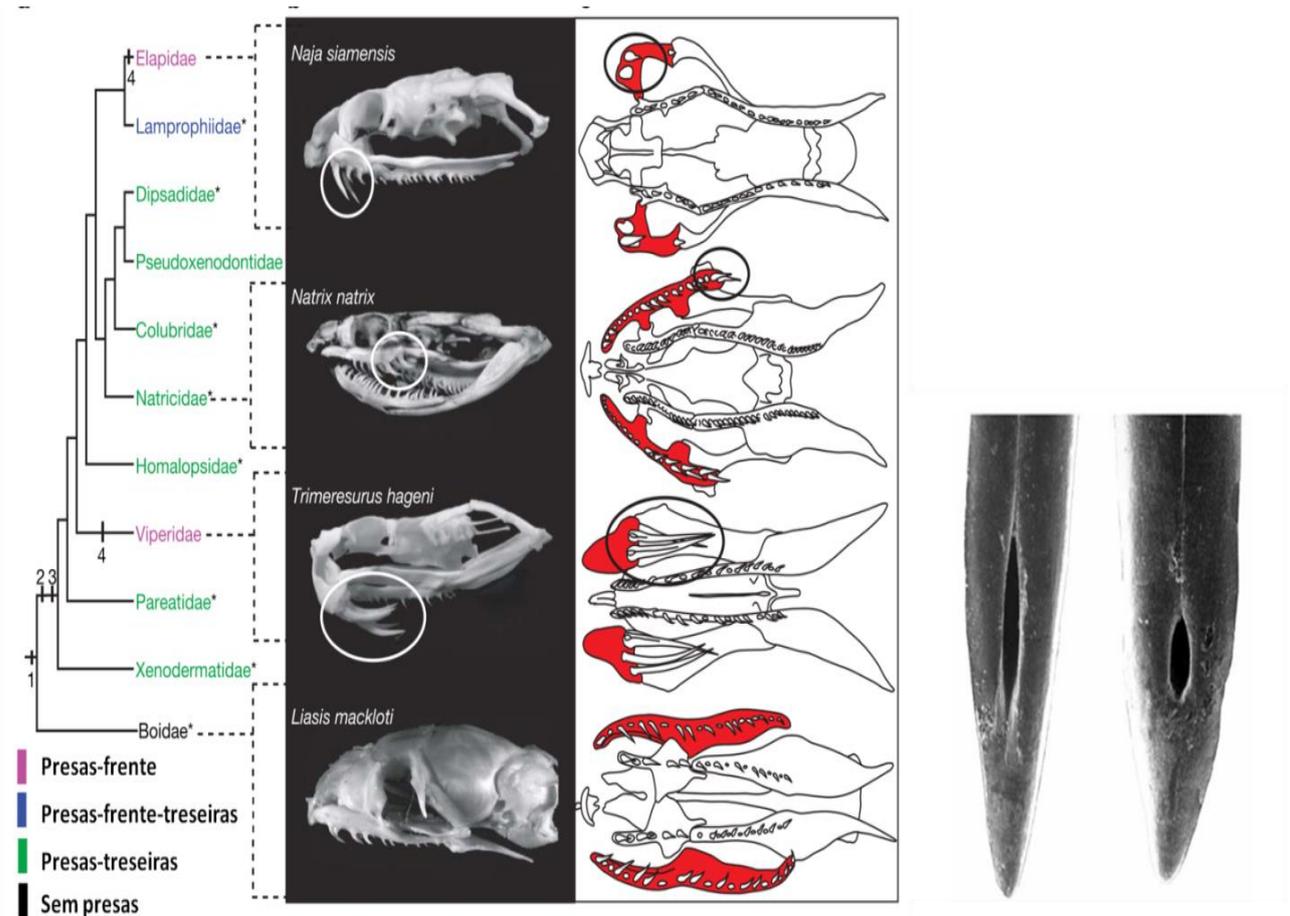


Figura 2: posição das presas em relação aos grupos de serpentes e a microscopia eletrônica das presas e seus orifícios por onde o veneno sai. Fonte: Vonk et al., 2008.

## OS VENENOS OFÍDICOS: COMPOSIÇÃO E EFEITOS

2,5 milhões de pessoas empenhadas anualmente, dos quais, cerca de 100.000 dos casos são fatais, com a grande maioria ocorrida em áreas rurais nos trópicos (fig.3).

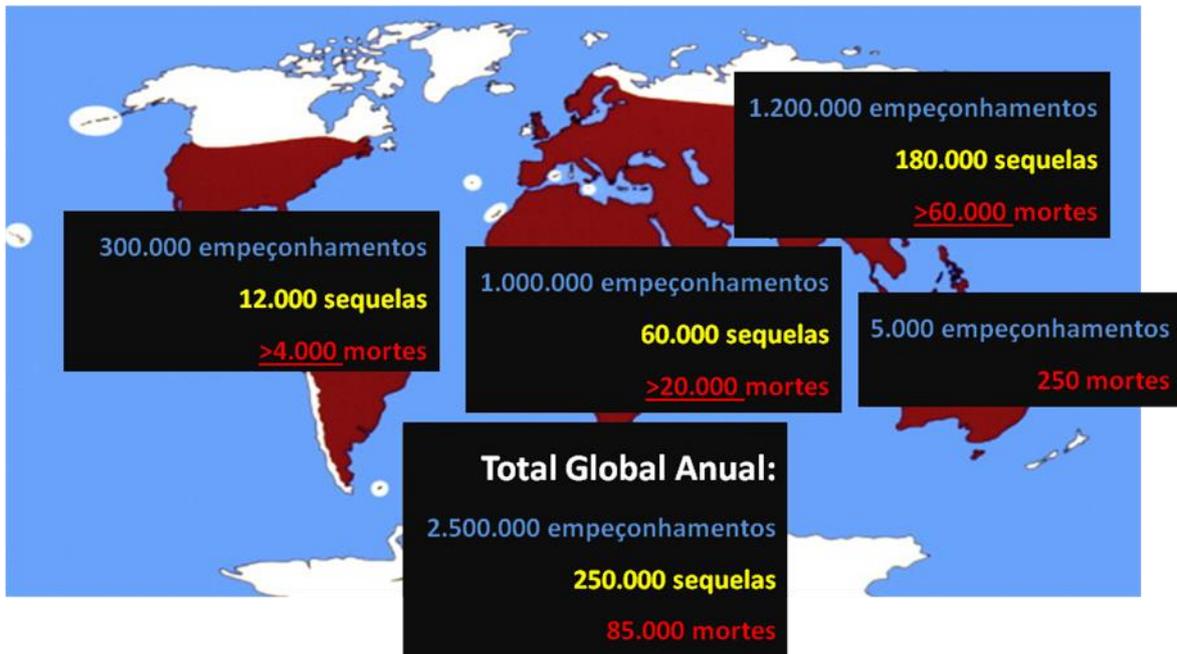


Figura 3: Distribuição global empoçonhamento de serpente. Fonte: Gutiérrez et al., 2010.

As serpentes peçonhentas são encontradas em quase todo o mundo (incluindo oceanos), com exceção de algumas ilhas, ambientes de alta latitude e altitudes elevadas (World Health Organization, 2007; fig.4).

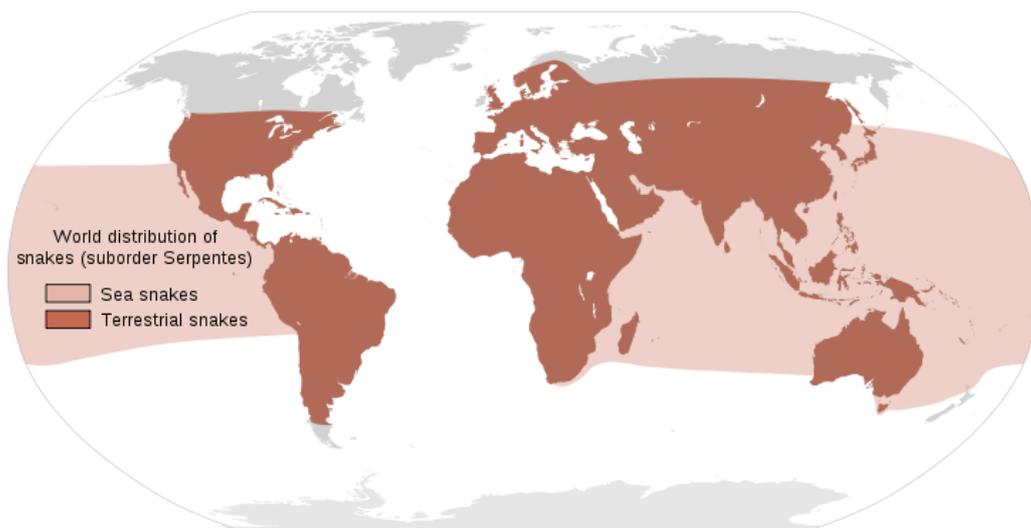


Figura 4: Distribuição global das principais grupos de serpente. Fonte: Kasturiratne A et al. 2008.

Os envenenamentos e mortes resultantes de empoçamento, no entanto, são particularmente importantes na saúde pública principalmente nas regiões rurais. As populações dessas regiões têm experimentado uma alta taxa de morbidade e mortalidade devido ao acesso precário aos serviços de saúde, que muitas vezes são subutilizados, e, em alguns casos, a escassez de soro antiofídico, que é o único tratamento específico na atualidade. Um grande número de vítimas sobrevive com sequelas físicas permanentes, devido à necrose do tecido local e sequelas psicológicas. A maioria das vítimas são jovens (HANSDAK et al.,1998), e o impacto econômico da sua deficiência é considerável. Apesar da dimensão dos seus efeitos sobre as populações, o empoçamento por serpentes ainda não recebeu a atenção que merece das autoridades nacionais e internacionais de saúde, e somente no início de 2009 foi categorizada como uma doença tropical negligenciada. Desde o início do século XX, entretanto, o pesquisador Vital Brazil descreveu quatro gêneros de serpentes de interesse médico em nosso país: *Bothrops* (jararaca, jararacussu, urutu, caiçaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu pico-de-jaca) e *Micrurus* (coral). Elas estão adaptadas ao clima tropical de nosso país e podem ser encontradas nas diferentes regiões do Brasil (Rosenfeld, 1971; Vital Brazil, 1984; MS/FUNASA, 1998). Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* induzem extenso dano tecidual local, com edema, hemorragia e necrose, assim como efeitos sistêmicos como distúrbios da hemostasia, insuficiência renal aguda, disfunções pulmonar e cardíaca (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez e Lomonte, 1989; Fan e Cardoso, 1995; MS/FUNASA, 1998; Agarwal, 2007; fig.5).

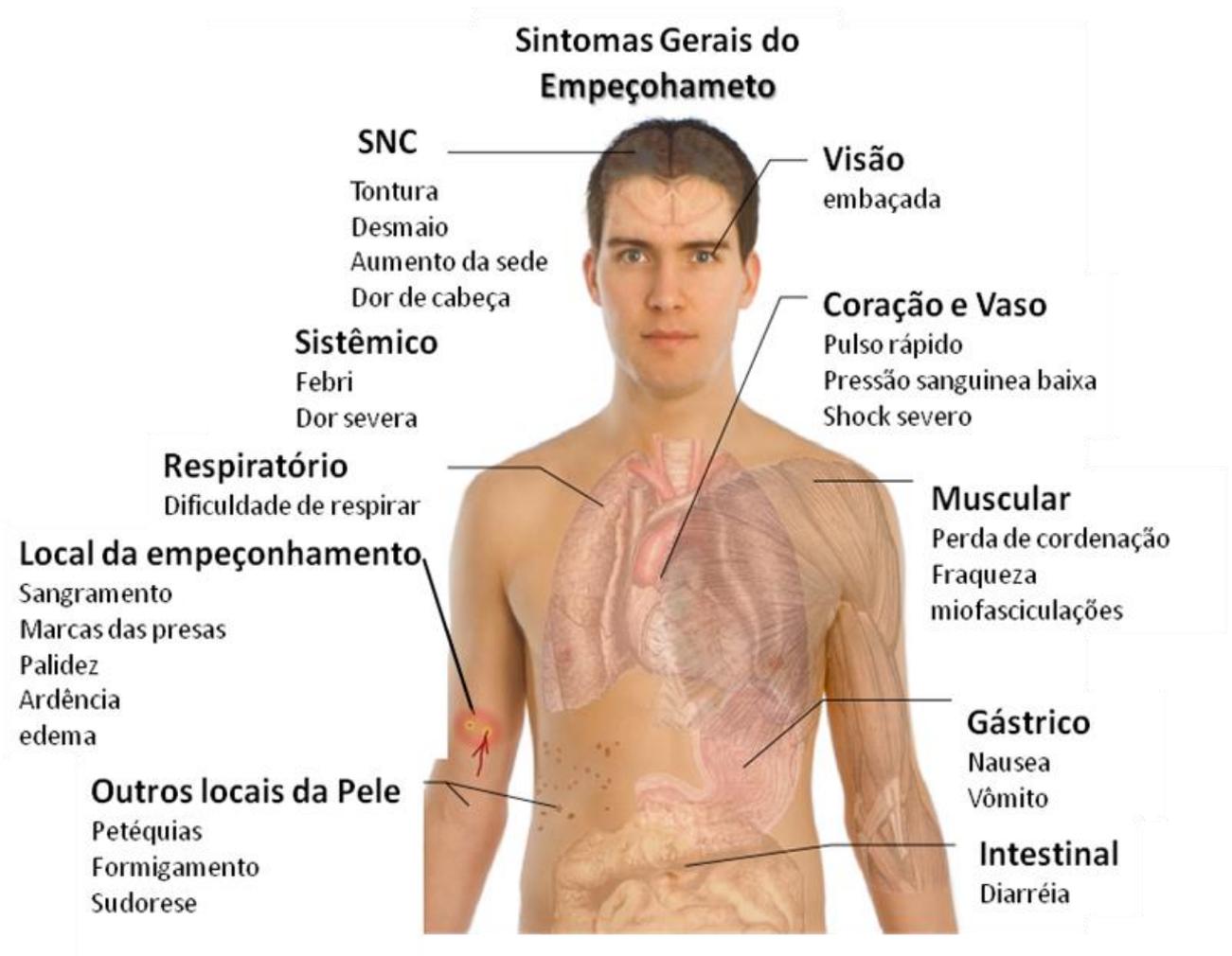


Figura 5: Sintomas gerais de empeçonhamento.

Fonte: <http://www.answers.com/topic/snakebite>

Estes efeitos resultam da ação complexa de várias enzimas (especialmente fosfolipases  $A_2$  e proteases), peptídeos e toxinas de menor peso molecular, como as miotoxinas (Gutiérrez e Lomonte, 1995), presentes nestes venenos. Quando estes venenos penetram nos tecidos podem ser observadas diversas manifestações, que irão depender da quantidade, composição e tecido alvo. O tipo e a quantidade de toxinas em cada veneno variam entre as espécies, podendo ocorrer ainda variações dentro da própria espécie. Do perfil do veneno depende sua letalidade, geralmente sendo mais

letais aqueles que contêm neurotoxinas e cardiotoxinas, componentes que afetam especialmente o sistema nervoso e cardiovascular. Seus princípios ativos são proteínas, com estrutura, ponto isoelétrico e peso molecular variável, e peptídeos farmacologicamente ativos (Mebs e Ownby, 1990; Tu et al., 1996; Andrião-Escarso et al., 2000). Alterações sistêmicas ou locais decorrentes da ação do veneno podem ocorrer no organismo atingido. Muitas proteínas têm atividade enzimática, dentre as quais se destacam as atividades proteolíticas, fosfolipásica, colagenásica e hialuronidásica. Provavelmente, é essa última ação que proporciona a melhor difusão do veneno nos tecidos, contribuindo para a extensão dos efeitos. De forma paralela, se inicia intensa resposta inflamatória e alterações da atividade plaquetária (Vital 1984; Kamiguti et al., 1986; Zingali et al., 1990; Fuly et al., 1997). Muitas destas toxinas são agentes citotóxicos, cujos efeitos se devem na maior parte a fosfolipases  $A_2$  (FLA<sub>2</sub>), atividade proteolítica ou mesmos aos policationtes que atuam em componentes da membrana celular (Mebs e Ownby, 1990; Harris e Franson, 1991; Fletcher et al., 1997; Fuly et al., 2000; Fuly et al., 2003; Gutiérrez e Ownby, 2003; Melo et al., 2004). Assim, componentes ativos citotóxicos e enzimáticos, os quais são comparados com outras miotoxinas ou cardiotoxinas de venenos de elapídeos e crotalídeos, podem ser agrupados aqui. (Gutiérrez et al., 1991, 2003; Cintra et al., 1993; Andrião-Escarso et al., 2000; Gutiérrez e Ownby, 2003; Wermelinger et al., 2005).

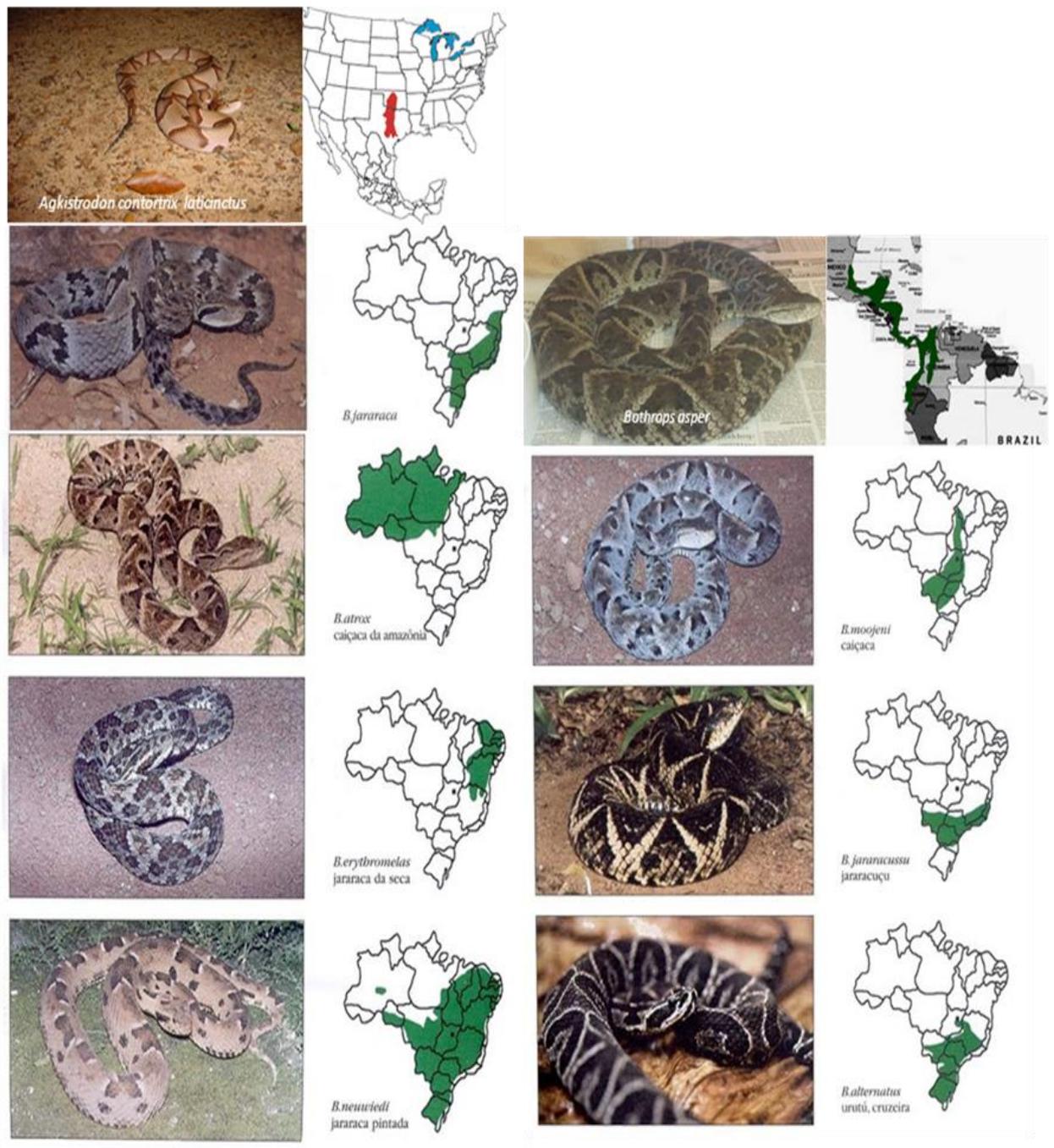


Figura 6: Distribuição das serpentes nos EUA, América central e Brasil. Fonte:

<http://www.sestr.com.br/2012/02/como-prevenir-acidentes-com-cobras>.

O envenenamento por *Bothrops jararacussu* causa sintomas similares aos de outras espécies com ênfase em efeitos agudos como hemorragia, edema e necrose. Observações experimentais têm demonstrado que o choque cardiovascular é uma causa comum de morte após empeçonhamento por

*Bothrops* (Rosenfeld, 1971; Milani et al., 1997; Ribeiro et al., 1998). Homs-Brandeburgo e colaboradores (1988) isolaram e caracterizaram algumas proteínas ativas do veneno de *B. jararacussu* e mostraram que as bothropstoxinas-I e II (BthTX-I e II) são os principais componentes responsáveis pela miotoxicidade. Ambas miotoxinas já foram sequenciadas e caracterizadas como Lys49 e Asp49 (FLA<sub>2</sub>), respectivamente (Cintra et al., 1993; Pereira et al., 1998). A BthTX-I é proteína de cadeia simples e sua sequência de aminoácidos apresenta na posição 49 substituição do ácido aspártico (Asp49) pela lisina (Lys49) alterando sua atividade catalítica (Cintra et al. 1993). A BthTX-II que apresenta resíduo Asp49 tem efeitos miotóxico, anticoagulante, e demonstrou ter atividade catalítica FLA<sub>2</sub> e sequência de aminoácidos conservada comparando-se com a BthTX-I (Gutierrez et al., 1991; Pereira et al., 1998).

A *Agkistrodon contortrix laticinctus* (copperhead) é uma serpente conhecida na região (fig.6) entre oeste de Texas e fronteira sul de Kansas e do Oklahoma nos EUA (Wright, 1957). Nessa serpente tem a miotoxina (AcIMT-*Agkistrodon contortrix laticinctus* miotoxin) do tipo Lys49 FLA<sub>2</sub> (Johnson e Ownby, 1993). Essa toxina tem mostrado efeito na musculatura lisa, através de um mecanismo regulado, pelo menos em parte, por o aumento de cálcio citosólico (Leite et al., 2004).

Um espécime que habita a América Central, mais pronunciadamente na Costa Rica, é a *B. asper*. Essa serpente produz um veneno que é mais hemorrágico e miotóxico do que espécimes da vertente do Pacífico, que apresentam maior atividade proteolítica (Gutierrez et al., 1980). Análises proteômicas revelaram a presença de proteínas pertencentes a pelo menos

oito famílias do veneno de *B. asper*: metaloproteinase (41-44%), fosfolipase A2 (29-45%), a serina protease (4-18%), oxidase L-aminoácido (5-9%), desintegrina (1-2%), lectina semelhante ao tipo-c (0,5%), proteína secretora rica em cisteína (CRISP) (0,1%) e DC-fragmento (<0,1%) (Alape-Giro et al., 2008).

A serpente *Bothrops alternatus* (urutu ou lancehead) tem uma ampla distribuição na América do Sul, além de todo sudeste e sul do Brasil, Uruguai, norte e centro da Argentina, e leste do Paraguai (Campbell et al., 2004). Essa espécie de serpente é uma importante causa de empecoamento, e seu envenenamento produz eventos locais (dor, edema, hemorragia e necrose) e sistêmicos (sangramento coagulopatia, sistêmica e renal falha) manifestações semelhante às de outras espécies do gênero *Bothrops* (Bauab et al., 1994). Os componentes do veneno que podem contribuir para esses efeitos locais e sistêmicos incluem enzimas coagulantes, metaloproteinases, desintegrina, FLA<sub>2</sub>, enzima oxidase L-aminoácido (LAO) e fosfodiesterases (Öhler et al., 2010, Cardoso et al., 2010). Considerando que a composição bioquímica e ações locais do veneno de *B. alternatus* são bem conhecidas, as alterações sistêmicas foram menos estudadas, apesar de ter sido demonstrado que este veneno causa disfunção renal em ratos (Mello et al., 2010, Linardi et al., 2011).

A serpente *B. insularis* é uma espécie endêmica da jararaca restrita a ilha de Queimada Grande, uma ilha rochosa 40 milhas ao largo da costa sudeste do Brasil (Amaral, 1924). Em contraste com as espécies de *Bothrops* que vivem no continente, a *B. insularis* se alimenta principalmente de aves (que são abundantes nessa ilha) e não de roedores. Como resultado, essa espécie é muito mais arbórea do que os membros continentais do gênero. A *B. insularis*

é hermafrodita, com uma tendência para a extinção dos machos (Amaral, 1918, 1919, 1924). Não há registro de envenenamento humano por *B. insularis* e pouco se sabe sobre a composição do veneno desta espécie (Hofling et al., 2001).

A *Bothrops jararaca* é encontrada no sul do Brasil, nordeste do Paraguai e norte da Argentina (Misiones) (McDiarmid et al., 1999). A Jararagina é uma toxina hemorrágica de *Bothrops jararaca* (Paine et al., 1992), e um dos principais componentes do veneno responsáveis pela intensa hemorragia, frequentemente observada em humanos envenenados. Essa é uma enzima proteolítica e solúvel relacionada com os membros das desintegrinas. Essa metaloproteinase de mamífero pertence à família ADAM, o qual compreende proteínas que contenham um domínio metaloproteinase e um domínio rico em cisteína (Blobel et al., 1997).

A serpente *Bothrops leucurus* tem uma limitada distribuição e é encontrada em áreas de Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, incluindo os Estados do Ceará e da Bahia até o Espírito Santo no sudeste. O veneno de *B. leucurus* não foi estudado em tanto detalhe. Os efeitos biológicos, devido ao envenenamento têm perfil similar ao observado em outros *Bothrops*, como por exemplo, atividade coagulante, hemorrágica, fibrinolítica, e capacidade de induzir falência renal *in vivo* (Sanchez et al., 1992).

A *Bothrops moojeni* (Caiçaca) é uma espécie de serpente que sofre com alteração e fragmentação de habitat (Rodrigues, 2005). Essa é amplamente distribuída na Região Centro-Oeste do Brasil e em regiões vizinhas da Argentina e do Paraguai (Nogueira et al., 2003). Ela é bastante comum no

Brasil e uma das maiores responsáveis por acidentes ofídicos em algumas regiões como Brasília e Triângulo Mineiro (Marques; Sazima, 2003; Silva et al., 2003). Apesar de ser uma espécie com grande importância na área da saúde, não existem estudos que caracterizem variabilidade genética e divergência genética nesta espécie, bem como em nenhuma das 38 espécies do gênero *Bothrops*. O veneno da *Bothrops moojeni* (bem como de outras serpentes peçonhentas) é uma mistura complexa de proteínas com atividade biológica. As miotoxina-I e-II (MjTX-I e-II) foram purificadas de *Bothrops moojeni* sendo homólogas as Lys49-FLA<sub>2</sub> (Lomonte et al, 1990, Soares et al, 1998, 2000, 2004).

A *Bothrops neuwiedi* é encontrada na América do Sul a leste dos Andes, incluindo o Brasil (sul do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, uma população isolada no Amazonas, Rondônia e todos os estados do sul), Bolívia, Paraguai, Argentina (Catamarca, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fé, Santiago del Estero e Tucumán) e Uruguai. (McDiarmid et al., 1999). A neuwiedase, isolada a partir de veneno de *Bothrops neuwiedi* (Rodrigues et al., 2001), e a jararagina, isolada a partir de veneno de *Bothrops jararaca* (Paine et al. 1992), respectivamente, representam PI (classe mais simples de enzimas que contém apenas um domínio metaloproteinase) e P-III (classe de glicoproteínas que interferem na adesão célula-matriz, célula-célula e sinalização celular) SVMPs (snake venom metalloproteinases). Neuwiedase, uma metaloproteinase de 22kDa, é capaz de degradar o fibrinogênio, fibrina, colágeno do tipo I, fibronectina, laminina e induzir reação inflamatória. Quando, entretanto, injetado via intradérmica a neuwiedase não

induziu atividade hemorrágica em camundongo, mas provocou hemorragia quando aplicada sobre o músculo cremaster de rato em ensaio de microscopia intravital (Rodrigues et al., 2000; 2001). A neuwiedase também induz uma reação miotóxica em ratos (Rodrigues et al., 2001).

Na Amazônia brasileira, *Bothrops atrox* (comumente conhecido como cabeça de lança da Amazônia) é a víbora mais envolvidas no empoçonhamento humano por serpentes. Lopez-Lozano (2002) relata que mais de 90% dos pacientes empoçonhados que procuraram atendimento no Instituto de Medicina Tropical (IMT - Manaus-AM) foram vítimas dessa espécie. As estatísticas disponíveis da Amazônia são subestimadas em geral, porque muitas vítimas não conseguem chegar a um hospital antes de morrer. Os efeitos locais induzidos por veneno de *B. atrox* são considerados da maior importância clínica (Furtado et al., 1991) e caracterizam-se, como outros venenos de *Bothrops*, por grave lesão do tecido, incluindo mionecrose, bolhas e hemorragia, bem como uma resposta inflamatória notável que inclui dor, inchaço, eritema, equimoses e infiltração de leucócitos (Borges et al, 1999, Barros et al., 1998; Petretski et al., 2000; Otero et al., 1997; Moreira et al., 2012). Nenhum dos efeitos são antagonizados pelo soro específico para o gênero *Bothrops* (Avila-Aguero et al., 2001), e pouco se sabe sobre os mecanismos que desencadeiam os efeitos locais desse veneno. Alguns autores atribuem estes efeitos para as principais toxinas destes venenos, tais como as metaloproteinases, FLA<sub>2</sub> e serino proteases (Núñez et al., 2009; Calvete et al., 2011). Os eventos locais inflamatórios causados pelo veneno são resultado da síntese e liberação de uma variedade de mediadores lipídicos, eicosanoides (Moreira et al., 2012) e mediadores proteicos, tais como

citocinas e quimiocinas (Barros et al., 1998; Escocard et al., 2006; Moreira et al., 2012), bem como os produtos de ativação enzimática de vários sistemas tais como o sistema complemento, cascata de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (Stocker e Barlow, 1976; Rodrigues et al. 2004; Cintra et al., 2012). No entanto, até o momento poucos estudos têm investigado o papel das moléculas-chave envolvidas nas vias de sinalização intracelular responsáveis pela regulação e síntese destes mediadores inflamatórios em resposta ao veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

## **CARDIOTOXICIDADE DOS VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO**

### ***BOTHRUPS***

Até recentemente não havia sido demonstrada atividade cardiotoxica para peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*, pois sempre se valorizou os aspectos das lesões locais necrotizantes e os distúrbios da hemostasia. Sifuentes (2006) realizou seu trabalho de dissertação de mestrado em nosso laboratório e investigou a cardiotoxicidade do veneno bruto de *B. jararacussu*, onde se avaliou principalmente o efeito na pressão arterial em ratos anestesiados, a tensão desenvolvida em coração isolado e o antagonismo destes efeitos pela suramina. Nesse estudo observou-se que a suramina protege os corações de ratos dos efeitos cardiodepressores do veneno de *B. jararacussu*. Comparando-se este estudo com outros da literatura pode-se depreender que as cardiotoxinas (CTX) de diferentes venenos de serpentes até aqui descritas, são toxinas básicas de baixa massa molecular (aproximadamente 6,5 kDa), apresentando amplo espectro de atividades biológicas. Surpreendentemente, pouco é conhecido a respeito do efeito induzido por venenos de serpentes do gênero de *Bothrops* e suas principais

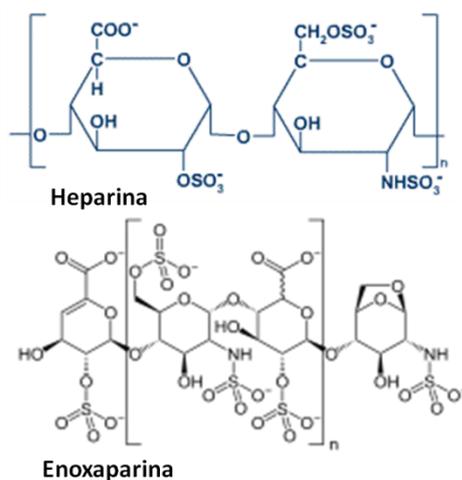
toxinas em corações isolados e substâncias com capacidade de antagonizar esses efeitos. Além disso, os mecanismos indutores da cardiotoxicidade por esses agentes ainda são obscuros. Estudos com toxinas de serpentes de outras famílias diferentes revelam que estas induzem parada cardíaca, além de suas habilidades de induzir severa inflamação e necrose (Chang, 1993; Ownby et al., 1993; Harvey, 2006). Não se conhecem os mecanismos pelos quais elas inibem a contratilidade das células miocárdicas ou promovem sua completa destruição (Harvey, 1991; Fletcher e Jiang, 1993; Harvey, 2006; Sifuentes et al. 2008). Tenta-se estabelecer um paralelo com os efeitos observados por certas miotoxinas em preparações isoladas com cardiotoxicidade, porém ainda não se pode afirmar como elas induzem tão rapidamente a depressão da disfunção celular (Ownby et al., 1999; Silveira et al., 2004; Sifuentes et al. 2008; Montecucco et al., 2008). Vários venenos de serpentes das famílias Crotalídea, Elapidae e Hydrophiidae, que apresentam atividade fosfolipásica, são citotóxicos e cardiotoxícos (Ownby et al., 1993; Melo e Ownby, 1999; Montecucco et al., 2008). Contudo, o papel das CTX e/ou FLA<sub>2</sub> na cardiotoxicidade e miotoxicidade mantém-se praticamente inexplorado, particularmente o possível efeito sinérgico complexo das moléculas (Dufton e Hider, 1991; Montecucco et al., 2008). A dificuldade na identificação do alvo primário das CTXs e no entendimento da ação não enzimática das FLA<sub>2</sub> faz com que se tenha lento progresso no estudo destas enzimas. Da mesma forma, o veneno de *B. jararacussu* tem sido estudado desde o início do século XX, porém a atividade cardiotoxíca, manteve-se inexplorada, assim como substâncias que possam neutralizar esta atividade (Sifuentes et al., 2008). Expandimos o estudo da cardiotoxicidade do veneno de *B. jararacussu* e

também testamos outras peçonhas deste gênero. Nossos resultados mostraram que elas inibem a tensão cardíaca (Ricardo, 2008). Em especial pudemos observar significativa alteração do sistema de condução cardíaco e redução da amplitude do EKG. Além do estudo com a peçonha bruta os experimentos com as miotoxinas BthTX I e II, revelaram serem distintas as manifestações de suas cardiotoxicidades. A BthTX I induz depressão, aparecimento de contratatura e dissociação eletromecânica, enquanto que a BthTX II produz depressão e vasta lesão tecidual. Tanto o efeito da peçonha bruta como das toxinas isoladas foram inibidas de forma significativa pela heparina. Os dados por nós obtidos e observações anteriores indicam que os polianiontes como a suramina e a heparina podem ser importante ferramenta para se neutralizar as miotoxinas e cardiotoxinas presentes nos venenos de serpentes (Melo e Ownby, 1999; Arruda et al., 2002; Calil-Elias et al., 2002 a, b; Murakami et al., 2005; Sifuentes et al., 2008). Somado aos efeitos dos antagonistas, chamou-nos a atenção, e temos particular interesse sobre o mecanismo indutor de cardiotoxicidade produzido pelas toxinas, tempo e peçonhas de serpentes crotalideas do gênero *Bothrops*.

### **POLIANIONTES E A NEUTRALIZAÇÃO DE VENENOS OFÍDICOS**

A heparina é um polissacarídeo sulfatado (fig.7) muito utilizado na prática clínica como anticoagulante, e tem sido investigada em diferentes atividades. A heparina é capaz de se ligar a diversas proteínas e esta propriedade tem sido usada também na purificação de proteínas pela cromatografia por afinidade, sugerindo que tais experimentos poderiam contribuir para estudos da interação da heparina com a proteína em estudo (Conrad, 1998). Dentre as proteínas que se ligam à heparina com afinidade variável, cita-se fatores de crescimentos

(Ruoslathi et al., 1991), anti-trombina III, FLA<sub>2</sub> (Lomonte et al., 1994; Sartipy et al., 1996). A demonstração da neutraliza o pela heparina da cardiotoxina A3 que   importante componente do veneno de *Naja naja atra*, com atividade seletiva de lise celular,   mais um indicativo dessa intera o (Patel et al., 1997). Observa es prévias mostram que a heparina e outros polianiontes poderiam se ligar e neutralizar cardiotoxinas ou os efeitos miotóxicos da FLA<sub>2</sub>, bem como a atividade proteolítica do veneno de *B. jararacussu* (Melo et al., 1993; Patel et al., 1997; Calil-Elias et al., 2002 a, b; Murakami et al., 2005, 2007). A neutraliza o da miotoxicidade foi investigada *in vitro* e *in vivo* e observou-se que a heparina reduz a mionecrose induzida por venenos crotal deos, FLA<sub>2</sub> e miotoxinas isoladas de serpentes da América do Norte (Melo e Ownby, 1999), Central (Lomonte et al., 1994) e do Sul (Melo e Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al., 1993; Calil-Elias et al., 2002 a, b). Heparinas de diferentes massas moleculares mostraram-se ativas neutralizando a atividade miotóxica *in vitro* e *in vivo* (Melo et al., 1993; Calil-Elias et al., 2002 a, b). Elas não somente diminuiram a lesão celular como também promoveram melhor regenera o do tecido muscular após lesão por veneno de *B. jararacussu* (Calil-Elias et al. 2002 a, b).



**Figura 7: Representa o Estrutural de Dois Poli nions.** **Heparina** um polissacarídeo poliani nico sulfatado pertencente   família dos glicosaminoglicanos.   composta por unidades dissacarídeos repetidas compostas por ácido urônico e um  c car aminado. 2-O-sulfo-4-eno grupo  cido

**Enoxaparina**   uma heparina de baixo peso molecular. Enoxaparina sódica   obtida por despolimeriza o alcalina do éster benzílico da heparina derivada de mucosa intestinal porcina. A sua estrutura   caracterizada por um grupo de ácido urônico 2-O-sulfo-4-ene piranose na extremidade não redutora e uma 2-N, 6-O-dissulfo-D-glucosamina na extremidade redutora da cadeia. Cerca de 20% (variando entre 15% e 25%) da estrutura de enoxaparina cont m um derivado de 1,6-anidro na extremidade redutora da cadeia de polissacar dio.

Fonte: [http://es.wikipedia.org/wiki/Enoxaparina\\_s%C3%B3dica](http://es.wikipedia.org/wiki/Enoxaparina_s%C3%B3dica)

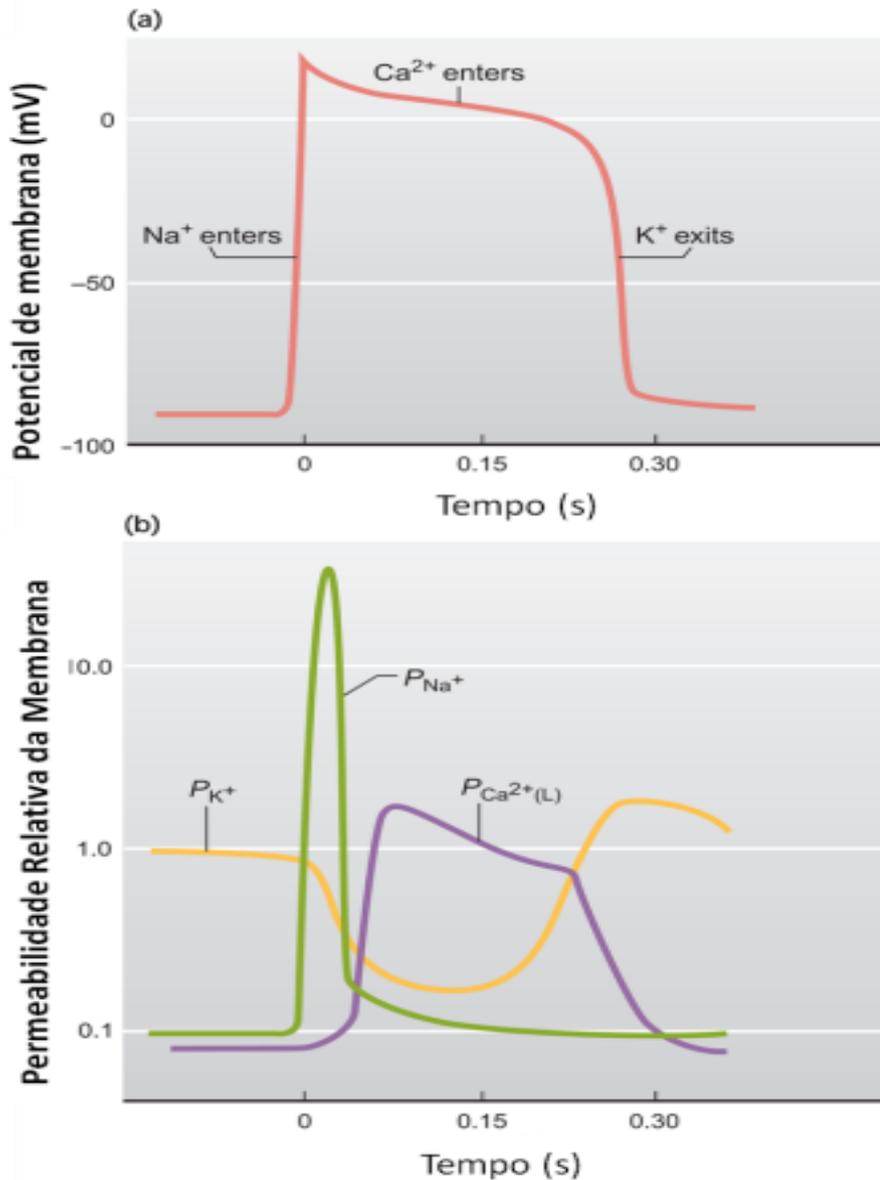
## **O CORAÇÃO**

O coração é o único órgão que nos mamíferos está localizado no centro do tórax e pode ser visto como duas bombas separadas: um coração direito que bombeia o sangue através dos pulmões, e um coração esquerdo esse bombeia o sangue através dos órgãos periféricos. Cada um destes corações é bomba pulsátil de duas câmaras composta de um átrio e de um ventrículo. Existem mecanismos especiais no coração que causam uma sucessão continuada de contrações denominada ritmicidade cardíaca, transmitindo potenciais de ação por todo o tecido muscular do coração causando a batida rítmica do coração (Guyton, 2006).

## **O MÚSCULO CARDÍACO- O POTENCIAL DE AÇÃO CARDÍACO**

O coração é composto principalmente por três tipos de músculo cardíacos: músculo atrial, músculo ventricular, e fibras musculares especializadas na excitação e condução. Os músculos do tipo atrial e ventricular contraem da mesma maneira que o músculo esquelético, exceto que a duração da contração é muito maior podendo chegar a 400 ms. Inversamente, as fibras excitatórias e as especializadas em condução contraem-se somente fracamente porque contêm poucas fibras contráteis. Em vez disso, elas apresentam uma descarga elétrica rítmica automática na formação dos potenciais de ação ou a condução dos potenciais de ação através do coração, fornecendo um sistema excitatório que controla a batida rítmica do coração. (Guyton, 2006).

O potencial de ação cardíaco é resultado de uma orquestração de abertura e fechamentos de canais iônicos (Fig. 8). É muito mais complexo que um potencial de ação de um músculo esquelético ou de um nervo (Katz, 2006). Este tipo de potencial de ação que ocorre nas fibras do músculo do coração gera um platô com duração de 0,2 a 0,3 segundos e causa neste mesmo período a contração do músculo, que é um período longo. A causa do platô é uma combinação de diversos fatores. Primeiramente, no músculo do coração, dois tipos de canais participam do processo da despolarização: (1) os canais de sódio voltagem-dependentes, chamados de canais rápidos, e (2) canais de cálcio voltagem-dependentes, que são lentos na sua abertura e conseqüentemente são chamados canais lentos. A abertura dos canais rápidos causa o pico do potencial de ação, visto que a abertura lenta, prolongada pelos canais lentos de cálcio permite principalmente que os íons do cálcio entrem na fibra, sendo este o responsável pela maior parte do aparecimento do platô do potencial de ação. Um segundo fator que possa ser em parte responsável para a formação do platô são os canais de potássio voltagem-dependentes que tem uma abertura mais lenta, e frequentemente não abrem até a extremidade do platô. Isto atrasa o retorno do potencial da membrana para seu valor negativo normal - 80 - de 90 milivolts. (Guyton, 2006).



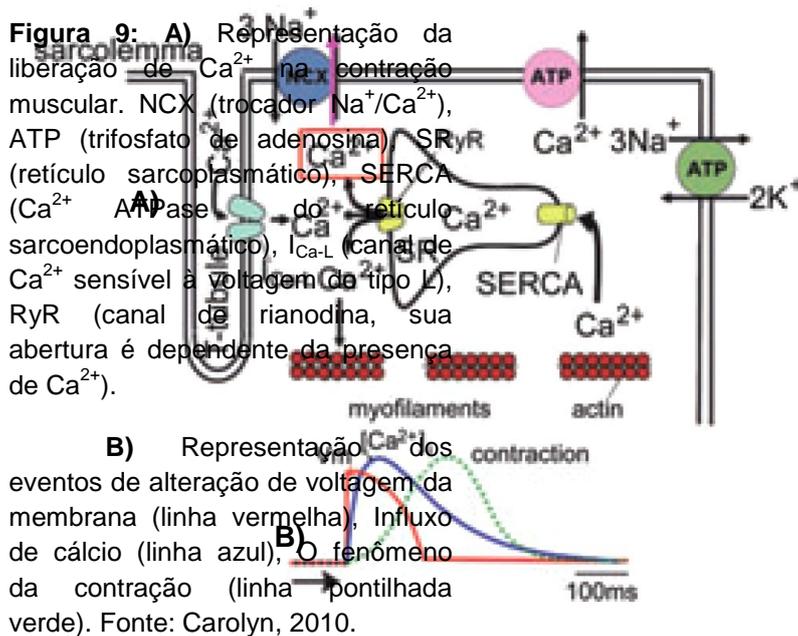
**Figura 8: A)** Registro de um potencial de membrana de cardiomiócito e, simultaneamente, representadas as condutâncias dos íons Na<sup>+</sup> (sódio), Ca<sup>2+</sup>(cálcio) e K<sup>+</sup>(potássio) ao longo do tempo do potencial.

**B)** O início e o pico do potencial de membrana são simultâneos ao período de maior condutância do Na<sup>+</sup>. O platô do potencial é simultâneo à máxima condutância do Ca<sup>2+</sup>. Já o retorno do potencial ao valor de base é dado pela condutância do K<sup>+</sup>. Fonte: VANDER'S HUMAN PHYSIOLOGY: THE MECHANISMS OF BODY FUNCTION. 11<sup>o</sup> edição. 2008.

## O PROCESSO DE EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO NO MÚSCULO CARDÍACO

O efetivo bombeamento e preenchimento da câmara cardíaca requerem processos de excitação e contração/relaxamento que são mediados pelo controle-fino dos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Bers, 2001). A contração do músculo é criticamente dependente do cálcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) e hidrólise do ATP (Ashley, 1991) (fig. 9). Isto é causado pelas forças geradas pela interação das pontes-cruzadas dos filamentos da miosina com os filamentos da actina. Durante o relaxamento, estas forças são inativas, mas quando um potencial de ação se propaga ao longo da fibra do músculo, ocorre a situação de excitação elétrica e o  $\text{Ca}^{2+}$  entra nos cardiomiócitos através da ativação dos canais  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependente. A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos retículos sarcoplasmáticos através de processo conhecido como  $\text{Ca}^{2+}$ -libera  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR -  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release), na qual permite o aumento transiente  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , levando para contração via ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à proteína contrátil, troponina C. O  $\text{Ca}^{2+}$  irá ocupar o sítio na troponina C. Depois disso, ocorre uma mudança conformacional na troponina i. Dessa forma, ocorre liberação dos sítios de interação entre os filamentos de miosina e os filamentos do actina, e a contração se inicia. Mas, a energia é necessária para que o processo de contração prossiga. Esta energia vem das ligações altamente energéticas da molécula do ATP, que é degradada através da enzima ATPase em difosfato de adenosina (ADP) para liberar energia. (Guyton, 2006). A figura abaixo é ilustração esquemática do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  nos miócitos ventriculares. A repolarização subsequente do sarcolema produz um declínio para níveis sarcoplasmático de  $\text{Ca}^{2+}$  (diástole) pela recaptação  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro do retículo sarcoplasmático através da enzima SERCA (sarco (endo) plasmic reticulum

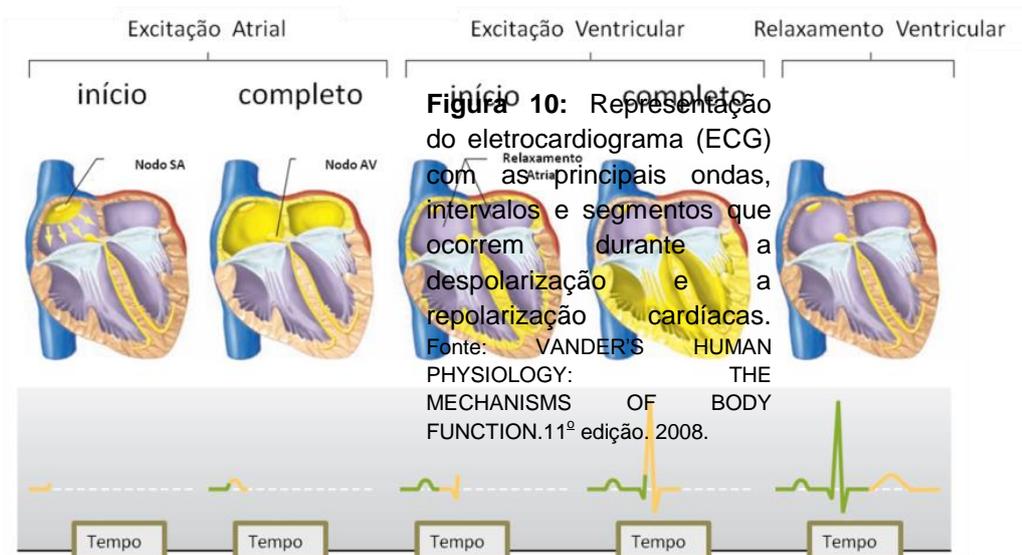
calcium ATPase) ou extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática e trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  no sarcolema (Tanaka et al., 2003). É importante ressaltar que esse processo, diferente do músculo esquelético, ocorre de forma simultânea; o fenômeno elétrico e o fenômeno mecânico.



## ELETROCARDIOGRAMA (EKG) NORMAL

Quando o impulso cardíaco passa através do coração despolarizando as células gera-se, corrente elétrica que se espalha também do coração para os tecidos adjacentes que o cercam. Uma parcela pequena da corrente espalha-se por toda à superfície corporal. Se elétrodos forem colocados na pele em lados opostos do coração, esses potenciais elétricos gerados pela corrente podem ser registrados; e esse registro é denominado como eletrocardiograma. O eletrocardiograma normal (fig.10) é composto de uma onda P, de um complexo QRS, e de uma onda T. O complexo QRS é frequentemente, mas

não sempre, separadas em três ondas: a onda Q, a onda R e a onda S. A onda P é gerada pelos potenciais elétricos decorrentes de despolarização atrial que ocorrem no início da contração atrial. O complexo QRS é causado pelos potenciais gerados quando os ventrículos são despolarizados e na contração, enquanto a onda da despolarização espalha-se através dos ventrículos. As ondas P e os componentes do complexo QRS são ondas da despolarização. A onda de T é causada pelos potenciais gerados quando os ventrículos recuperam-se do estado de despolarização. Este processo ocorre normalmente de 0.25 a 0.35 segundos após a despolarização dos ventrículos, e a onda T é conhecida como uma onda de repolarização. Assim, o eletrocardiograma é composto de ondas da despolarização e da repolarização. O Intervalo P-R é o tempo entre o começo da onda de P e o começo do complexo de QRS. É o intervalo entre o começo da excitação elétrica dos átrios e o começo da excitação dos ventrículos. Esse período é chamado de intervalo de P-R. A frequência cardíaca é obtida a partir da contagem de números de onda P que ocorrem a cada minuto (Guyton, 2006).



## INFARTO CARDÍACO- ARRITMIAS

As necessidades de alta energia podem ser não somente encontradas pelo metabolismo oxidativo, já que o coração requer um suprimento ininterrupto de oxigênio. Por essa razão, a oclusão arterial coronariana causa quase uma imediata perda da função e, dentre horas, a morte do cardiomiócito. Essa morte celular isquêmica é designada de infarto do miocárdio (Katz, 2006). Aceita-se bem que o insulto isquêmico ao coração produz uma sobrecarga de  $[Ca^{2+}]_i$  (Murphy et al., 1987), que foi considerado como um substrato importante para as arritmias tanto quanto na falha contrátil, especialmente em infarto agudo do miocárdio. Nas zonas da borda entre o miocárdio infartado e não infartado a dinâmica do  $[Ca^{2+}]_i$  é considerada um elemento chave para a arritmogênese (Steenbergen et al., 1987). Nestas áreas ocorrem também, alterações na expressão de canais de sódio do tipo rápido para o tipo lento. Estes diminuem a velocidade de condução e favorecem o aparecimento de arritmias. Arritmia é perturbação do ritmo cardíaco que se origina a partir de anormalidades na formação ou transtornos do impulso que prejudiquem a função ou condução cardíaca. Das diversas incapacidades funcionais dos eventos elétricos no coração, taquiarritmias ventriculares são comuns e potencialmente complicações da isquemia miocárdica e infarto (Rubart et al., 2001). Esses eventos já foram descritos no empeçonhamento de seres humanos e podem fazer parte das manifestações clínicas (Dissanayake et al., 1996 e Thewjitcharoen, 2005) dos acidentes ofídicos.

## OBJETIVOS

O objetivo desse projeto foi investigar a cardiotoxicidade de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e o antagonismo por substâncias polianiónicas.

Os objetivos específicos foram avaliar:

- 1) Os efeitos das peçonhas de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. leucurus*, *B. moojeni* e na tensão desenvolvida e no eletrocardiograma nos coração de rato isolado.
- 2) Avaliar a tensão desenvolvida em corações isolados de ratos expostos a concentrações crescentes *B. jararacussu*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. leucurus* e *B. asper*.
- 3) Comparar venenos brutos de *B. jararacussu*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. leucurus* e *B. asper*. Avaliar: Pressão de perfusão, EKG- (frequência cardíaca, intervalo PR e amplitude do complexo QRS) e marcação pelo sal cloridrato de trifetil tetrazolium (TTC).
- 4) Avaliar o efeito da heparina em antagonizar a cardiotoxicidade provocada pelo veneno bruto de *B. asper*.
- 5) Avaliar o efeito da enoxaparina em antagonizar a cardiotoxicidade provocada pelo veneno bruto de *B. jararacussu*.

## MÉTODOS

### PEÇONHA E REAGENTES

O veneno bruto de *Agkistrodon contortrix laticinctus* foi obtido da através da professora Charlotte Ownby, Oklahoma State University-EUA, já o veneno bruto de *B. asper* foi obtido da através Professor José Maria Gutiérrez, Universidad de Costa Rica. Os demais venenos brutos de *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. insulares*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojine*, *B. neuwiedi* foram obtidos da através do Instituto Vital Brazil, Rio de Janeiro, Brasil. O veneno bruto de *B. leucurus* foi obtido do CEPLAC-Ilhéus na Bahia. A heparina sódica (Heparin) foi obtida da Cristália Indústria Química e Farmacêutica LTDA e a enoxaparina (clexane) foi obtida da Sanofi-Aventis. O Cloridrato de trifetil tetrazolium (TTC) foi comprado do Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos os demais reagentes usados foram de grau analítico.

### PREPARAÇÕES DE CORAÇÃO ISOLADO DE RATO (LANGENDORFF MODIFICADO)

O protocolo experimental foi realizado utilizando corações isolados de ratos Wistar adulto (200-250 g) de ambos os sexos sacrificados pela anestesia com éter etílico. A manipulação e procedimentos com os animais obedeceram aos princípios do Comitê de Ética de CCS (UFRJ) e teve o parecer favorável para o projeto de pesquisa com o número de seu protocolo aprovado que é: DFBCICB 033. O tórax do animal foi aberto, o coração retirado de suas conexões anatômicas e imerso em solução de Ringer (NaCl: 135; KCl: 5; CaCl<sub>2</sub>: 2; MgCl<sub>2</sub>: 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1; NaHCO<sub>3</sub>: 15 e dextrose: 11, em mM) a 4 °C. A solução foi continuamente aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>,

White Martins), pH ajustado para  $7,4 \pm 0,02$ . A aorta ascendente foi canulada com agulha 20-Gauge, e conectada ao aparato de perfusão retrógrada de Langendorff (fig.11). O coração foi inicialmente perfundido a uma pressão de 30-50 mm Hg (4,5 mL/min), com solução de Ringer mantida a 37 °C e constantemente aerada com mistura gasosa carbogênica (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, White Martins) por um período de 30 minutos (período controle), e após este tempo iniciamos o período de perfusão dos grupos tratados por 60 minutos. O coração foi acoplado, por clipe fixado em seu ápice, a um transdutor de força GRASS (force-displacement FT03D) para registrarmos a força desenvolvida, a qual foi analisada através do programa WINDDAQ (Serial Acquisition – Versão 2.66). A pressão de perfusão foi mensurada através de uma coluna de mercúrio. Essa era conectada junto ao sistema de perfusão e ao local de fixação da aorta ascendente dos corações dos ratos. A atividade elétrica do tecido cardíaco foi monitorada através do registro de EKG, usando eletrodos conectados a agulhas inseridas na aorta e no ápice. Todas essas atividades foram registradas em arquivos do programa WINDAQ. Antes do registro foi aplicada ao coração uma tensão de estiramento (diastólica) de 2,0 g.

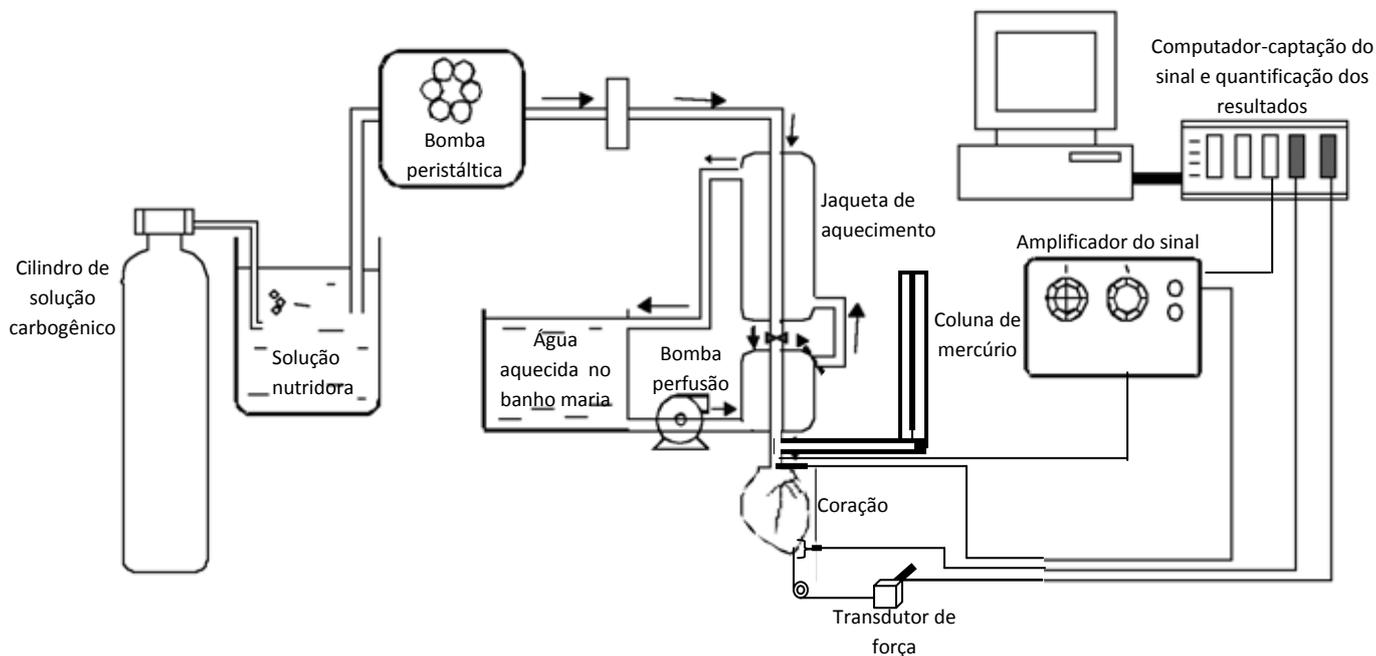


Figura 11: Esquema da preparação de Langendorff

## **ESTUDO DE MAPEAMENTO DA ÁREA DE LESÃO (MAPEAMENTO ENZIMÁTICO MACROSCÓPICO)**

Uma técnica difundida para a detecção macroscópica da área lesada utiliza o sal de cloridrato trifeníl tetrazolium (TTC), baseia-se em trabalhos importantes publicados há quase 58 anos (Nineham, 1955; Sandritter e Jestaedt, 1958). O mecanismo através do qual o sal de tetrazolium reage com os cardiomiócitos foi descrito por diversos autores (Klein et al., 1981, Nachlas e Shnitka, 1963, Pich et al., 1988 e Ramkisson, 1966). Basicamente, o TTC marca em vermelho o miocárdio, devido à atividade completa da lactato desidrogenase, quanto ao miocárdio infartado, à ausência de atividade da desidrogenase não produz a marcação. Após o período de perfusão, os corações foram retirados da montagem de Langendorff e fatiados. A partir de cada coração foram geradas 5 fatias com aproximadamente 2 mm de espessura, as quais foram mergulhadas

em uma solução de TTC a 1%, e mantidas a uma temperatura de 37°C durante 4-5 minutos. Logo após, as fatias foram retiradas do TTC e colocadas em uma solução de formaldeído a 10% durante 24 h. Após esse período, as fatias foram escaneadas e avaliadas com o programa de quantificação de áreas de imagens Imagem-J® obtido pelo link :<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>.

## TRATAMENTO

Grupos foram divididos em:

1. Os venenos brutos de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. leucurus*, *B. moojeni* na concentração de 10,0 µg/mL (n=1).
2. Veneno bruto *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0 µg/mL (n=4).

Pré-incubação dos venenos com as substâncias antagonistas.

3. Veneno bruto *B. asper* 10,0 µg/mL + heparina 30,0 µg/mL (n=4).
4. Veneno bruto *B. asper* 10,0 µg/mL + heparina 100,0 µg/mL (n=4).
5. Veneno bruto *B. asper* 10,0 µg/mL + heparina 300,0 µg/mL (n=4).
6. Veneno bruto *B. jararacussu* 10,0 µg/mL + enoxaparina 30,0 µg/mL (n=4).
7. Veneno bruto *B. jararacussu* 10,0 µg/mL + enoxaparina 100,0 µg/mL (n=4).
8. Veneno bruto *B. jararacussu* 10,0 µg/mL + enoxaparina 300,0 µg/mL (n=4).

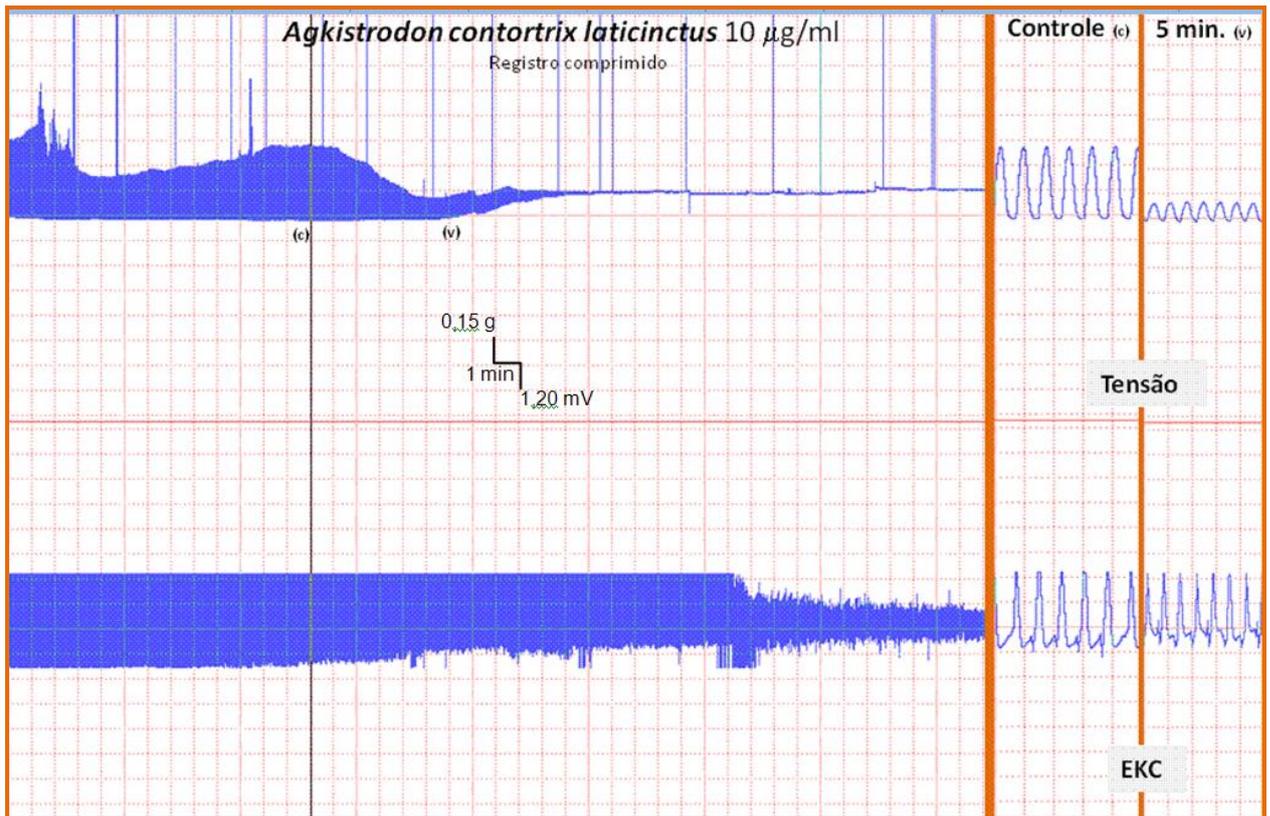
## ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como média ± EPM e analisados estatisticamente usando Teste *t* de student não pareado e o ANOVA e com pós-teste Tukey. Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

As preparações de coração de rato isolado expostas à perfusão dos venenos bruto de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. leucurus*, *B. moojeni* (concentração de 10,0 µg/mL) apresentaram redução da intensidade de tensão, e alterações elétricas nos registros de EKG, levando à fibrilação e parada cardíaca após diferentes tempos de acordo com o tipo de veneno perfundido no meio nutridor. Em alguns experimentos quando adicionamos o veneno na concentração de 10,0 µg/mL, além da depressão da amplitude da tensão e alterações dos padrões das ondas do EKG, observamos o aparecimento de elevação da linha de tensão basal, caracterizando contratura miocárdica.

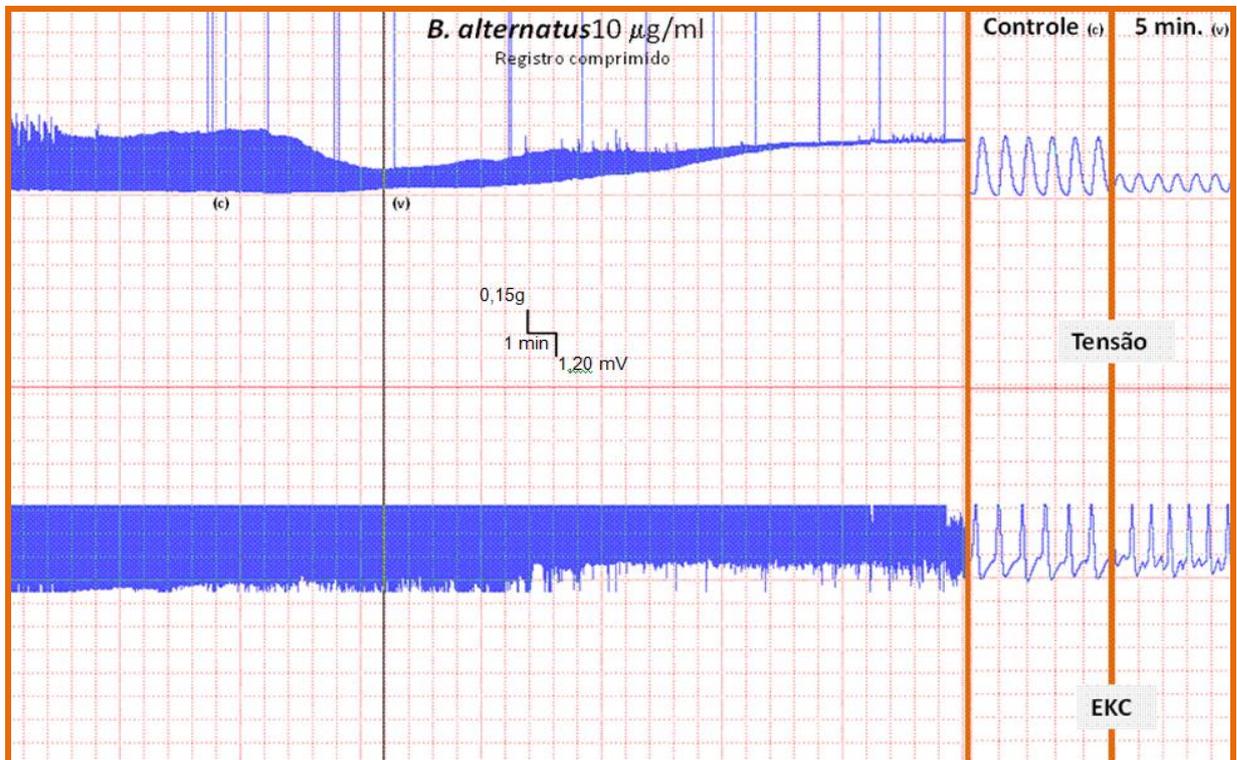
**Efeito do veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.12; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão da solução na concentração 10,0 µg/mL de veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* obtivemos a redução da tensão cardíaca, elevação da linha de base, aumento da frequência cardíaca e a redução da amplitude do complexo QRS. Após 35 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0 µg/mL começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 12: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (10,0 µg/mL) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

**Efeito do veneno de *B. alternatus* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.13; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão da solução na concentração 10,0 µg/mL de veneno de *B. alternatus* obtivemos a redução da tensão cardíaca, contratura diastólica, e aumento da frequência cardíaca. Após 55 minutos do início da perfusão do

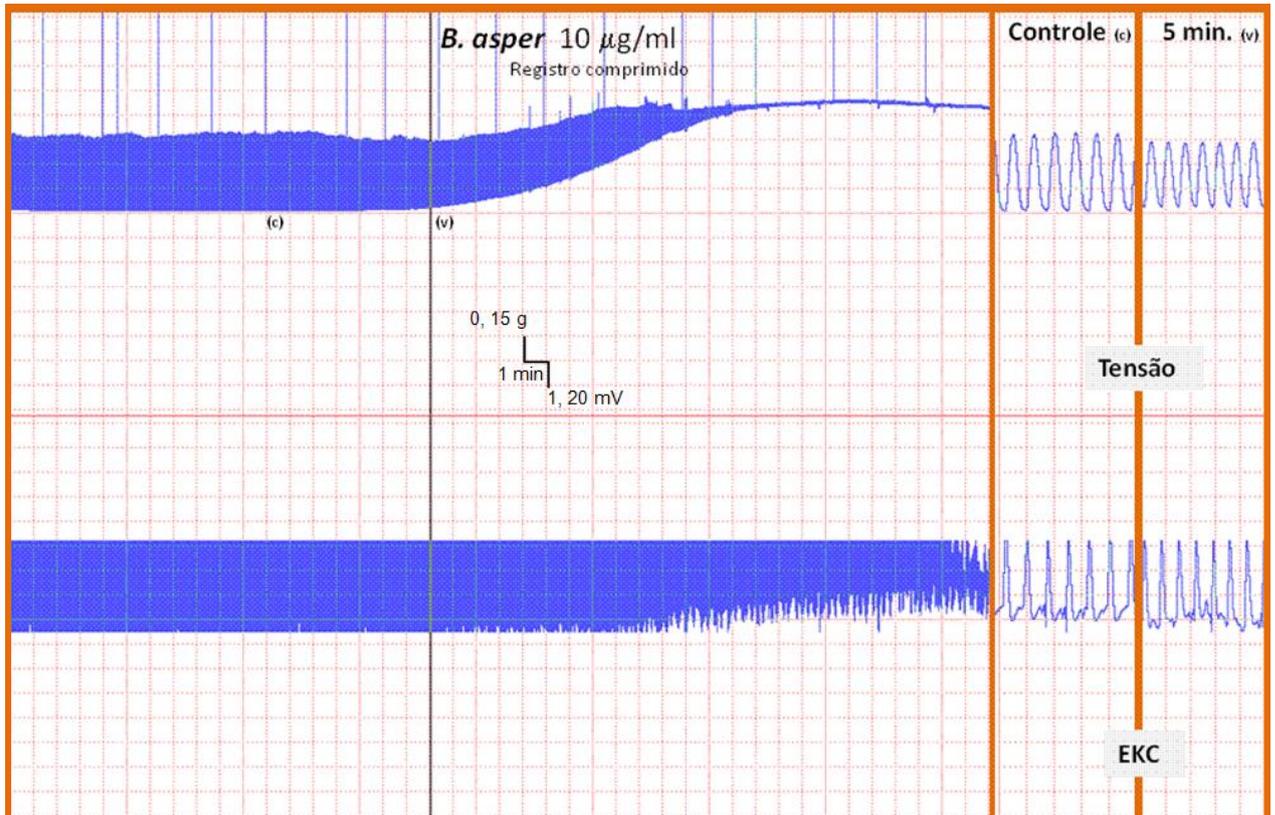
veneno bruto na concentração de 10,0 µg/mL começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 13: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. alternatus* (10,0 µg/mL) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

**Efeito do veneno de *B. asper* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.14; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão da solução na concentração 10,0 µg/mL de veneno de *B. asper* obtivemos a

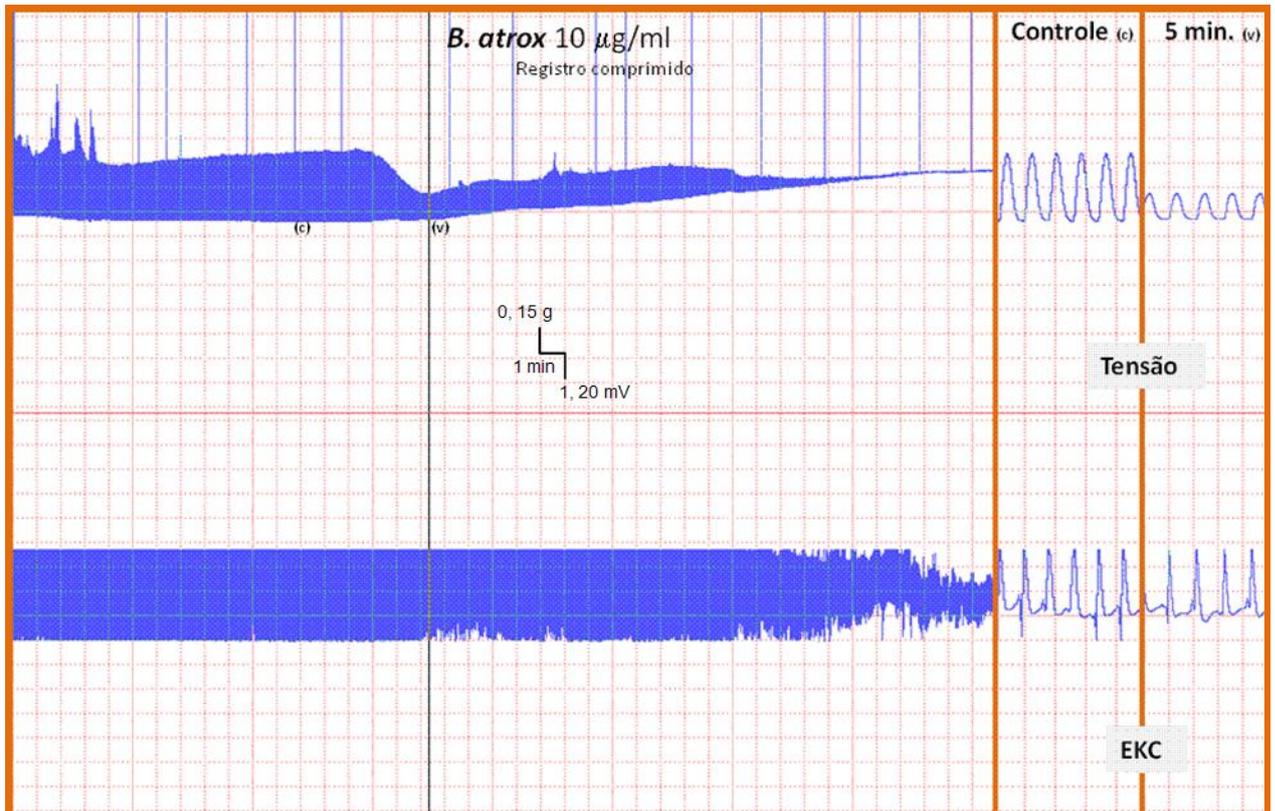
redução da tensão cardíaca, contratura diastólica e aumento da frequência cardíaca. Após 53 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  começou a ocorrer alterações mais acentuadas do ritmo de modo no EKG.



**Figura 14: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. asper* (10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

**Efeito do veneno de *B. atrox* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.15; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão

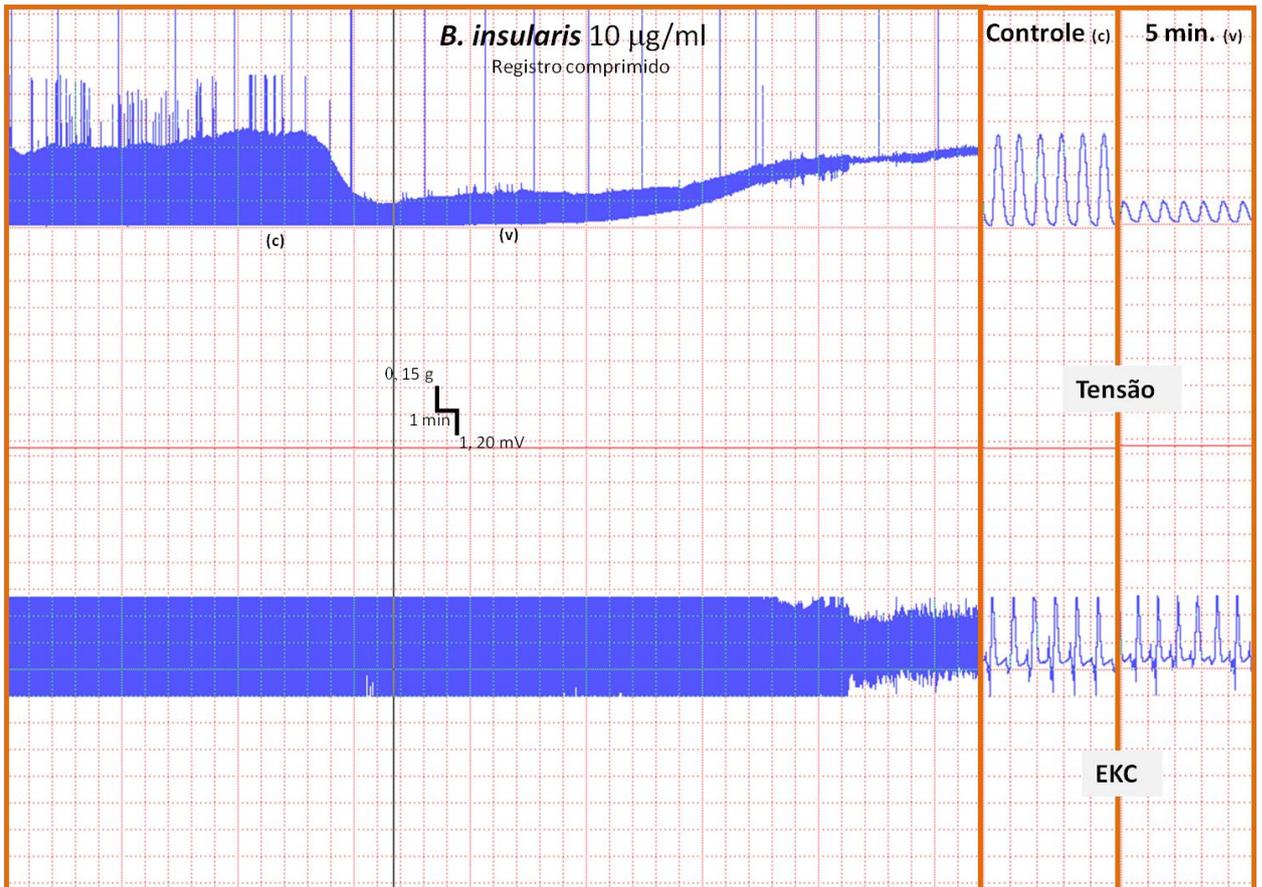
da solução na concentração 10,0  $\mu\text{g/mL}$  de veneno de *B. atrox* obtivemos a redução da tensão cardíaca, redução da frequência cardíaca e da amplitude do complexo QRS. Após 45 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$  começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 15: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. atrox* (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

**Efeito do veneno de *B. insularis* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.16; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5

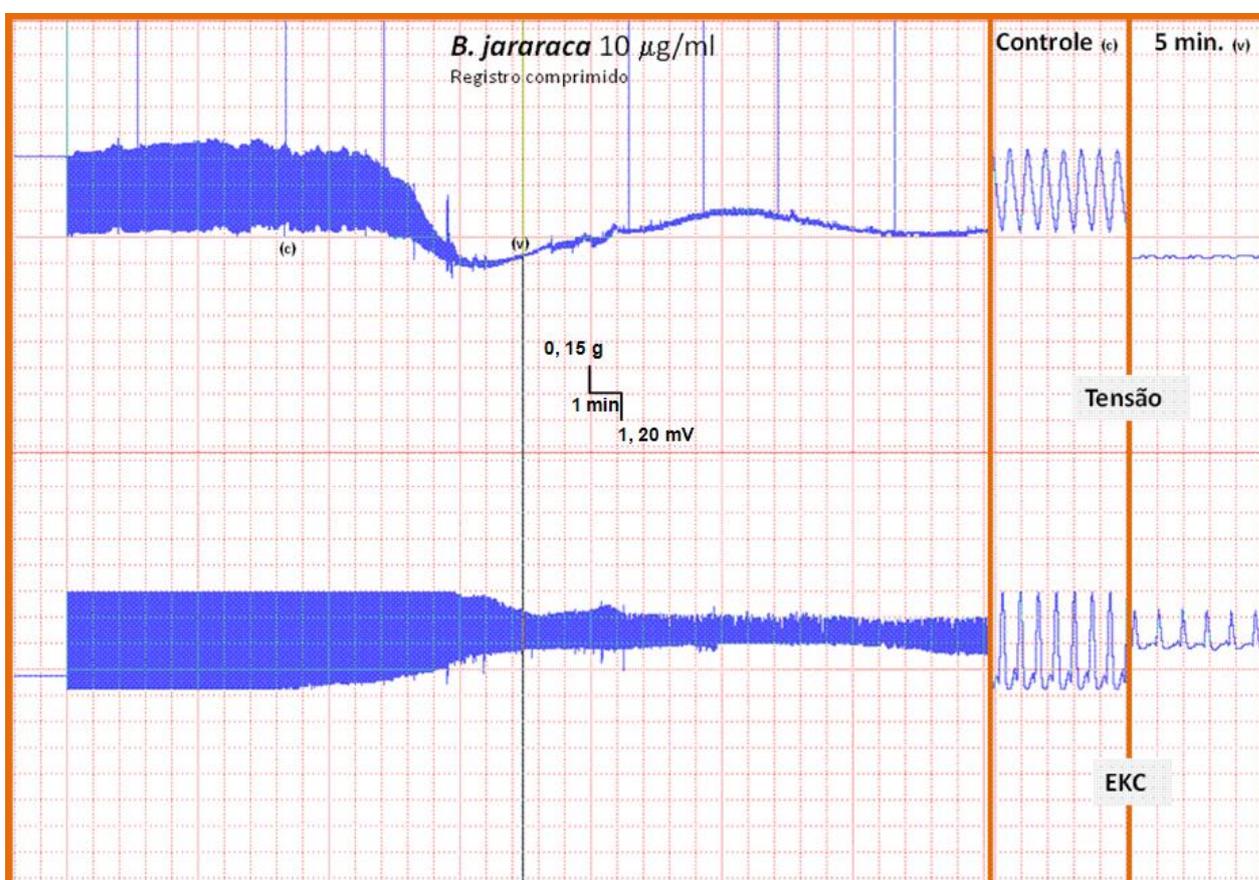
minutos de perfusão da solução na concentração 10,0  $\mu\text{g/mL}$  de veneno de *B. insularis* obtivemos somente a redução da tensão cardíaca. Após 42 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$  começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 16: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. insularis* (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

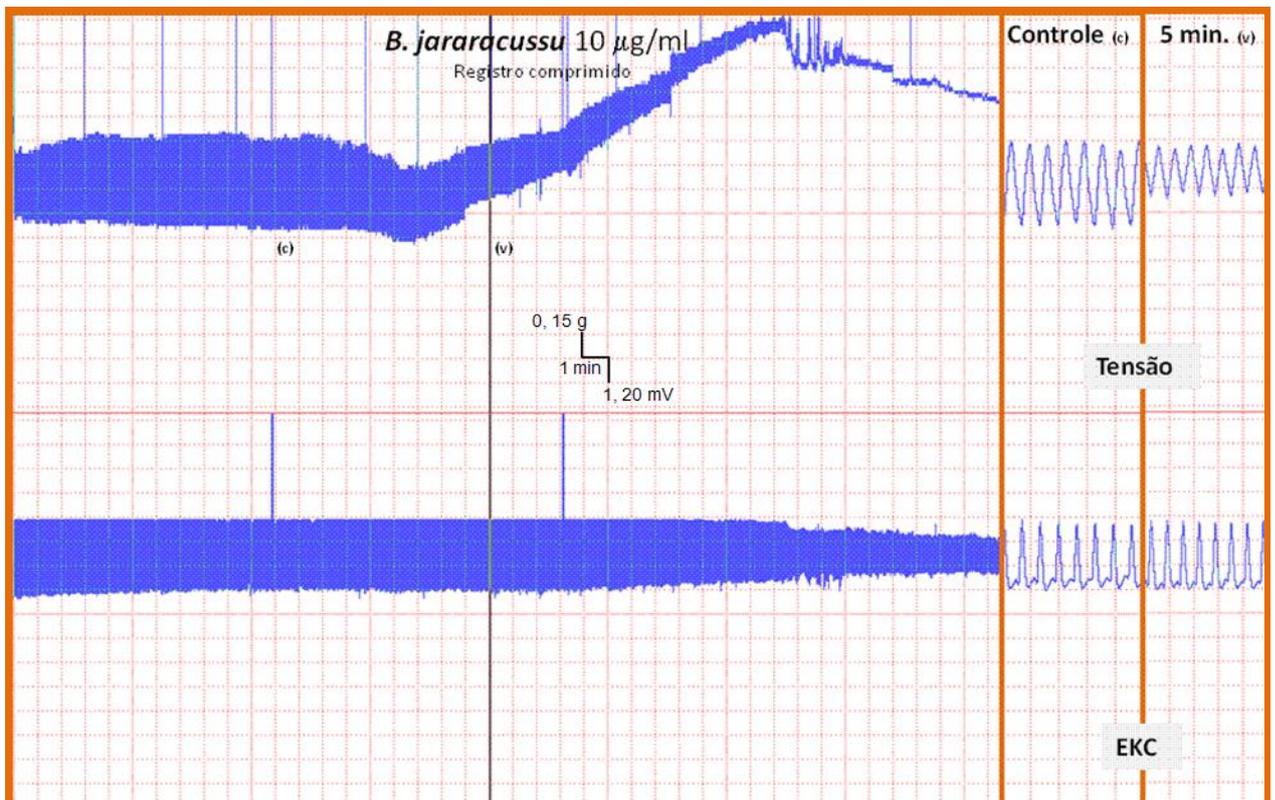
**Efeito do veneno de *B. jararaca* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.17; (c) final do período controle e (v) 5

minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão da solução na concentração 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de veneno de *B. jararaca* obtivemos as reduções da tensão cardíaca, da linha de base, da frequência cardíaca e da amplitude do complexo QRS. Após 10 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 17: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. jararaca* (10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

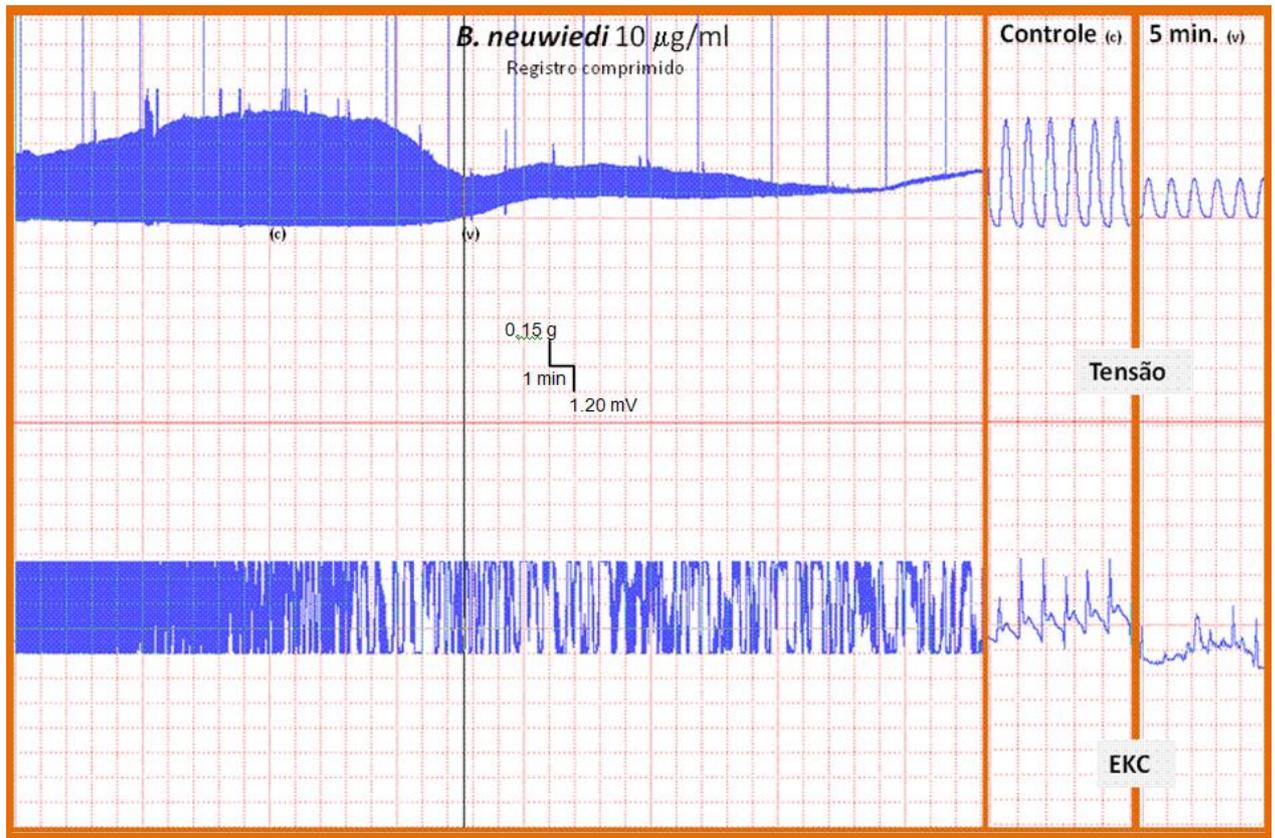
**Efeito do veneno de *B. jararacussu* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.18; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão da solução na concentração 10,0  $\mu\text{g/mL}$  de veneno de *B. jararacussu* obtivemos a redução da tensão cardíaca, contratura diastólica e aumento da frequência cardíaca. Após 40 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$  começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 18: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. jararacussu* (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) na tensão desenvolvida e no EKG.

Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

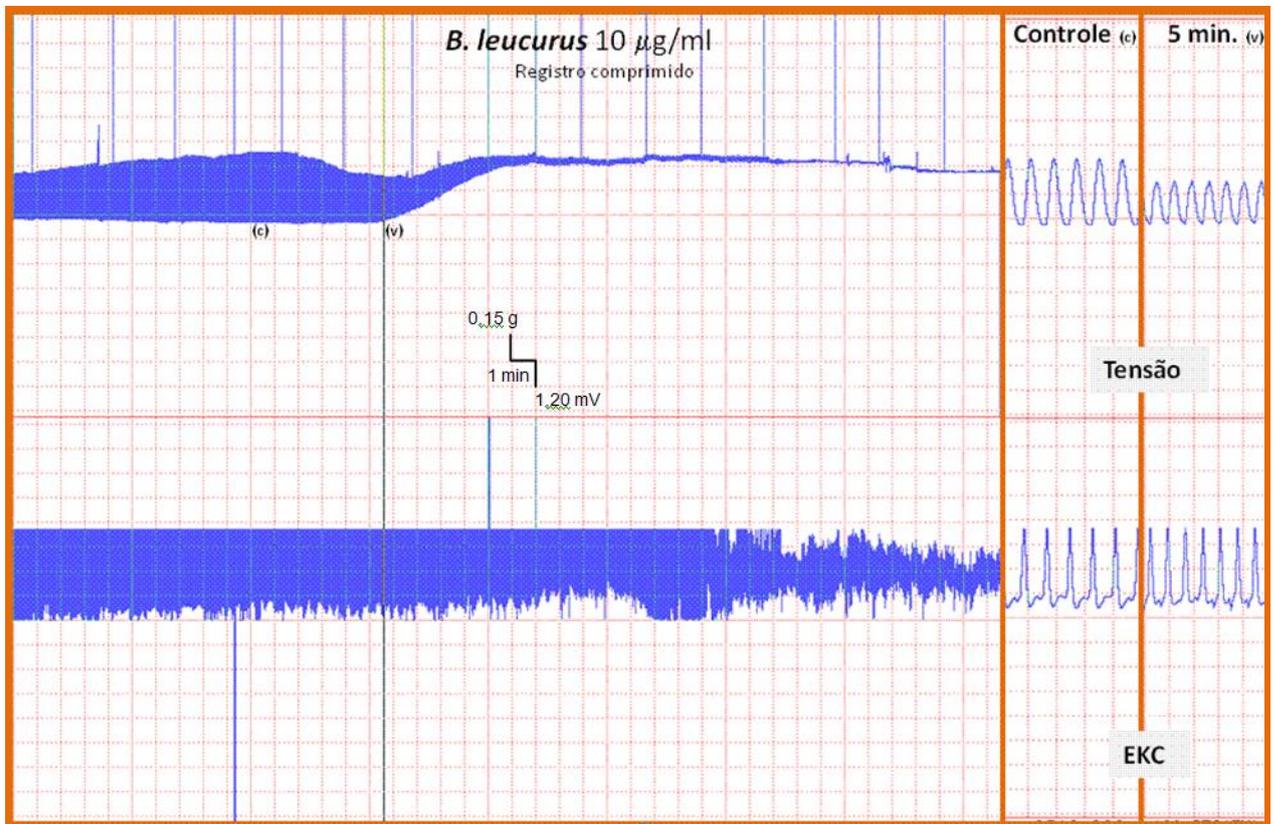
**Efeito do veneno de *B. neuwiedi* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.19; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão da solução na concentração 10,0 µg/mL de veneno de *B. neuwiedi* obtivemos a redução da tensão cardíaca, elevação da linha de base, reduções da frequência cardíaca e da amplitude do complexo QRS. Após 2 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0 µg/mL começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 19: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. neuwiedi* (10,0 µg/mL) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

**Efeito do veneno de *B. leucurus* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.20; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão da solução na concentração 10,0 µg/mL de veneno de *B. leucurus* obtivemos a redução da tensão cardíaca e aumento da frequência

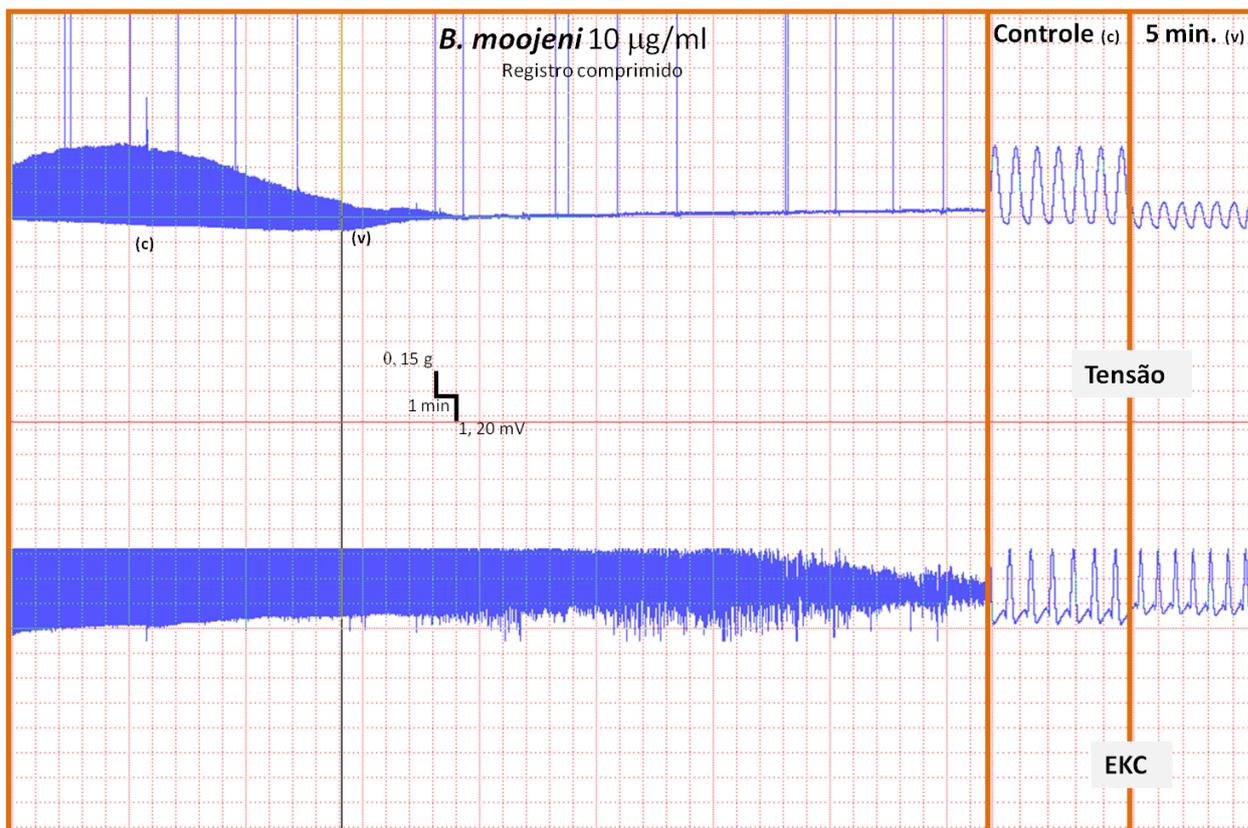
cardíaca. Após 40 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$  começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG e aumento da linha de base.



**Figura 20: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. leucurus* (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

**Efeito do veneno de *B. moojeni* no coração isolado de rato.** A tensão basal, obtida nos primeiros 30 minutos de experimento não sofreu modificação pela perfusão de solução de Ringer (fig.21; (c) final do período controle e (v) 5 minutos de perfusão do veneno). Observamos que após 5 minutos de perfusão

da solução na concentração 10,0  $\mu\text{g/mL}$  de veneno de *B. moojeni* obtivemos a redução da tensão cardíaca, diminuição da linha de base, aumento da frequência cardíaca e redução da amplitude do complexo QRS. Após 40 minutos do início da perfusão do veneno bruto na concentração de 10,0  $\mu\text{g/mL}$  começou a ocorrer alterações do ritmo no EKG.



**Figura 21: Registro simultâneo e condensado da tensão e EKG na montagem de Langendorff:** Esquerda: o registro compactado do efeito do veneno de *B. moojeni* (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) na tensão desenvolvida e no EKG. Direita: o registro descompactado no período controle (c) e 5 minutos de perfusão de veneno (v).

Todos os dez venenos brutos das espécies avaliadas induziram a redução da tensão desenvolvida em 5 minutos de perfusão (Tabela 1). A

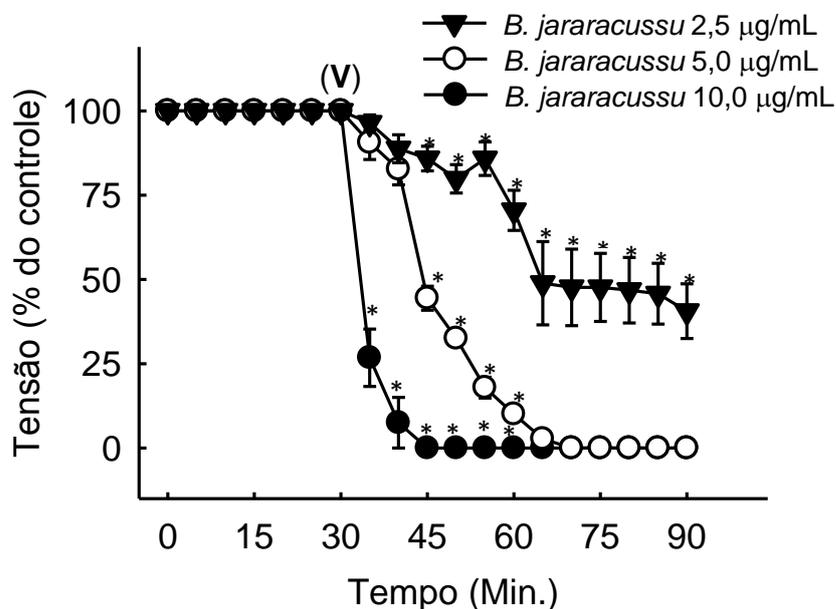
contratura diastólica foi promovida pelos venenos das espécies *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. alternatus*, *B. asper*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* e representam 50% do total das serpentes analisadas. Em relação à diminuição da linha de base ocorreu apenas em duas espécies *B. jararaca* e *B. moojeni* representando 20% das serpentes. A ocorrência de redução de frequência cardíaca aconteceu em 30% do total de amostras e ocorrem com os venenos das serpentes *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi*. O aumento da frequência, entretanto, ocorreu em 60% das espécies, sendo essas: *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. alternatus*, *B. asper*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. moojeni*. E por último, 50% dos venenos induziram a redução da amplitude do complexo QRS, sendo *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni* às espécies indutoras por esse efeito.

**Tabela1:** Alterações observadas nos registros de tensão e EKG em corações perfundidos por veneno bruto de dez espécies de serpentes.

Presença no 5º minuto	Tensão desenvolvida	Linha de base	Frequência cardíaca	Amplitude do complexo QRS
<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i> *	↓	↑	↑	↓
<i>B. alternatus</i>	↓	↑	↑	∅
<i>B. asper</i>	↓	↑	↑	∅
<i>B. atrox</i>	↓	∅	↓	↓
<i>B. insularis</i>	↓	∅	∅	∅
<i>B. jararaca</i>	↓	↓	↓	↓
<i>B. jararacussu</i>	↓	↑	↑	∅
<i>B. neuwiedi</i>	↓	↑	↓	↓
<i>B. leucurus</i>	↓	∅	↑	∅
<i>B. moojeni</i>	↓	↓	↑	↓

Redução(↓), aumento (↑) e não ocorreu alteração(∅).

**Efeito das concentrações crescentes do veneno bruto de *B. jararacussu* sobre a tensão desenvolvida em coração isolado de rato.** A redução da tensão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 22, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *B. jararacussu* obtivemos diferentes valores da redução da tensão em função da variação da concentração. Esse evento ocorreu de maneira mais rápida e mais acentuada quanto maior a concentração do veneno bruto perfundido. Dessa maneira, com 5 minutos de perfusão na concentração de 10,0 µg/mL apenas 27% da amplitude da tensão desenvolvida estava presente, com a concentração de 5,0 µg/mL apenas 18% de amplitude de tensão estava preservada após 25 minutos de perfusão e com 2,5 µg/mL de concentração e passados 30 minutos de perfusão de veneno ainda tínhamos 49% de amplitude de tensão relativa.

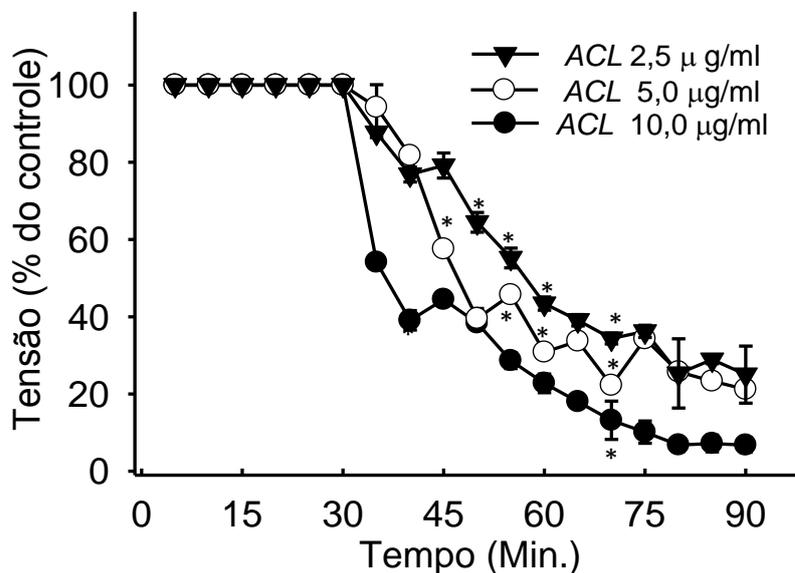


**Figura 22: Efeito do veneno de *B. jararacussu* em coração isolado de rato.**

Ordenada: Tensão cardíaca, expressa em % do controle em coração de rato isolado e perfundido com solução nutritora contendo veneno de *B. jararacussu*

nas concentrações: 2,5 µg/mL (▼); 5,0 µg/mL (○); 10,0 µg/mL (●). Abscissa: tempo de perfusão com as diferentes concentrações do veneno. Os dados estão expressos como % da tensão controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo o veneno (V) nas diferentes concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 – ANOVA com pós-teste Tukey. \*a partir do 35º minuto).

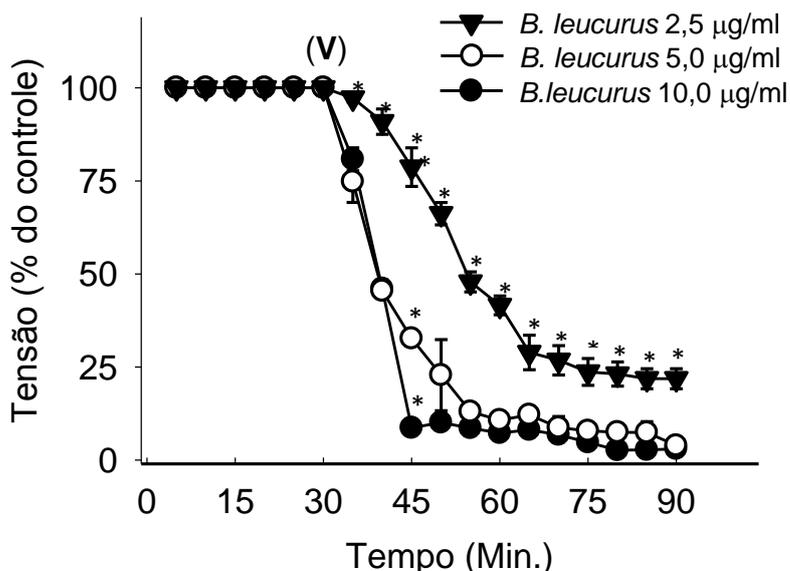
**Efeito das concentrações crescentes do veneno bruto de *Agkistrodon contortrix laticinctus* sobre a tensão desenvolvida em coração isolado de rato.** A redução da tensão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 23, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* obtivemos diferentes valores de redução da tensão em função da variação da concentração. Esse evento ocorreu de maneira mais rápida e mais acentuada quanto maior a concentração do veneno bruto perfundido. Dessa maneira, com 5 minutos de perfusão na concentração de 10,0 µg/mL apenas 54% da amplitude da tensão desenvolvida estava presente, com a concentração de 5,0 µg/mL apenas 40% de amplitude de tensão estava preservada após 20 minutos de perfusão e com 2,5 µg/mL de concentração e passados 35 minutos de perfusão de veneno ainda tínhamos 39% de amplitude de tensão relativa.



**Figura 23: Efeito do veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (*Agkistrodon contortrix laticinctus*) em coração isolado de rato.** Ordenada: Tensão cardíaca, expressa em % do controle em coração de rato isolado e perfundido com solução nutritora contendo veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* nas concentrações: 2,5 µg/mL (▼); 5,0 µg/mL (○); 10,0 µg/mL (●). Abscissa: tempo de perfusão com as diferentes concentrações do veneno. Os dados estão expressos como % da tensão controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo o veneno (V) nas diferentes concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 – ANOVA com pós-teste Tukey. \*a partir do 35º minuto).

**Efeito das concentrações crescentes do veneno bruto de *B. leucurus* sobre a tensão desenvolvida em coração isolado de rato** A redução da tensão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 24, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *B. leucurus* obtivemos diferentes medidas de redução da tensão em função da variação da concentração. Esse evento ocorreu de maneira mais rápida e mais acentuada quanto maior a concentração do veneno bruto perfundido. Dessa maneira, com 15 minutos de perfusão na concentração de 10,0 µg/mL apenas

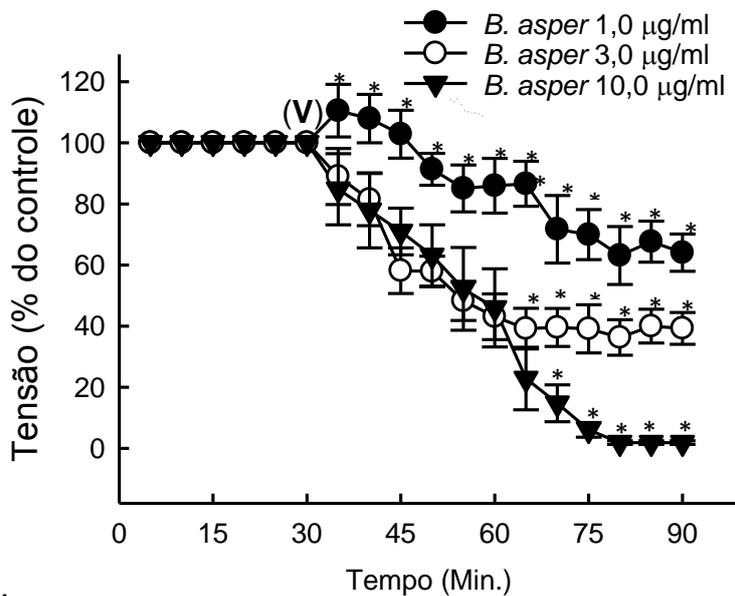
9% da amplitude da tensão desenvolvida estava presente, com a concentração de 5,0 µg/mL apenas 8% de amplitude de tensão estava preservada após 40 minutos de perfusão e com 2,5 µg/mL de concentração e passados 60 minutos de perfusão de veneno ainda tínhamos 21% de amplitude de tensão relativa.



**Figura 24: Efeito do veneno de *B. leucurus* em coração isolado de rato.** Ordenada: Tensão cardíaca, expressa em % do controle em coração de rato isolado e perfundido com solução nutritora contendo veneno de *B. leucurus* nas concentrações: 2,5 µg/mL (▼); 5,0 µg/mL (○); 10,0 µg/mL (●). Abscissa: tempo de perfusão com as diferentes concentrações do veneno. Os dados estão expressos como % da tensão controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo o veneno (V) nas diferentes concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 – ANOVA com pós-teste Tukey. \*a partir do 35º minuto).

**Efeito das concentrações crescentes do veneno bruto de *B. asper* sobre a tensão desenvolvida em coração isolado de rato.** A redução da tensão foi

uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 25, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *B. asper* obtivemos diferentes graus de redução da tensão em função da variação da concentração. Esse evento ocorreu de maneira mais rápida e mais acentuada quanto maior a concentração do veneno bruto perfundido. Dessa maneira, com 45 minutos de perfusão na concentração de 10,0 µg/mL apenas 6% da amplitude da tensão desenvolvida estava presente, com a concentração de 3,0 µg/mL apenas 39% de amplitude de tensão estava preservada após 45 minutos de perfusão e com 1,0 µg/mL de concentração observamos a curva bifásica e com 45 minutos de perfusão de veneno ainda observamos 70% de amplitude de tensão relativa.

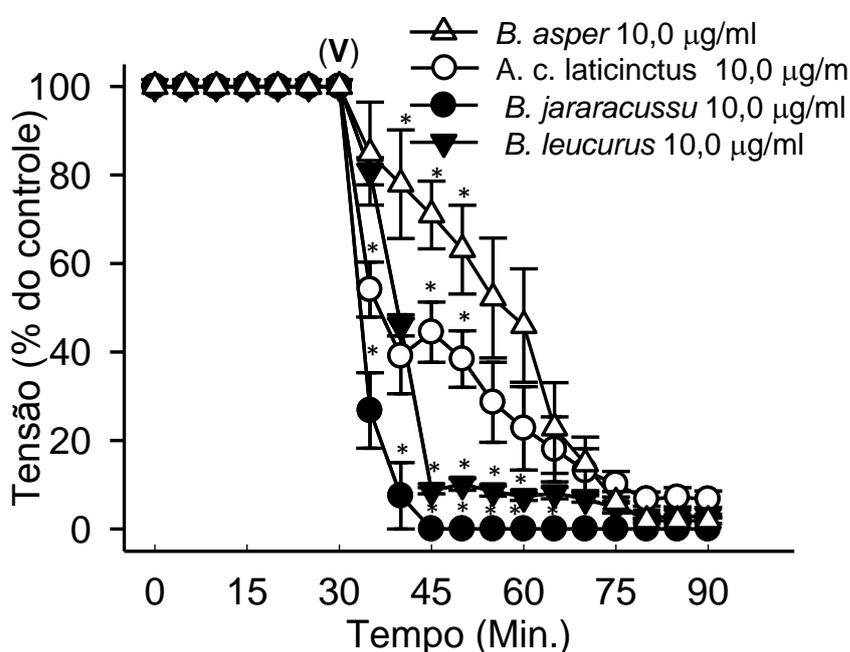


**Figura 25: Efeito do veneno de *B.Asper* em coração isolado de rato.**

Ordenada: Tensão cardíaca, expressa em % do controle em coração de ratos isolados perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* nas concentrações: 1,0 µg/mL (●); 3,0 µg/mL (○); 10,0 µg/mL (▼). Abscissa: tempo de perfusão com as diferentes concentrações do veneno. Os dados estão expressos como % da tensão controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo o veneno (V) nas diferentes concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 – ANOVA com pós-teste Tukey.\*a partir do 35º minuto).

**Efeitos dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* em coração isolado de rato.** A redução da tensão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 26, observamos que após 60 minutos de perfusão dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* obtivemos

diferentes graus de redução da tensão em função do tempo. A redução da tensão de 73% foi induzida em 5 minutos pelo veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração de 10,0 µg/mL, o veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* reduziu a tensão em 71% após 25 minutos de perfusão, a peçonha de *B. leucurus* reduziu a tensão em 74% em 15 minutos após o início da perfusão e o veneno de *B. asper* 77% após 35 minutos.

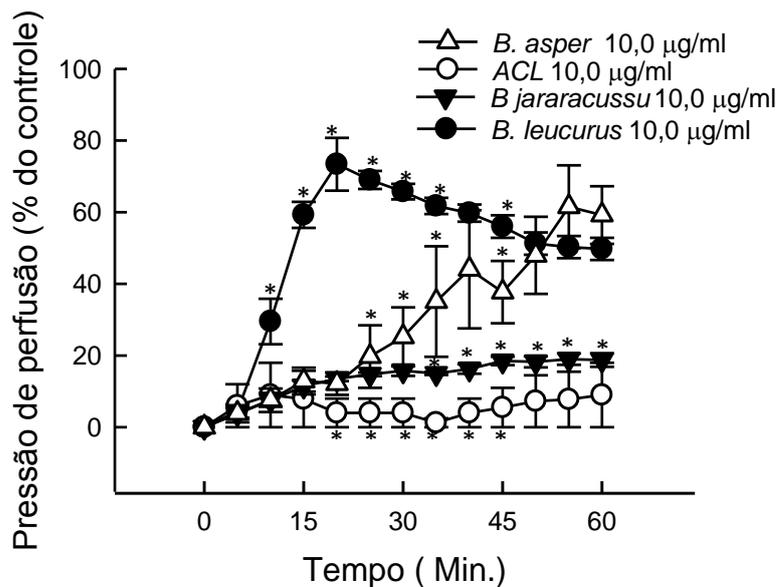


**Figura 26: Efeitos dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* em coração isolado de rato.**

Ordenada: Tensão cardíaca, expressa em % do controle em coração de ratos isolados perfundidos com solução nutritiva contendo veneno de *B. asper* na concentração: 10,0 µg/mL (Δ); veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* na concentração: 10,0 µg/mL (○); veneno de *B. jararacussu* na concentração: 10,0 µg/mL (●) e veneno de *B. leucurus* na concentração: 10,0 µg/mL (▼). Abscissa: tempo de perfusão com as diferentes concentrações do veneno. Os dados

estão expressos como % da tensão controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo o veneno (V) nas diferentes concentrações. Os valores expressam à média  $\pm$  EPM (n = 4, \* p < 0.05 – ANOVA com pós-teste Tukey. \*a partir do 35<sup>o</sup> minuto).

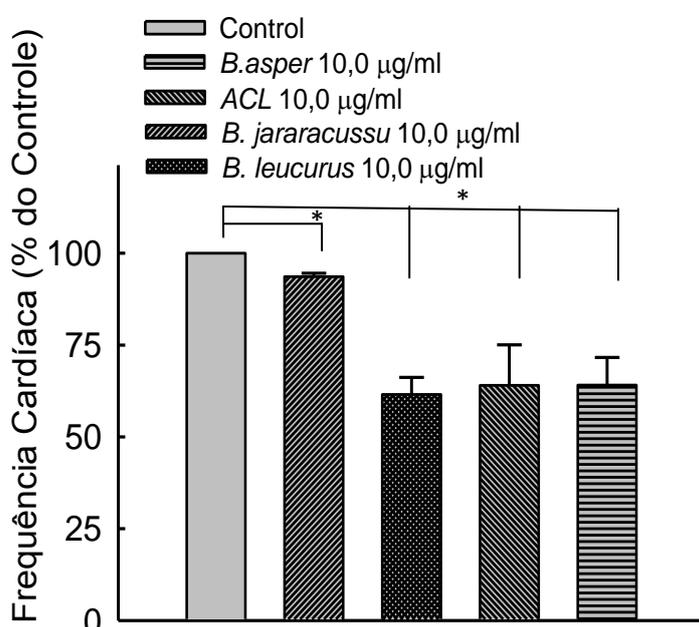
**Efeitos dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* na pressão de perfusão em coração isolado de rato.** O aumento da pressão de perfusão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* obtivemos diferentes valores de aumento da pressão de perfusão. Na figura 27, o aumento da pressão de perfusão foi induzido por todos os venenos na concentração de 10,0  $\mu$ g/mL. O veneno bruto *B. leucurus* na concentração de 10,0  $\mu$ g/mL induziu o aumento máximo de pressão 69% no vigésimo minuto de perfusão, depois ocorreu uma pequena redução. A peçonha de *Agkistrodon contortrix laticinctus* na concentração 10,0  $\mu$ g/mL gerou o aumento máximo médio de 6% de pressão em 60 minutos, a *B. jararacussu* na concentração de 10,0  $\mu$ g/mL gerou o aumento de pressão máxima 19.0 % no quinquagésimo quinto minuto de perfusão e *B. asper* na concentração 10,0  $\mu$ g/mL promoveu o aumento máximo 61% no quinquagésimo quinto minuto de perfusão.



**Figura 27: Efeitos dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* na pressão de perfusão em coração isolado de rato.** Ordenada: A Pressão de Perfusão expressa em % de aumento do valor basal em corações de ratos isolados perfundidos com solução nutritora contendo venenos de *B. asper* 10,0 µg/mL (Δ); veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* 10,0 µg/mL (O); veneno de *B. jararacussu* 10,0 µg/mL (▼); *B. leucurus* 10,0 µg/mL (●). Abscissa: tempo de perfusão. Os dados estão expressos como % do controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo os diferentes venenos nas mesmas concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA com pós-teste Tukey \*a partir do 10<sup>o</sup> minuto).

**Efeitos dos venenos brutos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* na frequência cardíaca em coração isolado de rato.** A diminuição da frequência cardíaca foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos

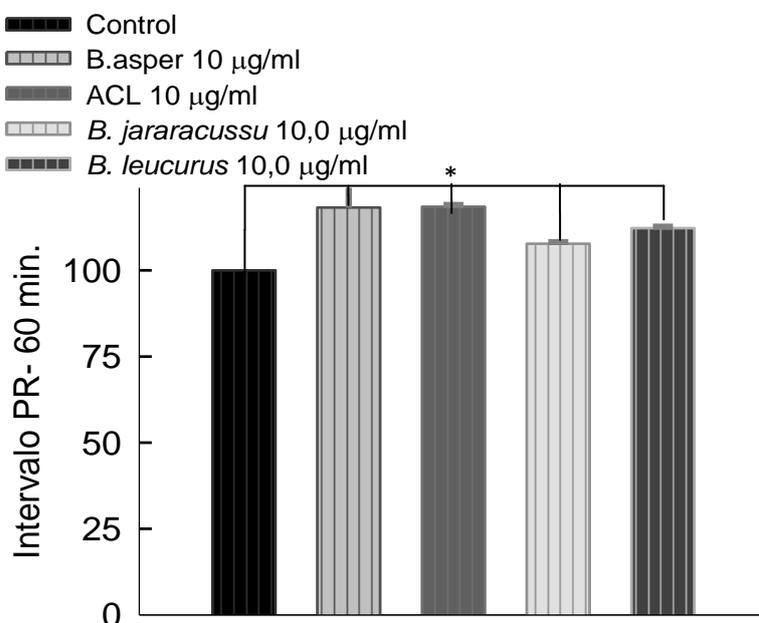
de perfusão dos venenos brutos na concentração de 10,0 µg/mL de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* fizemos a análise da diminuição da frequência cardíaca. Na figura 28, observamos diferentes diminuições da frequência cardíaca com 60 minutos de perfusão dos venenos brutos. As diminuições da frequência cardíaca foram de 7% do veneno de *B. asper*, 39% da peçonha de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, a redução do veneno de *B. jararacussu* foi de 37% e *B. leucurus* reduziu em 36%.



**Figura 28: Efeitos dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* na frequência cardíaca em coração isolado de rato.** A Frequência Cardíaca é expressa em % da redução do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* 10,0 µg/mL; veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* 10,0 µg/mL; veneno de *B. jararacussu* 10,0 µg/mL; *B.*

*leucurus* 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os valores expressam à média  $\pm$  EPM ( $n = 4$ , \*  $p < 0.05$  - ANOVA pós-teste Tukey).

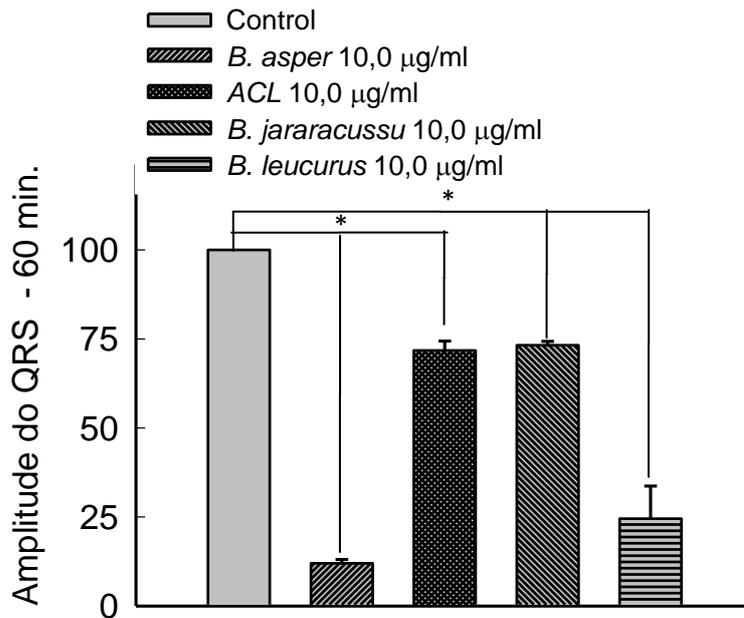
**Efeitos da *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* no intervalo PR do EKG em coração isolado de rato.** O aumento do intervalo PR foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Com 20 minutos fizemos a análise do intervalo PR. Na figura 29, observamos que aos 20 minutos de perfusão dos venenos brutos da *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* obtivemos aumentos do intervalo PR. Os aumentos do intervalo PR foram observados quando perfundimos o veneno *B. asper* na concentração de 10,0 e ocorreu o aumento de 18%, o veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* promoveu 12% de aumento, a peçonha de *B. jararacussu* gerou aumento de 8% e o veneno de *B. leucurus* induziu o aumento de 19%.



**Figura 29: Efeitos dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* no intervalo PR em coração**

**isolado de rato** O intervalo PR é expresso em % da alteração do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliado no tempo de 20 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* 10,0 µg/mL; veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* 10,0 µg/mL; veneno de *B. jararacussu* 10,0 µg/mL; *B. leucurus* 10,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

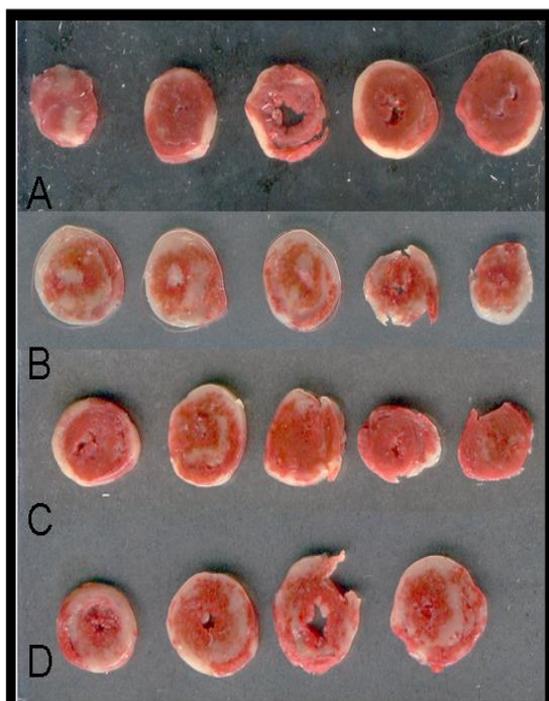
**Efeitos *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* na amplitude do complexo QRS do EKG em coração isolado de rato.** A diminuição da amplitude QRS foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Com 60 minutos fizemos a análise da amplitude do QRS. Na figura 30, observamos que aos 60 minutos de perfusão com os venenos brutos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* promoveram reduções nas amplitudes do complexo QRS. A diminuição da amplitude do complexo QRS do veneno de *B. asper* na concentração de 10,0 µg/mL foi de 12%, a peçonha de *Agkistrodon contortrix laticinctus* promoveu uma redução de 29%, o veneno de *B. jararacussu* reduziu em 27% e a peçonha de *B. leucurus* diminui em 74%.



**Figura 30: Efeitos dos venenos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* na amplitude do complexo QRS do EKG em coração isolado de rato.** A amplitude do complexo QRS é expressa em % da redução do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritiva contendo veneno de *B. asper* 10,0 µg/mL; veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus* 10,0 µg/mL; veneno de *B. jararacussu* 10,0 µg/mL; *B. leucurus* 10,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

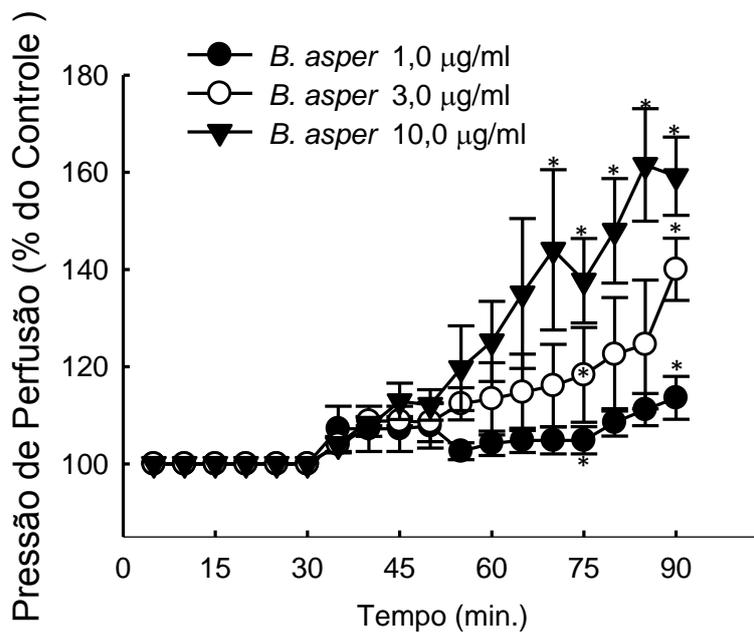
**Análise do mapeamento enzimático macroscópico dos corações expostos aos venenos brutos de *B. asper*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. jararacussu* e *B. leucurus* na concentração de 10,0 µg/mL.** As marcações forem realizadas nos corações após serem expostos ao protocolo na montagem de Langendorff modificado. Na figura 31, a exposição ao veneno de *B. leucurus* na concentração de 10,0 µg/mL demonstra lesões nas regiões mais

externa da parede cardíaca. Os padrões de lesões difusas foram semelhantes nos venenos de *B. jararacussu* e *Agkistrodon contortrix laticinctus* na concentração de 10,0 µg/mL e o padrão produzido pela peçonha de *B. asper* poderia ser considerado intermediário aos outros venenos na mesma concentração quando comparado por essa técnica de marcação.



**Figura 31: Mudanças morfológicas observadas com a marcação com TTC. (A)** marcação da região vermelha (presença da enzima desidrogenase láctica) mais central e periféricamente as regiões em branco (ausência da enzima) produzido pelo veneno bruto de *B.leucurus*; **(B)** marcação da região vermelha (presença da enzima desidrogenase láctica) e as regiões em branco (ausência da enzima) sem um padrão bem definido produzido pelo veneno bruto de *B. jararacussu*; **(C)** marcação da região vermelha (presença da enzima desidrogenase láctica) mais central e periféricamente as regiões em branco (ausência da enzima) produzido pelo veneno bruto de *B.asper*; **(D)** marcação da região vermelha (presença da enzima desidrogenase láctica) e as regiões em branco de forma não padronizada (ausência da enzima) produzido pelo veneno bruto de *Agkistrodon contortrix laticinctus*.

**Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na pressão de perfusão em coração isolado de rato.** O aumento da pressão de perfusão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 32, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *B. asper* obtivemos aumento da pressão de perfusão que foram dependentes da concentração do veneno. O aumento da pressão de perfusão de 15% ocorreu no último minuto de experimento na concentração na 1,0 µg/mL, na concentração de 3,0 µg/mL o aumento foi de 40% e na concentração de 10,0 µg/mL a elevação da pressão foi de 59%.

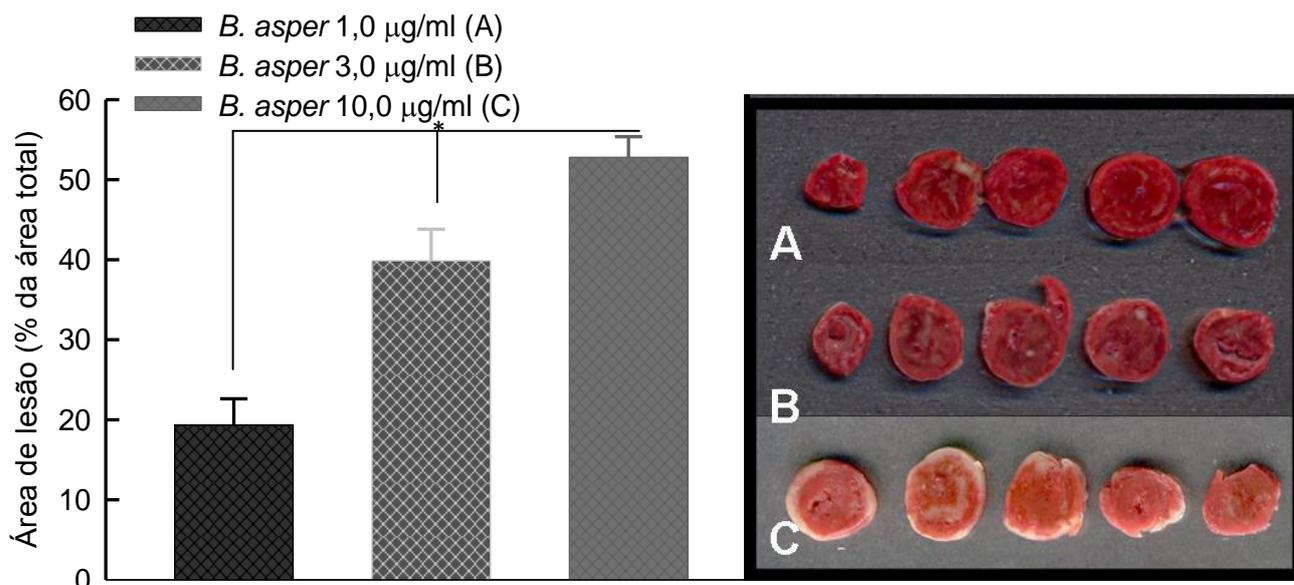


**Figura 32: Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na pressão de perfusão em coração isolado de rato.**

Ordenada: A pressão de perfusão expressa em % de aumento do valor basal em corações de ratos isolados perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* nas concentrações de 1,0 µg/mL (●), 3,0 µg/mL (○) e 10,0 µg/mL (▼). Abscissa: tempo de perfusão. Os dados estão expressos como % do controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo os diferentes venenos nas mesmas concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey \*a partir do 10º minuto).

**Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na geração de área de lesão em fatias de coração isolado de rato.** O aumento da área de lesão foi uma medida relativa à área total das fatias. Na figura 33, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno

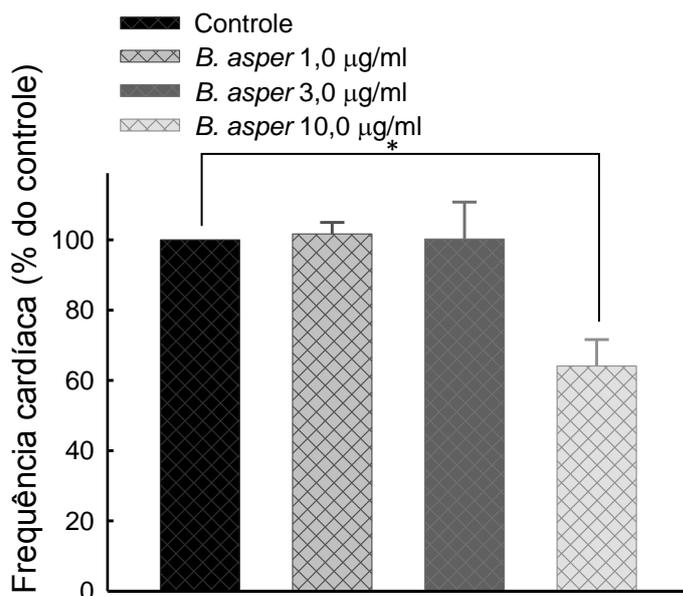
de *B. asper* em corações isolados obtivemos aumento da área de lesão que foi dependente da concentração do veneno. A área de lesão de 19% foi promovida na concentração de 1,0 g/mL, na concentração de 3,0 g/mL a área de lesão foi de 39% e na concentração de 10,0 g/mL de veneno chegou a 53% da área total avaliada.



**Figura 33: Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na geração de área de lesão em fatias de coração isolado de rato.** A área de lesão é expressa em % da área total das fatias dos corações. Esses foram isolados dos ratos e perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* 1,0 µg/mL; 3,0 µg/mL e 10,0µg/mL. Os valores expressam à média  $\pm$  EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

**Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na frequência cardíaca em coração isolado de rato.** A diminuição da frequência cardíaca foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos de perfusão do veneno

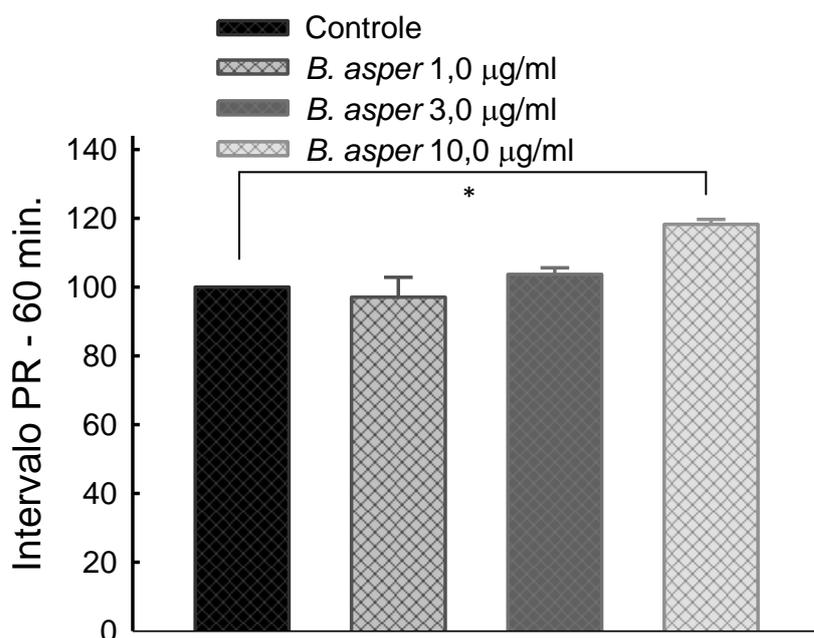
bruto de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL fizemos a análise da diminuição da frequência cardíaca. Na figura 34, a diminuição de 65% da frequência cardíaca somente foi observada quando perfundimos o veneno bruto de *B. asper* na concentração de 10,0 µg/mL e não ocorreu diminuições nas concentrações de 1,0 µg/mL e 3,0 µg/mL.



**Figura 34: Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na frequência cardíaca em coração isolado de rato.** A frequência cardíaca é expressa em % da redução do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* 1,0 µg/mL; 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 – Teste t não pareado).

**Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL no intervalo PR do EKG em coração isolado de rato.** O aumento do intervalo PR foi uma medida relativa ao valor obtido no último

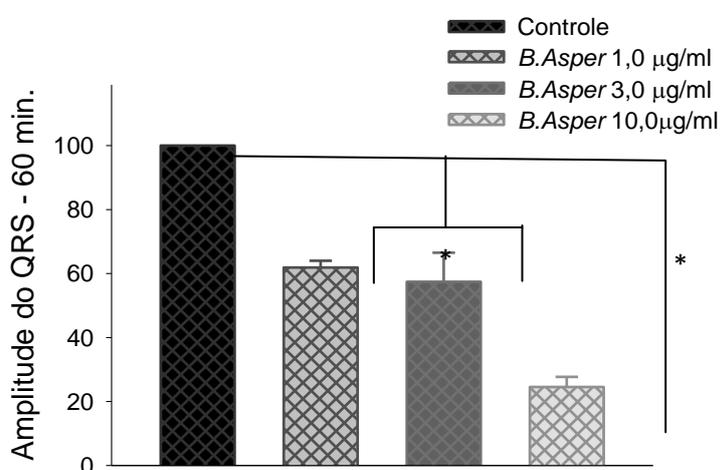
minuto do período controle. Com 60 minutos de perfusão do veneno bruto de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL fizemos a análise do aumento do intervalo PR. Na figura 35, o aumento do intervalo PR de 19% somente foi observado quando perfundimos o veneno bruto de *B. asper* na concentração de 10,0 µg/mL e não ocorreu diferenças significativas nas concentrações de 1,0 µg/mL e 3,0 µg/mL.



**Figura 35: O efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL no intervalo PR do EKG em coração isolado de rato.** O intervalo PR é expresso em % do aumento do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliado no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* 1,0 µg/mL; 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

**Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na amplitude do complexo QRS do EKG em coração isolado**

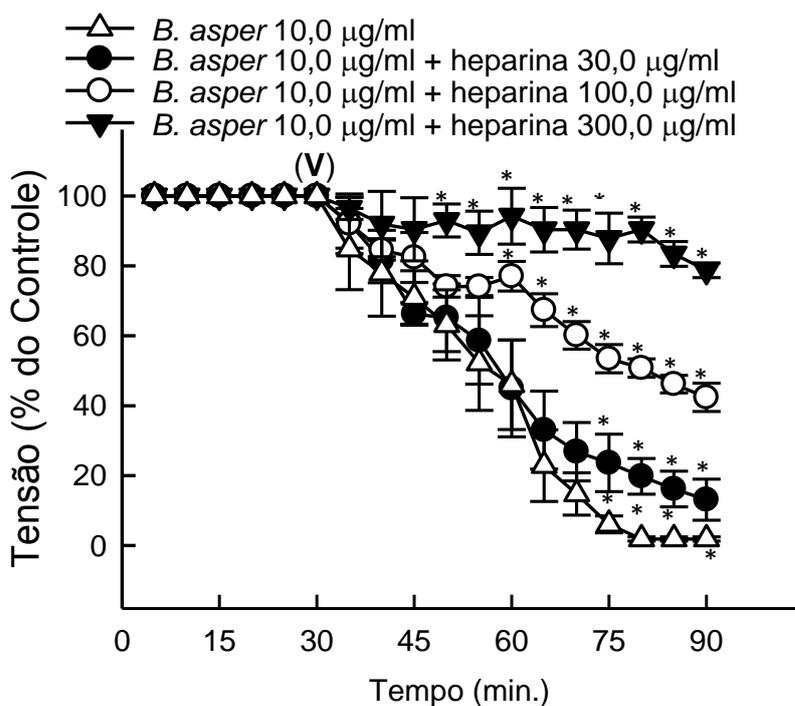
**de rato.** A redução da amplitude do complexo QRS foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos de perfusão do veneno bruto de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL fizemos a análise da amplitude do complexo QRS. Na figura 36, a redução de 38% da amplitude do QRS na concentração de 1,0 µg/mL do veneno bruto de *B. asper* foi observada, na concentração de 3,0 µg/mL a redução foi de 43% e na concentração de 10,0 µg/mL foi de 75%.



**Figura 36: Efeito do veneno de *B. asper* nas concentrações 1,0 µg/mL, 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL na amplitude do complexo QRS do EKG em coração isolado de rato.** A amplitude do complexo QRS é expressa em % da redução do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* 1,0 µg/mL; 3,0 µg/mL e 10,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

**Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL é na tensão desenvolvida em coração isolado de rato antagonizado pela heparina nas**

concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. A redução da tensão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Observamos que após 60 minutos de perfusão dos venenos de *B. asper*, *B. asper* x heparina nas concentrações de 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL obtivemos diferentes medidas da redução da tensão em função do tempo. Na figura 37, a redução da tensão foi induzida em diferentes tempos pelo veneno bruto ou quando associado à heparina. A peçonha de *B. Asper* na concentração de 10,0 µg/mL reduziu em 94% a tensão com 50 minutos de perfusão. Em outro grupo associamos a mesma concentração de veneno a heparina na concentração de 30,0 µg/mL e ocorreu a redução de 76% da tensão nos 45 minutos. O aumento da concentração de heparina para 100,0 µg/mL junto com o veneno diminui em 23% a tensão após 30 minutos e 300,0 µg/mL de heparina perfundido com a peçonha na concentração de 10,0 µg/mL reduziu em 19% a tensão ao final do experimento.

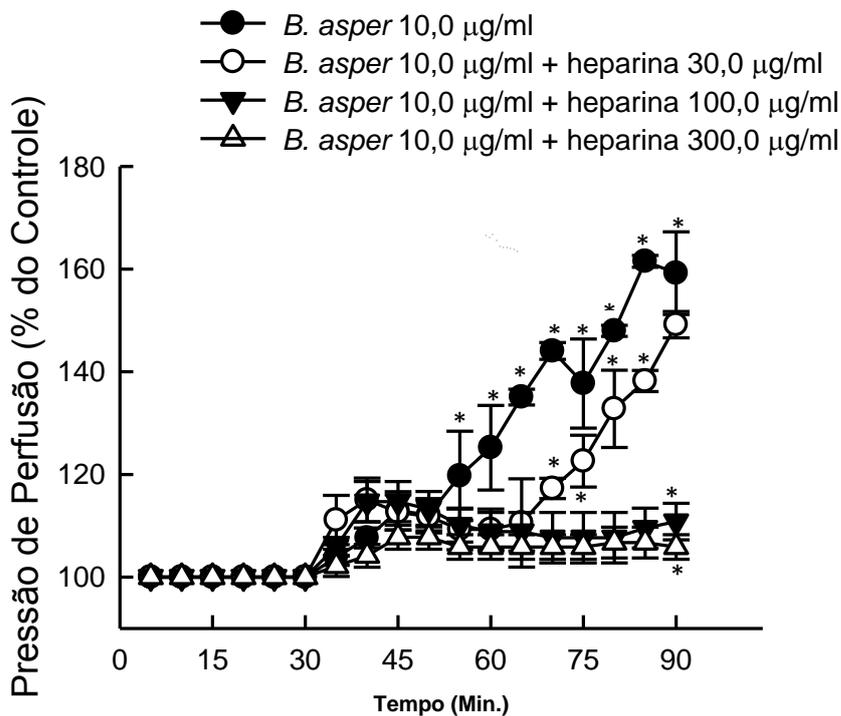


**Figura 37: Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na tensão desenvolvida em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.**

Ordenada: Tensão cardíaca, expressa em % do controle em coração de ratos isolado perfundido com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL ( $\Delta$ ); *B. asper* 10,0 µg/mL x heparina na concentração de 30,0 µg/mL ( $\bullet$ ); *B. asper* 10,0 µg/mL x heparina na concentração de 100,0 µg/mL ( $\circ$ ) e *B. asper* 10,0 µg/mL x heparina na concentração de 300,0 µg/mL ( $\blacktriangledown$ ). Abscissa: tempo de perfusão com as diferentes concentrações do veneno. Os dados estão expressos como % da tensão controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo o veneno (**V**) nas diferentes concentrações. Os valores expressam à média  $\pm$  EPM (n = 4, \* p < 0.05 – ANOVA pós-teste Tukey. \*a partir do 35<sup>o</sup> minuto).

**Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na pressão de perfusão em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** O aumento da pressão de perfusão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 38, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *B. asper* ocorreu elevação da pressão de perfusão e quando associamos ao veneno bruto a heparina em concentrações crescentes obtivemos reduções do aumento da pressão de perfusão. O aumento da pressão de perfusão foi de 60% após 60 minutos de perfusão da peçonha na concentração de 10,0 µg/mL. Quando essa concentração de veneno foi associada com heparina na concentração de 30,0 g/mL ocorreu redução do

aumento da pressão de perfusão para 43% com 60 minutos de experimento. O aumento da concentração de heparina para 100,0 µg/mL associado ao veneno reduziu o aumento de pressão de perfusão para 9%. A concentração de 300,0 µg/mL heparina junto à peçonha reduziu esse aumento para 5% do valor do período controle.



**Figura 38: Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na pressão de perfusão em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** Ordenada: A pressão de perfusão expressa em % de aumento do valor basal em corações de ratos isolados perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* na concentração de 10,0 µg/mL (●), *B. asper* 10,0 µg/mL x heparina nas concentrações de 30,0 µg/mL (○), 100,0 µg/mL (▼) e 300,0 µg/mL (Δ). Abscissa: tempo de perfusão. Os dados estão expressos como % do controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo os diferentes venenos nas mesmas concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey \*a partir do 55º minuto).

Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na área de lesão em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. O aumento da área de lesão foi reduzido pela adição de concentrações crescentes de heparina ao veneno bruto e é uma medida relativa à área total das fatias escaneadas. Na figura 39, observamos a ocorrência de uma relação inversa, quanto maior a concentração de heparina associada ao veneno bruto de *B. asper* menor a área de lesão mensurada. A área de lesão foi de 50% quando induzida pelo veneno bruto na concentração de 10,0 µg/mL associado à heparina na concentração de 30,0 µg/mL, quando aumentamos a concentração para 100,0 µg/mL de heparina junto ao veneno mensuramos 17% de área de lesão e a associação da peçonha com heparina na concentração de 300,0 µg/mL medimos 2.5% de área de lesão.

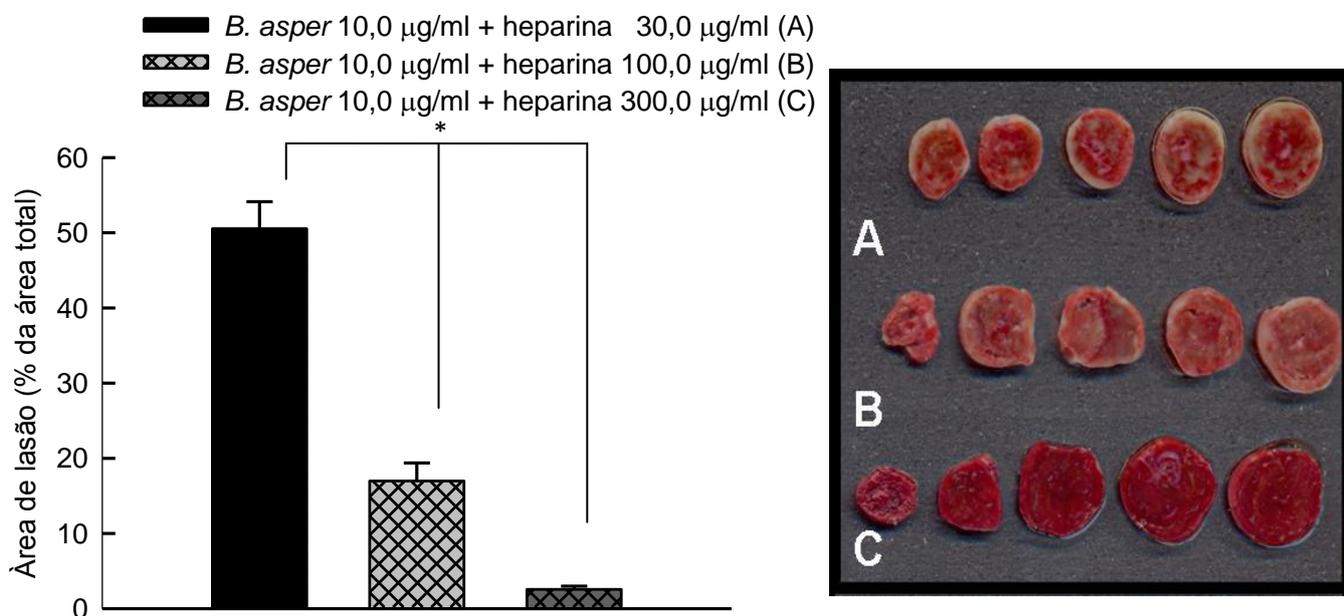
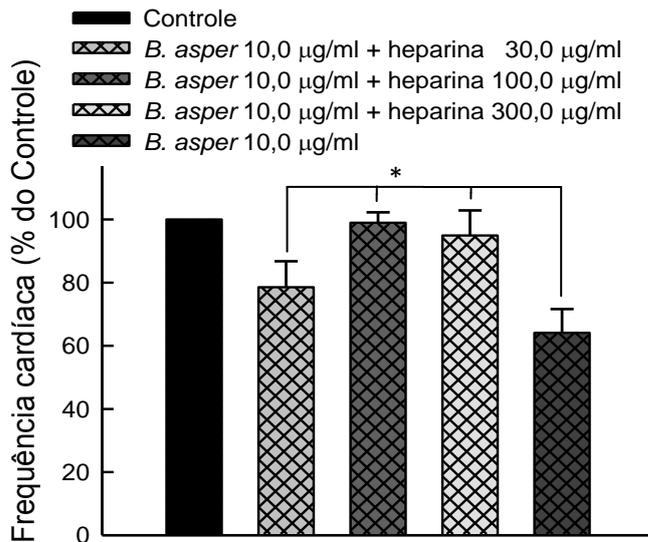


Figura 39: Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL é na área de lesão em coração isolado de rato antagonizado pela heparina nas

**concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** A área de lesão é expressa em % da área total das fatias dos corações. Esses são isolados dos ratos e perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

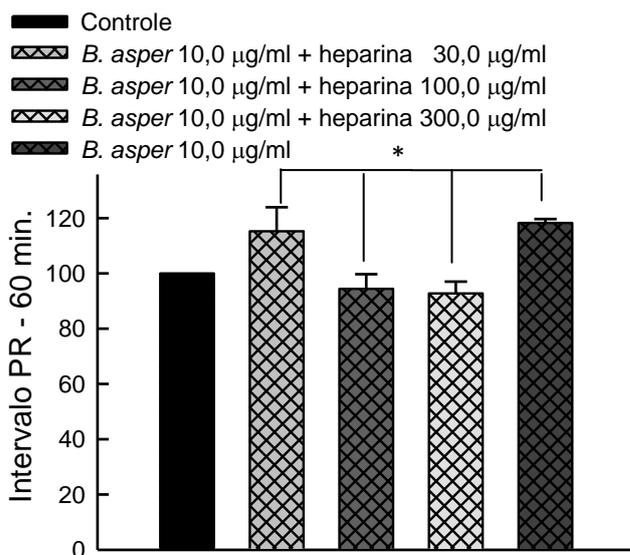
**Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na frequência cardíaca em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** Na figura 40, a diminuição da frequência cardíaca foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos fizemos a análise da frequência cardíaca: perfusão do veneno bruto de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL associado à heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. A redução da frequência cardíaca com a peçonha na concentração de 10,0 µg/mL foi de 65% (fig.34). Esse evento foi diminuído a 21% quando associado à heparina na concentração 30,0 µg/mL ao veneno de *B. asper*. O efeito redutor da frequência cardíaca promovido pelo veneno bruto foi completamente antagonizado pelas concentrações de heparina 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.



**Figura 40: Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na frequência cardíaca em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** A frequência cardíaca é expressa em % da redução do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritiva contendo veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

**Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL no intervalo PR do EKG em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** Na figura 41, o aumento do intervalo PR foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos fizemos a análise do intervalo PR: perfusão do veneno bruto de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL associado à heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. O

aumento do intervalo PR de 19% foi observado quando perfundimos somente o veneno bruto de *B. asper* na concentração de 10,0 µg/mL (fig.35). Esse evento foi reduzido para 15% quando perfundimos associado com heparina 30,0 µg/mL e totalmente antagonizado quando associado com as concentrações de 100,0 e 300,0 de heparina ao veneno.



**Figura 41: Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL no intervalo PR do EKG em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. O intervalo PR é expresso em % do aumento do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliado no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL associado à heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).**

**Efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na amplitude do complexo QRS do EKG em coração isolado de rato antagonizado é pela**

heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. Na figura 42, a redução da amplitude do complexo QRS foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos fizemos a análise da redução da amplitude do complexo QRS: perfusão do veneno bruto de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL associado à heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. A redução da amplitude do complexo QRS foi de 75% quando perfundimos o veneno bruto de *B. asper* na concentração de 10,0 µg/mL. A associação à heparina na concentração de 30,0 µg/mL reduziu o efeito promovido pela peçonha para 51% de redução, o aumento para 100,0 µg/mL de heparina reduziu para 30% de redução do complexo QRS e na concentração de 300,0 µg/mL o efeito foi de 10%.

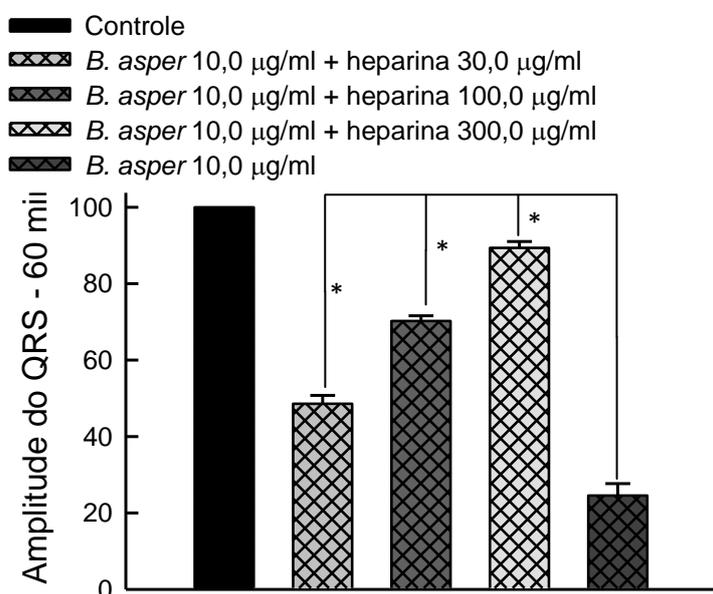
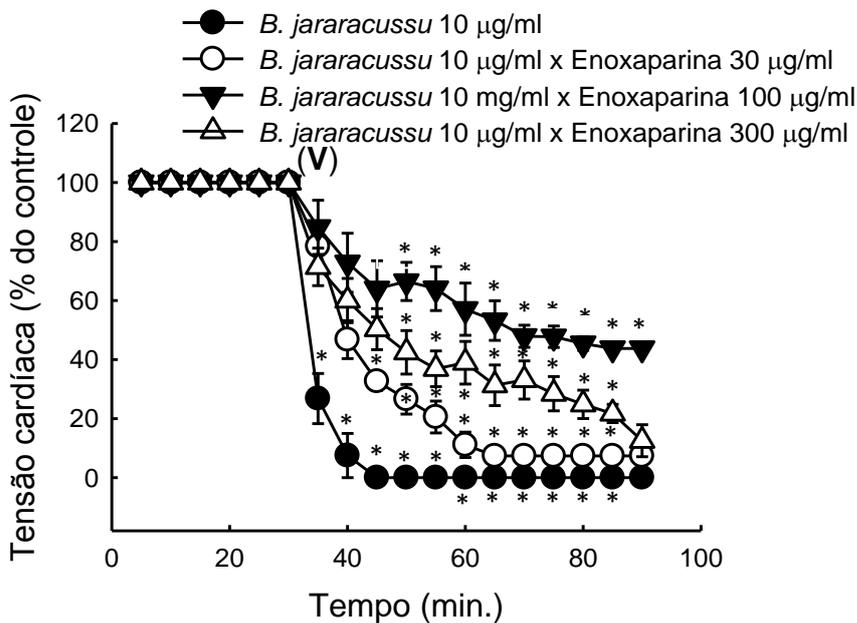


Figura 42: O efeito do veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL na amplitude do QRS do EKG em coração isolado de rato é antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.

A amplitude do complexo QRS é expressa em % da redução do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. asper* na concentração 10,0 µg/mL antagonizado pela heparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

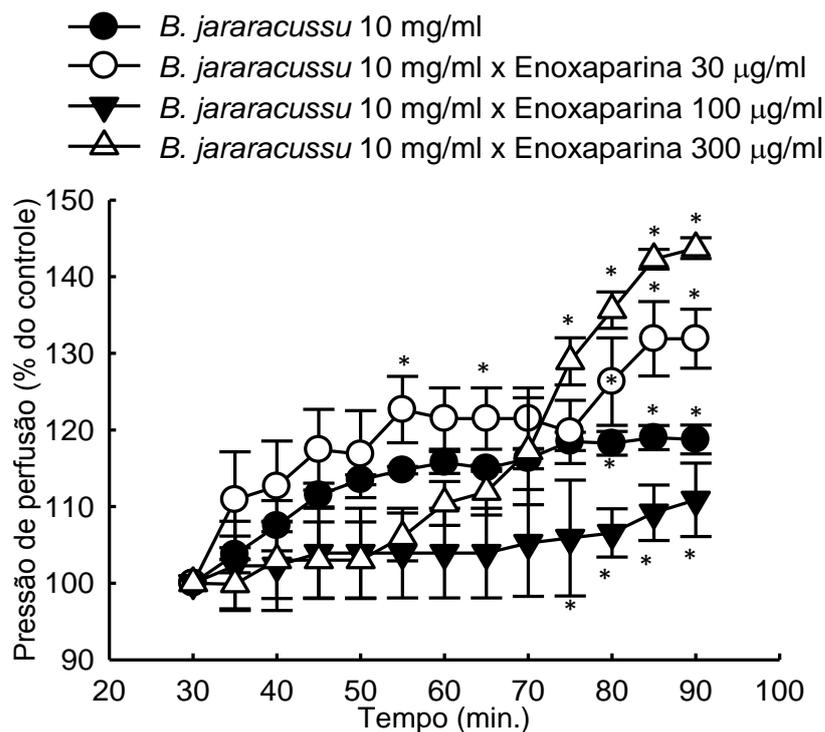
**Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL é na tensão desenvolvida em coração isolado de rato antagonizado parcialmente pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** Na figura 43, a redução da tensão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Observamos que após 60 minutos de perfusão dos venenos de *B. jararacussu* 10,0 µg/mL associado à enoxaparina nas concentrações de 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL obtivemos diferentes medidas de redução da tensão em função do tempo. A redução da tensão foi induzida em diferentes tempos pelo veneno bruto ou quando associado à enoxaparina. A peçonha de *B. jararacussu* na concentração de 10,0 µg/mL reduziu em 96% a tensão com 5 minutos de perfusão. Em outro grupo associamos a mesma concentração de veneno à enoxaparina na concentração de 30,0 µg/mL e ocorreu a redução de 76% da tensão com 40 minutos. O aumento da concentração de enoxaparina para 100,0 µg/mL junto com o veneno foi o que teve o melhor efeito e diminuiu em 23% a tensão após 20 minutos e 300,0 µg/mL de enoxaparina perfundido com a peçonha na concentração de 10,0 µg/mL reduziu em 78% a tensão após 50 minutos de experimento.



**Figura 43: Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL na tensão desenvolvida em coração isolado de rato é antagonizado parcialmente pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** Ordenada: Tensão cardíaca, expressa em % do controle em coração de ratos isolados perfundidos com soluções nutritivas contendo veneno de *B. jararacussu* na concentração: 10,0 µg/mL (●); *B. jararacussu* associado à enoxaparina na concentração de 30,0 µg/mL (○); *B. jararacussu* associado à enoxaparina na concentração de 100,0 µg/mL (▼) e *B. jararacussu* associado à enoxaparina na concentração de 300,0 µg/mL (△). Abscissa: tempo de perfusão com as diferentes concentrações do veneno. Os dados estão expressos como % da tensão controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo o veneno (V) nas diferentes concentrações.

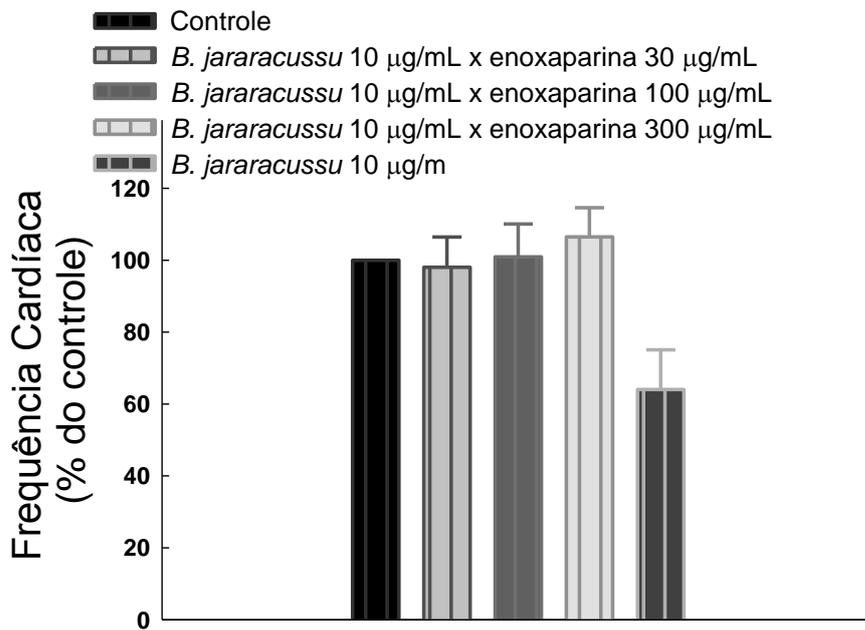
Os valores expressam à média  $\pm$  EPM (n = 4, \* p < 0.05 – ANOVA pós-teste Tukey.\*a partir do 35<sup>o</sup> minuto).

**Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0  $\mu\text{g/mL}$  na pressão de perfusão em coração isolado de rato é antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0  $\mu\text{g/mL}$ , 100,0  $\mu\text{g/mL}$  e 300,0  $\mu\text{g/mL}$ .** O aumento da pressão de perfusão foi uma medida relativa ao valor obtido em 30 minutos de controle. Na figura 44, observamos que após 60 minutos de perfusão do veneno de *B. jararacussu* e quando associamos concentrações crescentes de enoxaparina obtivemos diferentes valores de pressão de perfusão. O aumento da pressão de perfusão de 19% ocorreu após 60 minutos de veneno bruto. Quando associado com enoxaparina na concentração de 30,0  $\mu\text{g/mL}$  o aumento foi de 29% e 300,0  $\mu\text{g/mL}$  de enoxaparina junto com a peçonha promoveu um aumento da pressão de perfusão de 42%. A associação, entretanto, de 100,0  $\mu\text{g/mL}$  de enoxaparina ao veneno aumentou somente 7% da pressão de perfusão após 60 minutos.



**Figura 44: Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL na pressão de perfusão em coração isolado de rato é antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** Ordenada: A pressão de perfusão expressa em % de aumento do valor basal em corações de ratos isolados perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. Jararacussu* na concentração de 10,0 µg/mL (●), *B. jararacussu* 10,0 µg/mL associado à enoxaparina nas concentrações de 30,0 µg/mL (○), 100,0 µg/mL (▼) e 300,0 µg/mL (△). Abscissa: tempo de perfusão. Os dados estão expressos como % do controle no tempo zero, antes da perfusão com a solução contendo os diferentes venenos nas mesmas concentrações. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey \*a partir do 60<sup>o</sup> minuto).

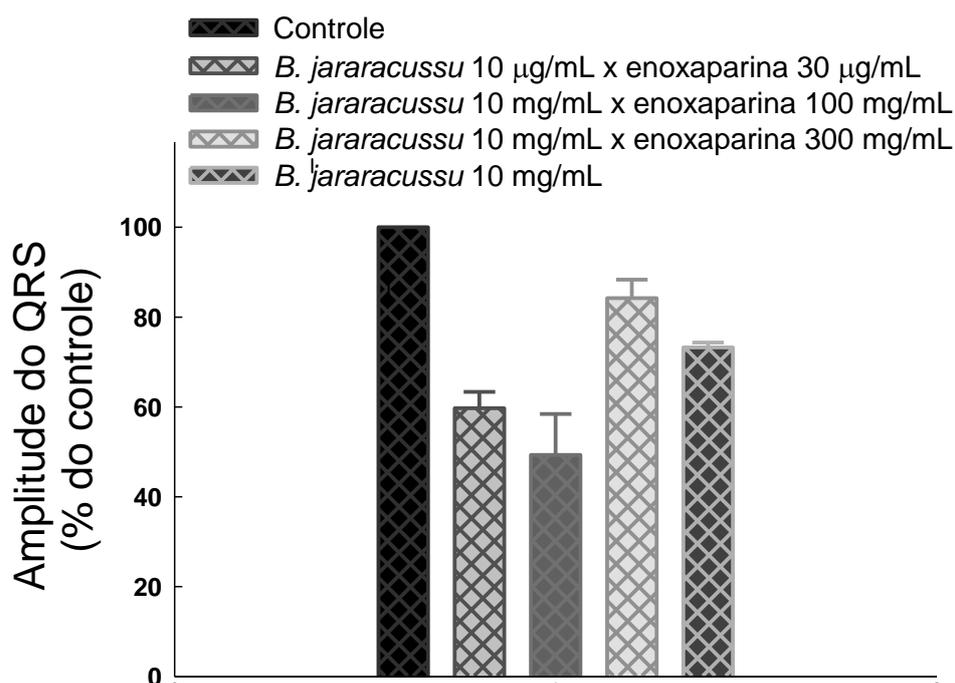
**Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL na frequência cardíaca em coração isolado de rato é antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** O aumento da frequência cardíaca foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos de perfusão do veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL associado à enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL fizemos a análise da frequência cardíaca. O aumento da frequência cardíaca foi de 37% quando perfundimos o veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL e quando associado à enoxaparina nas três concentrações obtivemos o antagonismo do efeito da peçonha.



**Figura 45: Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL na frequência cardíaca em coração isolado de rato.** A frequência cardíaca é expressa em % do aumento do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. Os valores expressam à média  $\pm$  EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

**Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL na amplitude do complexo QRS do EKG em coração isolado de rato é parcialmente antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** A redução da amplitude do complexo

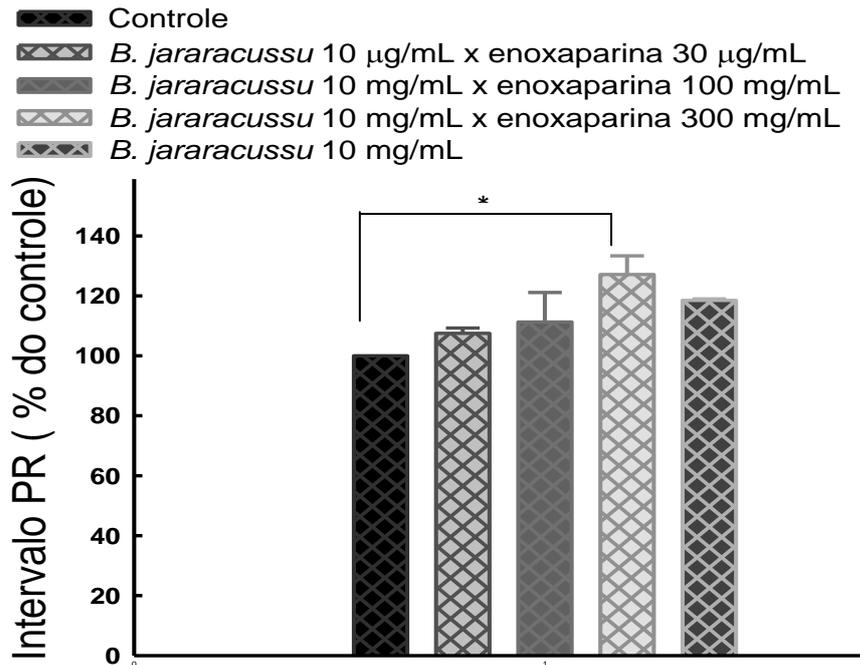
QRS foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos de perfusão do veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL associado à enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL fizemos a análise da amplitude do QRS. Na figura 46, a redução da amplitude do complexo QRS foi de 41% quando perfundimos o veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração de 10,0 µg/mL associado à enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, quando 100,0 µg/mL enoxaparina foi perfundido com a peçonha essa redução foi de 51% e a adição de 300,0 µg/mL de enoxaparina ao veneno reduziu o efeito do veneno bruto (figura 30) de 27% para 16%.



**Figura 46: Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL na amplitude do complexo QRS do EKG em coração isolado de rato é parcialmente antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. A amplitude do complexo QRS é expressa em % da redução do valor basal nos registros EKG no tempo zero**

sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL associado à enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

**Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL no intervalo PR do EKG em coração isolado de rato é antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** O aumento do intervalo PR foi uma medida relativa ao valor obtido no último minuto do período controle. Com 60 minutos de perfusão do veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL associado à enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL foi realizado a análise do intervalo PR. Na figura 29, o aumento do intervalo PR foi de 8% quando perfundimos o veneno bruto de *B. jararacussu* na concentração de 10,0 µg/mL. Na figura 47, esse efeito foi antagonizado nas concentrações de 30,0-100,0 µg/mL de enoxaparina, quando associado, entretanto, 300,0 µg/mL enoxaparina a peçonha bruta observamos o aumento de 18% do intervalo PR.



**Figura 47: Efeito do veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL no intervalo PR do EKG em coração isolado de rato é antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL e 300,0 µg/mL.** O intervalo PR é expressa em % do aumento do valor basal nos registros EKG no tempo zero sendo avaliada no tempo de 60 minutos após os corações de ratos isolados serem perfundidos com solução nutritora contendo veneno de *B. jararacussu* na concentração 10,0 µg/mL antagonizado pela enoxaparina nas concentrações 30,0 µg/mL, 100,0 µg/mL, 300,0 µg/mL. Os valores expressam à média ± EPM (n = 4, \* p < 0.05 - ANOVA pós-teste Tukey).

## DISCUSSÃO

Nossos dados *in vitro* demonstram pela primeira vez os efeitos depressores no coração e no EKG induzidos pelos venenos *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. Alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. insulares*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. Já foi demonstrado que esses venenos possuem atividade miotóxica, exceto *B. atrox*, *B. insularis*, *B. leucurus* e *B. moojeni* (Leite et al., 2007, Gay et al., 2005, Lomonte et al., 2003, Patrão-Neto et al., 2013, Delatorre et al., 2011), entretanto, o efeito cardiotoxico não foi avaliado. Os resultados mostram que os venenos induziram a redução na força contrátil do coração de ratos, sendo este efeito dependente de tempo e da concentração de veneno (*Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. asper*, *B. leucurus* e *B. jararacussu*) adicionados ao meio nutridor. Os efeitos produzidos pelos venenos de *B. asper* e *B. jararacussu* foram antagonizados pela heparina e parcialmente pela enoxaparina de forma concentração-dependente. Os venenos de serpentes constituem uma mistura de enzimas, polipeptídios de baixa massa molecular, glicoproteínas e íons metálicos capazes de gerar dano tecidual local e falência múltipla de sistemas, inclusive o colapso cardíaco (Cher et al, 2005). A atividade citotóxica dos venenos de serpentes ocorre pela ligação de seus componentes a estruturas como os glicosaminoglicanos nas membranas formando poros na membrana celular dos cardiomiócitos (Wu et al, 2010), e fibras musculares, levando à lesão celular, extravasamento de conteúdo celular, e consequente morte. A redução da tensão desenvolvida nos corações de ratos expostos aos venenos de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. Alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* indicam a disfunção do tecido cardíaco. A

análise do traçado do EKG mostra redução da frequência cardíaca, aumento do intervalo PR, diminuição da amplitude de QRS e o aparecimento de ondas de lesão, sugerindo lesão do tecido cardíaco e ruptura do sarcolema. Estas observações vêm de encontro aos dados obtidos com a análise da marcação enzimática macroscópica pelo cloridrato de trifetil tetrazolium (TTC), que mostra áreas esbranquiçadas que são evidências da lesão do tecido cardíaco. Esses eventos foram também observados no trabalho de Sifuentes e colaboradores (2008) e Melo e colaboradores (2010) que demonstraram a atividade do veneno de *B. jararacussu* sobre os miócitos ou tecidos cardíacos. Além disso, existem muitos trabalhos mostrando a atividade desse veneno em tecido muscular estriado esquelético, avaliados por diferentes metodologias, como medida da taxa de efluxo de creatina quinase (CK), análises morfológicas (Queiroz et al, 1984; Homs-Brandeburgo et al, 1988; Melo e Suarez-Kurtz, 1988; MELO et al, 1993; Calil-Elias et al, 2002a, b).

As cardiotoxinas (CTX) são descritas na literatura como estruturas com muitos peptídeos básicos, as quais interagem com lipídeos das membranas carregados negativamente, podendo assim induzir despolarização persistente da membrana de células excitáveis, acarretando distúrbio na sua estrutura e função (Vital-Brazil,1984, Harvey,1991). A CTX é o nome aceito para esta família de peptídeos devido ao seu efeito direto no músculo cardíaco, causando despolarização e prolongadas contraturas musculares. As propriedades CTX e seus efeitos fisiológicos podem ser observados pelos trabalhos de Harvey (1983 e 1991). Investigação das CTXs concentrou-se em duas atividades principais do peptídeo, a despolarização das células musculares e hemólise dos eritrócitos. Os venenos de serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B.*

*alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* possuem efeito cardiotoxico. Propomos que o músculo estriado cardíaco possa ser afetado de maneira semelhante ao músculo estriado esquelético, já que na nossa dissertação de mestrado (Ricardo, 2008) podemos observar o mecanismo de ação das toxinas presentes no veneno de *B. jararacussu* nesses tecidos e que parece envolver as mesmas moléculas. Quando injetada no músculo, a cardiotoxina da peçonha de *Naja naja atra* produz, como verificaram Lai e colaboradores (1972), degeneração da hialina e vacuolização das fibras musculares esqueléticas. Outras pesquisas mais recentes mostram a ação mionecrosante de FLA<sub>2</sub> presentes em venenos de serpentes (Calil-Elias, 2002a e b; Gutiérrez, 2008). Vital-Brazil (1984) observou que as lesões locais, caracterizadas por edema e necrose extensas dos tecidos, são provocadas pelas cardiotoxinas do veneno em ação sinérgica com as fosfolipases. Já Harvey e colaboradores (1983) mostraram que a presença de atividade FLA<sub>2</sub> não aumenta a habilidade de cardiotoxinas de despolarizar e induzir contratura de musculatura esquelética. Este dano celular não seria consequência da prolongada despolarização pela alta concentração de K<sup>+</sup>, pois esta é reversível sendo provável a interação das cardiotoxinas com os lipídeos da membrana. Fletcher e Lizzo (1987) mostraram que a concentração de FLAs usada por Harvey e colaboradores (1983) foi baixa para se tiver alguma atividade sinérgica com as cardiotoxinas, e também propuseram que as FLAs teriam a capacidade de acelerar a ação das cardiotoxinas mais do que potencializar. Estes mostraram que as cardiotoxinas são capazes de promover contratura da musculatura estriada esquelética, e que não há relação entre inibição da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase e

essa atividade. Ainda sugeriram diferentes mecanismos de ação envolvendo o  $\text{Ca}^{2+}$ . Algumas das toxinas presentes em venenos de serpentes são fosfolipases que despolarizam, tais como as cardiotoxinas, a membrana das fibras musculares em preparações isoladas e provocam contratura do músculo estriado esquelético. Estão incluídas neste caso as toxinas isoladas da peçonha de *B. jararacussu*, BthTX-I e II; a miotoxina II da *B. Asper*; Agkistrodon contortrix laticinctusMT, uma miotoxina Lys49 da *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Além dessas, as miotoxina-I e-II purificadas de *B. moojeni*, homólogas (MjTX-I e-II) as Lys49-FLA<sub>2</sub>; a neuwiedase, isolada de *B. neuwiedi*, uma metaloproteinase de 22kDa, é capaz de degradar o fibrinogênio, fibrina, colágeno do tipo I, fibronectina, laminina e induz a reação inflamatória e possui ação hemorrágica (Johnson e Ownby, 1993, Leite et al., 2004, Alape-Giro 'et al., 2008, Öhler et al., 2010, Cardoso et al., 2010, Paine et al., 1992, Blobel et al., 1997, Lomonte et al, 1990, Soares et al, 1998, 2000, 2004, Rodrigues et al., 2001, Núñez et al., 2009; Calvete et al., 2011).

A BthTX-I é capaz de induzir paralisia muscular e contratura em musculatura esquelética (Rodrigues-Simioni et al, 1983; Vital-Brazil, 1984; Melo e Suarez-Kurtz, 1988b). As cardiotoxinas são capazes de produzir perda da tensão e o aparecimento de contratura no tecido cardíaco como demonstrado por Sun e Walker (1986). Nenhum desses mecanismos pode ser aplicado diretamente para explicar os nossos dados, obtidos usando venenos brutos de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, que é composto por várias toxinas cujos mecanismos de citotoxicidade não estão esclarecidos. Os estudos de coração de rato isolado mostraram registros de

EKG com diminuição da frequência cardíaca após 20 minutos, aumento do intervalo PR após 20 minutos e diminuição da amplitude do QRS após 60 minutos, enquanto o registro da tensão já havia sido abolido e o coração havia perdido a função. Alguns desses dados são diferentes e outros estão de acordo com os apresentados por Omran e Abdel-Nabi (1997). Estes avaliaram parâmetros do EKG, e verificaram o aumento da frequência cardíaca e da amplitude do QRS, ao contrário dos nossos resultados, enquanto o prolongamento do intervalo PR em altas doses está de acordo com o nosso resultado. Os dados conflitantes podem ser resultantes da metodologia de avaliação desses parâmetros eletrocardiográficos, principalmente frequência cardíaca, visto que os autores avaliaram o EKG de ratos *in vivo*, e nossas avaliações foram feitas através da metodologia de Langerdoff modificado que isola o coração dos mecanismos compensatórios do sistema hemodinâmico. Nossos resultados mostraram o aparecimento de contratatura induzida pelo veneno de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, semelhante ao já descrito por Sun e Walker (1986). Eles encontraram que a cardiotoxina de *Naja naja atra* induz seletivamente contratatura do tecido ventricular quando se dá a depressão da amplitude de tensão. Nossos dados mostram claramente, através do TTC, que houve lesão do sarcolema e possivelmente ocorreu a liberação de enzima sarcoplasmática que aumentou com o tempo de exposição ao veneno, semelhante ao já descrito em outras preparações *in vitro* e *in vivo* com musculatura esquelética (Rodrigues-Simioni et al, 1983; Melo e Suarez-Kurtz, 1988b; Sifuentes et al., 2008). As avaliações do efeito cardiotóxico pela marcação enzimática macroscópica por TTC

demonstraram que os venenos de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. asper*, *B. leucurus* e *B. jararacussu* induziram o aumento da área de lesão.

Quando, entretanto, avaliamos os efeitos de *B. asper* associado à heparina e *B. jararacussu* associado à enoxaparina, esses efeitos foram diminuídos em relação à condição apenas com veneno. Substâncias polianiónicas têm sido muito estudadas pela sua habilidade de neutralizar o efeito citotóxico de venenos de serpentes (Melo e Suarez-Kurtz, 1988; Melo et al., 1993; Lomonte et al., 1994; Melo e Ownby, 1999; Calil-Elias et al., 2002 a e b; Murakami et al., 2004, 2005, Ricardo, 2009, Schaffazick et al., 2010). Nosso trabalho também demonstra que a heparina tem a habilidade de antagonizar o efeito cardiodepressor do veneno de *B. asper* e a enoxaparina o efeito da *B. jararacussu*, mas esse efeito é dependente da concentração. Na concentração de 100,0 µg/mL de heparina, o grau de proteção da cardiotoxicidade foi parcial e foi suficiente para impedir o efeito cardiodepressor do veneno. Além disso, a heparina teve uma vigorosa capacidade de neutralizar os efeitos da *B. asper*, fato que não foi observado da mesma forma pela enoxaparina em relação ao veneno de *B. jararacussu*. Vários mecanismos podem estar envolvidos na atividade antiofídica da heparina e enoxaparina. Quanto à heparina, podemos sugerir que ela possa interagir com as toxinas de cargas positivas presentes no veneno de *B. jararacussu*, antagonizando principalmente a BthTX-I (Melo et al, 1993). Alguns trabalhos com cristalografia e modelagem molecular indicam que a heparina tem a capacidade de complexar-se com cardiotoxinas das serpentes *Naja naja atra*, *Naja mossambica mossambica* e *Naja nigricollis nigricollis*, que têm cargas positivas, mudando toda a disposição das suas cargas de superfície, tornando-as neutras (Patel et al,1997; Vyas et al, 1997,

1998; Sue et al, 2001; Wu, 1998; Tjong et al, 2007). Outros trabalhos evidenciaram a inibição da miotoxicidade da *B. asper* miotoxina II (Lys 49) pela suramina (polianionte sulfatado) e a diminuição da intensidade das cargas positivas desta miotoxina (Murakami et al, 2004; 2005). Além disso, a heparina é capaz de antagonizar o efeito do veneno de *Bothrops jararacussu* sobre as bombas de  $Ca^{2+}$  (Schaffazick et al., 2010).

A CTX A3, que é obtida da *Naja atra*, demonstrou induzir uma corrente iônica em modelos de membranas (Chien et al., 1994), esse evento ocorre pela formação de poros específicos na membrana biológica. Isso foi demonstrado pelo método eletrofisiológico de *whole cell* em cardiomiócitos. Essa CTX poderia induzir a formação de condutância extra de maneira dependente da voltagem e da dose (Wang et al., 2006). No entanto, a condutância induzida é sensível a pré-tratamento das células com sulfatase, IgG anti-sulfato ou IgM anti-sulfato, o que indica que o sulfato presente na galactose do glicosíngolípido utilizados no trabalho possam estar envolvidos com o processo. Estes resultados indicam que uma interação bimolecular, com a dimerização do heparan sulfatos induzida por moléculas de CTX A3 que pode ser o passo limitante para o efeito observado.

O heparan sulfato tem sido sugerido como sendo responsável pela indução e pela regulação de uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo os processos de desenvolvimento, angiogênese, da coagulação sanguínea e de metástases tumorais (Gallagher et al., 2000; e Lozzo et al., 1998). As CTX contêm domínios carregados positivamente, que são atraídos para as regiões aniônicas de heparan sulfato (Tjong et al., 2007). Esse mecanismo de interação poderia ser semelhante ao caso da heparina e

enoxaparina, já que esta é polisulfatada, semelhante à suramina, e a BthTX-I (uma das principais toxinas do veneno de *B. jararacussu*), uma Lys 49 semelhante à miotoxina II da *B. asper*. Desse modo, poderíamos considerar a hipótese que quando perfundimos os venenos de serpentes *B. asper* associados à heparina ou *B. jararacussu* junto com enoxaparina estaríamos disponibilizando uma molécula com carga negativa e essa seria uma fonte de atração eletrostática concorrente ao heparan sulfatado da membrana, assim, evitando o aparecimento dos efeitos cardiotoxicos promovidos pela formação dos poros iônicos e a disfunção das bombas de  $Ca^{2+}$  que estão intimamente relacionados com a contração muscular e provavelmente no aparecimento do aumento da linha de base nos registros. Somado a isso, observamos um antagonismo menor quando associamos enoxaparina ao veneno bruto de *B. jararacussu* o que poderia ser resultado de uma molécula menos sulfatada, resultando em uma menor atração eletrostática de cargas negativas e o aparecimento dos efeitos cardiotoxico quando comparado com a heparina associado ao veneno de *B. jararacussu* (Ricardo, 2008).

## CONCLUSÃO

Demonstramos pela primeira vez o efeito cardiotoxico promovido pelos venenos brutos das espécies *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. leucurus* e *B. moojeni* na concentração de 10,0 µg/mL caracterizado pela redução da intensidade de tensão, e alterações elétricas nos registros de EKG, levando à fibrilação e parada cardíaca. Os venenos brutos de *B. jararacussu*, *Agkistrodon contortrix laticinctus*, *B. leucurus* e *B. asper* induziram de forma concentração-dependente a depressão da tensão cardíaca e alterações na frequência cardíaca, no intervalo PR, na amplitude do QRS e o aumento da pressão de perfusão. A heparina antagonizou os efeitos cardiotoxicos do veneno de *B. asper*, e este efeito foi dependente da concentração adicionada ao meio nutridor nos estudos *in vitro*. A enoxaparina antagonizou parcialmente os efeitos cardiotoxicos do veneno de *B. jararacussu*, e este efeito foi observado na concentração de 100 µg/mL.

## BIBLIOGRAFIA

- AGARWAL R, SINGH AP, AGGARWAL AN. Pulmonary o edema complicating snake bite due to *Bungarus caeruleus*. **Singapore Med J**. 48(8):227-30, 2007.
- ALAPE-GIRÓN A, SANZ L, ESCOLANO J, FLORES-DÍAZ M, MADRIGAL M, SASA M, CALVETE JJ .Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **J PROTEOME RES**. Aug;7(8):3556-71. 2008.
- AMARAL A. Contribuição A biologia dos ofidios brasileiros (habitat, hábitos e alimentacao) - Primeira nota previa. **Col. dos Trab. do I. Butantan** 11, 177-181. 1924.
- AMARAL A. Excursao A Ilha da Queimada Grande. **Col. Trab. Inst. Butantan**. 11, 49-55. 1918/19.
- ANDRIÃO-ESCARSO SH, SOARES AM, RODRIGUES VM, ANGULO Y, DÍAZ C, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM, GIGLIO JR. Myotoxic phospholipases A (2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**. 82(8):755-63, 2000.
- ARRUDA EZ, SILVA NM, MORAES RA, MELO PA. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Braz J Med Biol Res**. 35(6):723-6. 2002.
- ASHLEY, C. C., MULLIGAN, I. P. LEA, T. J. Ca<sup>2+</sup> and activation mechanisms in skeletal muscle. **Q. Rev. Biophys**. 24(1):1-73. 1991.
- AVILA-AGUERO ML, PARÍS MM, HU S, PETERSON PK, GUTIÉRREZ JM, LOMONTE B, FAINGEZICHT I; Snakebite Study Group. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. **Pediatr Emerg Care**. 17(6):425-9. 2001.

- BARROS, S.F., FRIEDLANSKAIA, I., PETRICEVICH, V.L., KIPNIS, T.L. Localin inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Med. Inflamm**, (7) 339-346. 1998.
- BAUAB FA, JUNQUEIRA GR, CORRADINI MC, SILVEIRA PV, NISHIOKA SDE A. Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. **Trop Med Parasitol**. 45(3):243-5. 1994.
- BERS D.M. Excitation-Contraction Coupling of Cardiac Contraction and Force. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, 2001.
- BLOBEL CP. Metalloproteinase-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF-aand Notch. **Cell** 90:589-592. 1997.
- BOCHNER R, STRUCHINER CJ. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review **Cad Saude Publica**. 19(1): 7-16. 2003.
- BORGES CC, SADAHIRO M, SANTOS MC. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes ofídicos ocorridos nos municípios do Estado do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop**. ;32:637–646.1999.
- BORGES MH, SOARES AM, RODRIGUES VM, OLIVEIRA F, FRANSCHESCHI AM, RUCAVADO A, GIGLIO JR, HOMSI-BRANDEBURGO MI. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*).**Toxicon**. 39(12):1863-9, 2001.
- CALIL-ELIAS S, MARTINEZ AM, MELO PA. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. **Histol Histopathol**. 17(2):463-70, 2002a.
- CALIL-ELIAS S, THATTASSERY E, MARTINEZ AM, MELO PA. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. **Braz J Med Biol Res**. 35(10):1233-5. 2002b.

- CALVETE JJ, SANZ L, PÉREZ A, BORGES A, VARGAS AM, LOMONTE B, ANGULO Y, GUTIÉRREZ JM, CHALKIDIS HM, MOURÃO RH, FURTADO MF, MOURA-DA-SILVA AM. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J Proteomics**. 74(4):510-27.2011.
- CAMPBELL JA, LAMAR WW. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **Comstock Publishing Associates**, Ithaca and London. 870 pp. 1500 plates. 2004.
- CARDOSO, K. C., DA SILVA, M. J., COSTA, G. G. L., TORRES, T. T., DEL BEM, L. E. V., VIDAL, R., et al. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, 11, 605. 2010.
- CAROLYN Y. HO. Hypertrophic Cardiomyopathy: *For Heart Failure Clinics: Genetics of Cardiomyopathy and Heart Failure*. Heart Fail Clin. 6(2): 141–159. 2010.
- CHANG ET AL., K.L. CHANG, Y.S. CHEN, S.R. LIN, L.S. CHANG e C.C. CHANG, Probing the functional sites in *Naja naja atra* (Taiwan cobra) cardiotoxin III with monoclonal antibody. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 29: 1015–1022. 1993.
- CHER, C.D.; ARMUGAM, A.; ZHU, Y.Z. AND JEYASEELAN, K. Molecular basis of cardiotoxicity upon cobra envenomation. **Cell Mol. Life Sci.**, 62(1): 105-118. 2005.
- CHIEN KY, CHIANG CM, HSEU YC. Two distinct types of cardiotoxin as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with zwitterionic phospholipid dispersions. **J Biol Chem** ; 269:14473-14483. 1994.
- CHIPPAUX JP, GOYFFON M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**. 36(6):823-46. 1998.
- CINTRA AC, DE TONI LG, SARTIM MA, FRANCO JJ, CAETANO RC, MURAKAMI MT, SAMPAIO SV. Batroxase, a new metalloproteinase from

- B. atrox snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**. 60(1):70-82. 2012.
- CINTRA AC, MARANGONI S, OLIVEIRA B, GIGLIO JR.. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem**. 12(1):57-64, 1993.
- CONRAD H.E. Heparin-Binding Proteins. San Diego, **Academic Press**. (1):183-202. 1998.
- DELATORRE P, ROCHA BA, SANTI-GADELHA T, GADELHA CA, TOYAMA MH, CAVADA BS. Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from Bothrops neuwiedi venom. **Biochimie**. 93(3):513-8. 2011.
- DISSANAYAKE P, SELLAHEWA KH. Acute myocardial infarction in a patient with Russell's viper bite. *Ceylon Med J*. 41(2):67-8.1996.
- DUFTON, M. J., HIDER, R. C. The structure and pharmacology of Elapid cytotoxins. In A. L. Harvey (Ed.). **Snake toxins** New York: Pergamom Press. 259-302.1991.
- ESCOCARD RDE C, KANASHIRO MM, PETRETSKI JH, AZEVEDO-SILVA J, QUEIROZ DE CARVALHO EC, DIAS DA SILVA W, KIPNIS TL. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with Bothrops atrox venom. **Immunobiology**. 211(1-2):37-46. 2006.
- FAN, H. W. CARDOSO, J. L. Clinical toxicology of snake bites in South America. In **Handbook of Clinical Toxicology Animal Venoms and Poisons**, eds J. Meier and J. White. CRC Press, Boca Raton, pp. 667-688. 1995.
- FLETCHER JE, JIANG MS: Possible mechanism of action of cobra snake venom cardiotoxins and bee venom mellitin. **Toxicon**. 31:669–695. 1993.
- FLETCHER JE, LIZZO FH. Contracture induction by snake venom cardiotoxin in skeletal muscle from humans and rats. **Toxicon**. 25(9):1003-10. 1987.

- FLETCHER JI, CHAPMAN BE, MACKAY JP, HOWDEN ME, KING GF. The structure of versutoxin (delta-atracotoxin-Hv1) provides insights into the binding of site 3 neurotoxins to the voltage-gated sodium channel. **Structure**. 5(11). 1997.
- FRY B.G., W. WUSTER, S.F.R. RAMJAN, T. JACKSON, P. MARTELLI, AND R.M. KINI. LC/MS (liquid chromatography, mass spectrometry) analysis of Colubroidea snake venoms: evolutionary and toxinological implications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: 2047-2062. 2003.
- FRY, B.G., W. WUSTER. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular Biology and Evolution** 21: 870-883. 2004.
- FRY, B.G., H. SCHEIB, L. VAN DER WEERD, B. YOUNG, J. MCNAUGHTAN, S.F.R. RAMJAN, N. VIDAL, R.E. POELMANN, J.A. Norman. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Molecular & Cellular Proteomics** 7: 215-246. 2008.
- FRY, B.G., N. VIDAL, J.A. NORMAN, F.J. VONK, H. SCHEIB, S.F.R. RAMJAN, S. KURUPPU, K. FUNG, S.B. HEDGES, M.K. RICHARDSON, W.C. HODGSON, V. IGNJATOVIC, R. SUMMERHAYES, AND E. KOCHVA. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature** 439: 584-588. 2005.
- FULY AL, CALIL-ELIAS S, MARTINEZ AM, MELO PA, GUIMARÃES JA. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A(2) isolated from *Lachesis muta* snake venom. Comparison with lysophosphatidylcholine. **Int J Biochem Cell Biol**. 35 (10). 2003.
- FULY AL, CALIL-ELIAS S, ZINGALI RB, GUIMARÃES JA, MELO PA. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**. 38 (7). 2000.
- FULY AL, MACHADO OL, ALVES EW, CARLINI CR. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A2 isolated from *Lachesis*

muta (Bushmaster) snake venom. **Thromb Haemost.** 78(5):1372-80. 1997.

FURTADO MF, MARUYAMA M, KAMIGUTI AS, ANTONIO LC. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon.** 29(2):219-26.1991.

GALLAGHER, J.T., LYON, M. "Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens". In Iozzo, M, V. **Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions.** Marcel Dekker Inc. New York, New York. pp. 27–59. 2000.

GAY CC, LEIVA LC, MARUÑAK S, TEIBLER P, ACOSTA DE PÉREZ O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon.** 46(5):546-54. 2005.

GREENE, H.W. Snakes: The Evolution of Mystery in Nature. Berkeley, California: **University of Berkeley Press.** 1997.

GUTIÉRREZ JM, BOLAÑOS R. Hemorrhagic and myonecrotic effects of snake bites in the American continent. **Bol Oficina Sanit Panam.** 89(2):149-58. 1980.

GUTIÉRREZ JM, CHAVES F, GENÉ JA, LOMONTE B, CAMACHO Z, SCHOSINSKY K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon.** 27(7): 735-45, 1989.

GUTIÉRREZ JM, LOMONTE B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon.** 33(11):1405-24. 1995.

GUTIÉRREZ JM, NÚÑEZ J, DÍAZ C. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake. *Bothrops Jararacussu.* **Exp. MolPathol.** 55:217–229. 1991.

- GUTIÉRREZ JM, OWNBY CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. 42(8):915-31. 2003.
- GUTIÉRREZ JM, PONCE-SOTO LA, MARANGONI S, LOMONTE B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon**. 2008.
- GUTIÉRREZ JM, ROJAS G, PÉREZ A, ARGUELLO I, LOMONTE B. Neutralization of coral snake *Micrurus nigrocinctus* venom by a monovalent antivenom. **Braz J Med Biol Res**. 24(7):701-10. 1999.
- GUTIÉRREZ, J.M. & B. LOMONTE. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, a review. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, 51 (14): 211-233. 1989.
- GUYTON, A. C., Hall J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 11th ed. 2006.
- HANSDAK SG, LALLAR KS, POKHAREL P, SHYANGWA P, KARKI P, ET AL. A clinico-epidemiological study of snake bite in Nepal. **Trop Doct** 28: 223–226. 1998.
- HARRIS LK, FRANSON RC. oleate-labeled autoclaved yeast: a membranous substrate for measuring phospholipase A2 activity in vitro. **Anal Biochem**. 193(2):191-6. 1991.
- HARVEY AL, HIDER RC, KHADER F. Effect of phospholipase A on actions of cobra venom cardiotoxins on erythrocytes and skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**. 728(2):215-21, 1983.
- HARVEY AL., Cardiotoxins from cobra venoms. In Tu AT, ed. **Reptile Venoms and Toxins**. New York, Marcel Dekker, pp.85– 106, 1991.
- HARVEY, A.L., Snake venom peptides. In: Kastin, A.J. (Ed.), **Handbook of Biologically Active Peptides**. Academic Press-Elsevier, USA, pp. 355–362. 1996. 2006.

- HÖFLING DA CRUZ MA, PARONETTO CC, COGO JC, RODRIGUES-SIMIONI L, D'ABREU AC Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilha) venom and a phospholipase A2-containing fraction. **Histol Histopathol.** 16(1):185-95. 2001.
- HOMSI-BRANDEBURGO MI, QUEIROZ LS, SANTO-NETO H, RODRIGUES-SIMIONI L, GIGLIO JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon.** 26(7):615-27, 1988.
- IOZZO, R. V. "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function". **Annu. Rev. Biochem.** 67: 609–652. 1998.
- ISELL, L.A. Snakes as agents of evolutionary change in primate brains. **Journal of Human Evolution.** 51: 1-35. 2006.
- JACKSON, K. The evolution of venom-delivery systems in snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society** 137: 337-354. 2003.
- JOHNSON EK, OWNBY CL. Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. **Toxicon.** 31(3):243-55. 1993.
- KAMIGUTI AS, MATSUNAGA S, SPIR M, SANO-MARTINS IS, NAHAS L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. **Braz J Med Biol Res.** 19(2): 1986.
- KARDONG, K.V. 'Protovipers' and the evolution of snake fangs. **Evolution** 33: 433-443. 1979.
- KASTURIRATNE A., A. R. WICKREMASINGHE, N. DE SILVA, N. K. GUNAWARDENA, A. PATHMESWARANET .The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **Plo S Medicine**, 5(11) 218. 2008
- KATZ AM. **Physiology of the Heart.** 4th ed. 2006.

- KLEIN H.H., PUSCHMANN S., SCHAPER J. E SCHAPER W., The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction, **Virchows Archiv fuer Pathologische Anatomie und Physiologie und Fuer Klinische Medizin** pp. 393.1981.
- LAI MK, WEN CY, LEE CY. Local lesions caused by cardiotoxin isolated from Formosan cobra venom. **Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi**. 71(6):328-32. 1972.
- LEITE RS, FRANCO W, OWNBY CL, SELISTRE-DE-ARAUJO HS. Effects of Agkistrodon contortrix laticinctus myotoxin, a Lys49 phospholipase A (2) from Agkistrodon contortrix laticinctus snake venom, on water transport in the isolated toad urinary bladder. **Toxicon**. 43(1):77-83. 2004.
- LEITE RS, FRANCO W, SELISTRE-DE-ARAUJO HS. Effects of the myotoxic Lys49 phospholipase A2 from Agkistrodon contortrix laticinctus snake venom on water transport in the toad bladder epithelium: evidence for a role of microtubules and calmodulin. **Toxicol In Vitro**. 21(4):651-5. 2007.
- LINARDI, A., ROCHA E SILVA, T. A. A., MIYABARA, E. H., FRANCO-PENTEADO, C. F., CARDOSO, K. C., BOER, P. A., et al. (). Histological and functional renal alterations caused by Bothrops alternatus snake venom: Expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, (1) 810-895. 2011.
- LOMONTE B, ANGULO Y, CALDERÓN L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**. 15; 42(8): 885-901. 2003.
- LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM, FURTADO MF, OTERO R, ROSSO JP, VARGAS O, CARMONA E, ROVIRA ME. Isolation of basic myotoxins from Bothrops moojeni and Bothrops atrox snake venoms. **Toxicon**. 28(10):1137-46. 1990.
- LOMONTE B, MORENO E, TARKOWSK A, HANSEN LA, MACCARANA M: Neutralizing interaction between heparin and myotoxin II, a Lysine 49

phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. **J Biol Chem.** 269: 29867– 29873. 1994.

LÓPEZ-LOZANO JL, DE SOUSA MV, RICART CA, CHÁVEZ-OLORTEGUI C, FLORES SANCHEZ E, MUNIZ EG, BUHRNHEIM PF, MORHY L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon.** 40(7):997-1006. 2002.

MARQUES, A. R.; SAZIMA, I. CARDOSO, J. L.C. História natural das serpentes : **Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003.

MCDIARMID RW, CAMPBELL JA, TOURÉ T. Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference, Volume 1. **Herpetologists' League.** pp. 511. 1999.

MEBS D. e OWNBY C.L., Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol. Ther.** 48. 1990.

MELLO, S. M., LINARDI, A., RENNO ´, A. L., TARSITANO, C. A., PEREIRA, E. M., & HYSLOP, S. Renal kinetics of *Bothrops alternates* (urutu) snake venom in rats. **Toxicon**, 55, 470–480. 2010.

MELO PA, BURNS CF, BLANKEMEYER JT, OWNBY CL. Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle. **Toxicon.** 43 (2). 111-119. 2004.

MELO PA, HOMSI-BRANDEBURGO MI, GIGLIO JR, SUAREZ-KURTZ G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon.** 31(3), 1993.

MELO PA, OWNBY CL. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA2 myotoxins. **Toxicon.** 37(1):199-215. 1999.

- MELO PA, SUAREZ-KURTZ G. Release of creatine kinase from skeletal muscles by *Bothrops* venoms: heparin potentiation of inhibition by antivenin. **Braz J Med Biol Res.** 21(3):545-8. 1988.
- MILANI R., JORGE M.T., FERRAZ DE CAMPOS F.P., MARTINS F.P., BOUSSO A., CARDOSO J.L.C., RIBEIRO L.A., FAN H.W., FRANCA F.O.S., SANOMARTINS I.S., CARDOSO D., FERNÁNDEZ I.C.O.F., FERNANDES J.C., ALDRED V.L., SANDOVAL M.P., PUORTO G., THEAKSTON R.D.G. E WARRELL D.A., Snake bites by the jararacucu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo state, Brazil, **Q. J. Med.** 90. 1997.
- MONTECUCCO C, GUTIÉRREZ JM, LOMONTE B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. **Cell Mol Life Sci.** 65 :2897-2912. 2008.
- MOREIRA V, DOS-SANTOS MC, NASCIMENTO NG, BORGES DA SILVA H, FERNANDES CM, D'IMPÉRIO LIMA MR, TEIXEIRA C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon.** 60(1):12-20. 2012.
- MS (Ministério da Saúde) /FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos.** Brasília: MS/FUNASA,1998.
- MURAKAMI MT, ARRUDA EZ, MELO PA, MARTINEZ AB, CALIL-ELIÁS S, TOMAZ MA, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM, ARNI RK. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **J Mol Biol.**350(3): 416-26. 2005.
- MURAKAMI MT, VIÇOTI MM, ABREGO JR, LOURENZONI MR, CINTRA AC, ARRUDA EZ, TOMAZ MA, MELO PA, ARNI RK. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. **Toxicon.** 49(3):378- 87. 2007.

- MURPHY JG, MARSH JD, SMITH TW. The role of calcium in ischemic myocardial injury. **Circulation**. 75:1987.
- NACHLAS M.M. SHNITKA T.K., Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alteration in dehydrogenase activity, **Am J Pathol** 42. 1963.
- NINEHAM A.W., The chemistry of formazans and tetrazolium salts, **Chemical**. 55. p. 355-483. 1955.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37. p. 653-659. 2003.
- NÚÑEZ V, CID P, SANZ L, DE LA TORRE P, ANGULO Y, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM, CALVETE JJ. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **J Proteomics**. 73(1):57-78. 2009.
- ÖHLER, M., GEORGIEVA, D., SEIFERT, J., VON BERGEN, M., ARNI, R. K., GENOV, N. The venomomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **Journal of Proteome Research**. 9, 2437–2442. 2010.
- OMRAN MA, ABDEL-NABI IM. Changes in the arterial blood pressure, heart rate and normal ECG parameters of rat after envenomation with Egyptian cobra (*Naja haje*) venom. **Hum Exp Toxicol**. 16(6):327-33. 1997.
- OTERO, R., NÚÑEZ, V., GUTIÉRREZ, J.M., ROBLES, A., ESTRADA, R., OSÓRIO, R.G., DEL-VALLE, G., VALDERRAMA, R., GIRALDO, C.A. Neutralizing capacity of a new monovalent anti-*Bothrops atrox* antivenom: comparison with two commercial antivenoms. **Braz J Med Biol Res**. vol.30, n.3, pp. 375-379. 1997.
- OWNBY CL, FLETCHER JE, COLEBERG TR: Cardiotoxin I from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle *in vivo*. **Toxicol**. 31:697–709. 1993.

- OWNBY CL, NIKA T, IMAI K, SUGIHARA H. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). **Toxicon**. 28(7): 837-846.1990.
- OWNBY CL, SELISTRE DE ARAUJO HS, WHITE SP, FLETCHER JE. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**. 37(3):411-445.1999.
- PAINE MJI, DESMOND H, THEAKSTON RDG, CRAMPTON JM. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararacavenom*: insights into the disintegrin gene family. **J Biol Chem**;267 :22 869-876. 1992.
- PATEL HV, VYAS AA, VYAS KA, CHIANG CM, CHI LM, WU W: Heparin and heparan sulfate bind to snake cardiotoxins: sulfated oligosaccharides as a potential target for cardiotoxin action. **J Biol Chem**. 272:1484–1493, 1997.
- PATRÃO-NETO FC, TOMAZ MA, STRAUCH MA, MONTEIRO-MACHADO M, ROCHA-JUNIOR JR, BORGES PA, CALIL-ELIAS S, MELO PA. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**. 15. 2013. doi: 10.1016
- PEREIRA MF, NOVELLO JC, CINTRA AC, GIGLIO JR, LANDUCCI ET, OLIVEIRA B, MARANGONI S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. **J Protein Chem**. 17(4):381-386. 1998.
- PETRETSKI, J.H. ET AL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz J Med Biol Res.**, Ribeirão Preto, v. 33 (11) pp.1293-1300. 2000.
- PICH S., KLEIN H.H., LINDERT S., NEBENDAHL K. E KREUZER H. Cell death in ischemic, reperfused porcine hearts: A histochemical and functional study, **Bas Res Cardiol**. 83. 550-559. 1988.

- QUEIROZ LS, SANTO NETO H, ASSAKURA MT, REICHL AP, MANDELBAUM FR. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. 23(2) 341-345. 1985.
- QUEIROZ LS, SANTO NETO H, RODRIGUES-SIMIONI L, PRADO-FRANCESCHI J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**. 22(3):339-46. 1984.
- RAMKISSON R.A., Macroscopic identification of early myocardial infarction by dehydrogenase alterations. **J Clin Pathol** 19, 479-481. 1966.
- RIBEIRO LA, ALBUQUERQUE MJ, DE CAMPOS VA, KATZ G, TAKAOKA NY, LEBRÃO ML, JORGE MT. [Deaths caused by venomous snakes in the State of São Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993] **Rev Assoc Med Bras**. 44(4):312-8, 1998.
- RICARDO HD, Estudo do efeito da heparina na cardiotoxicidade do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*. 2008.
- RODRIGUES FG, PETRETSKI JH, KANASHIRO MM, LEMOS L, DA SILVA WD, KIPNIS TL. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. **Mol Immunol**. 40(16):1149-56. 2004.
- RODRIGUES VM, SOARES AM, ANDRIÃO-ESCARSO SH, FRANCESCHI AM, RUCAVADO A, GUTIÉRREZ JM, GIGLIO JR. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**. 83(6):471-9. 2001.
- RODRIGUES VM, SOARES AM, ANDRIÃO-ESCARSO SH, FRANCESCHI AM, RUCAVADO A, GUTIÉRREZ JM, GIGLIO JR. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**. 83(6):471-9. 2001.
- RODRIGUES, M.T. The Conservation of Brazilian Reptiles: Challenges for a Megadiverse Country. **Conservation Biology**. 19. 659–664. 2005.

- RODRIGUES-SIMIONI L, BORGESSE N, CECCARELLI B. The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**. 10(2):475-89. 1983.
- ROSENBERG, P. Phospholipases. In: **Handbook of Toxicology** (Shier, W. T., and Mebs, E., eds.), New York, Marcel Dekker. 67-277. 1990.
- ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W. & BUCKLEY, E., ed. **Venomous Animals and their Venoms**. New York, Academic Press. 345-384, 1971.
- RUBART M, ZIPES DP. Genesis of cardiac arrhythmias: Electrophysiological considerations. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, eds. **Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001.
- RUOSLATHI, E., e YAMAGUCHI, Y Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell** 64: 867-869. 1991.
- SANCHEZ, E.F., GABRIEL, L.M., GONTIJO, S., GREMSKI, L.H., VEIGA, S.S., EVANGELISTA, K.S., EBLE, J.A., RICHARDSON, M. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from Bothrops leucurus venom. **Arch. Biochem. Biophys**. 468, 193–204. 1992.
- SANDRITTER W. E JESTAEDT R., Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Reduktionsindikator zur makroskopischen Diagnose des frischen Herzinfarktes, **Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie**. 41. 165-171. 1958.
- SARTIPY P, JOHANSEN B, CAMEJO G, ROSENGREN B, BONDJERS G, HURTCAMEJO E. Binding of human phospholipase A2 type II to proteoglycans. Differential effect of glycosaminoglycans on enzyme activity. **J Biol Chem**. 271(42):26307-14. 1996.
- SAVITZKY, A.H. The role of venom delivery strategies in snake evolution. **Evolution** 34: 1194-1204. 1980.

- SCHAFFAZICK N, AMARAL LS, FONSECA TF, TOMAZ MA, GABAN GA, BORGES PA, CALIL-ELIAS S, NOËL F, MELO PA, QUINTAS LE, CUNHA VM. Effect of heparin treatment on the expression and activity of different ion-motive P-type ATPase isoforms from mouse extensor digitorum longus muscle during degeneration and regeneration after *Bothrops jararacussu* venom injection. **Toxicon**. 55(1):52-60. 2010.
- SIFUENTES DN, EL-KIK CZ, RICARDO HD, TOMAZ MA, STRAUCH MA, CALILELIAS S, ARRUDA EZ, SCHWARTZ EF, MELO PA. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon** 51: 28-36. 2008.
- SILVA, C.J.; JORGE M.T.; RIBEIRO L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, 41. p. 251–255. 2003.
- SILVEIRA KS, BOECHEM NT, DO NASCIMENTO SM, MURAKAMI YL, BARBOZA AP, MELO PA, CASTRO P, DE MORAES VL, ROCCO PR, ZIN WA. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. **Respir Physiol Neurobiol**. 139(2):167-77. 2004.
- SOARES AM, ANDRIÃO-ESCARSO SH, ANGULO Y, LOMONTE B, GUTIÉRREZ JM, MARANGONI S, TOYAMA MH, ARNI RK, GIGLIO JR. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**. 373(1):7-15. 2000.
- SOARES AM, RODRIGUES VM, HOMSI-BRANDEBURGO MI, TOYAMA MH, LOMBARDI FR, ARNI RK, GIGLIO JR. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**. 36(3):503-14.1998.
- SOARES AM, SESTITO WP, MARCUSSI S, STÁBELI RG, ANDRIÃO-ESCARSO SH, CUNHA OA, VIEIRA CA, GIGLIO JR. Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising

approach to an enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol.** 36(2):258-70. 2004.

STEENBERGEN C, MURPHY E, LEVY L, LONDON RE. Elevation of cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. **Circ. Res.** 60:700-707.1987.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from Bothrops atrox venom (batroxobin). **Meth. Enzimol.** 45, 214-223. 1976.

SUE., S.C. SUE, P.K. RAJAN, T.S. CHEN, C.H. HSIEH W. WU, Action of Taiwan cobra cardiotoxin on membranes: binding modes of a  $\beta$ -sheet polypeptide with phosphatidylcholine bilayers. **Biochemistry.** 36:9826–9836, 1997.

SUN JJ, WALKER MJA: Action of cardiotoxins from the southern Chinese cobra (*Naja naja atra*) on rat cardiac tissue. **Toxicon.** 24:233–245, 1986.

TANAKA H, TAKAMATSU T. Spatiotemporal visualization of intracellular Ca<sup>2+</sup> in living heart muscle cells viewed by confocal laser scanning microscopy. **Acta Histochem Cytochem.** 36: 193–204. 2003.

THEWJITCHAROEN Y, POOPITAYA S. Ventricular tachycardia, a rare manifestation of Russell's viper bite: case report. **J Med Assoc Thai.** 88(12):1931-3. 2005.

TJONG SC, CHEN TS, HUANG WN et al. Structures of heparin-derived tetrasaccharide bound to cobra cardiotoxins: Heparin binding at a single protein site with diverse side chain interactions. **Biochemistry;** 46:9941-9952. 2007.

TU AT, BAKER B, WONGVIBULSIN S, WILLIS T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. **Toxicon.** 34(11-12):1295-300. 1996.

VITAL BRAZIL O: Peçonhas. In Charles Corbert Farmacodinâmica, ed. **G. Koogan,** 1044-1071, 1984.

- VONK, F.J., J.F. ADMIRAAL, K. JACKSON, R. RESHEF, M.A.G. DE BAKKER, K. VANDERSCHOOT, I. VAN DEN BERGE, M. VAN ATTEN, E. BURGERHOUT, A. BECK, P.J. MIRTSCHIN, E. KOCHVA, F. WITTE, B.G. FRY, A.E. WOODS, AND M.K. RICHARDSON. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature** 454: 630-633. 2008.
- VYAS AA, PAN JJ, PATEL HV, Analysis of binding of cobra cardiotoxins reveals a new b-sheet heparin-binding structural motif. **J Biol Chem.** 272:9661–9670. 1997.
- VYAS KA, PATEL HV, VYAS AA, WU W. Glycosaminoglycans bind to homogeneous cardiotoxins with different specificity. **Biochemistry.** 37:4527–4534. 1998.
- WANG CH, LIU JH, LEE SC. Glycosphingolipid-facilitated membrane insertion and of cobra cardiotoxin. **J Biol Chem.** 281:656-667. 2006
- WERMELINGER L.S., WERMELINGER, D.L. DUTRA, A.L. OLIVEIRA-CARVALHO, M.R. SOARES, C. BLOCH JR R.B. ZINGALI, Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides, **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 19: 1703–1708. 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION RABIES AND ENVENOMINGS. A neglected public health issue: Report of a consultative meeting. Geneva: **WHO**. Available: [http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf). (2007) Accessed 4 October 2012.
- WRIGHT, A.H. & A.A. WRIGHT. 1957. **Handbook of Snakes of the United States and Canada**. Comstock. Ithaca and London. p. 755.
- WU WG, TJONG SC, WU PL, KUO JH, WU K. Role of heparan sulfates and glycosphingolipids in the pore formation of basic polypeptides of cobra cardiotoxin. **Adv Exp Med Biol.** 677:143-9. 2010.
- Wu WG. Cobra cardiotoxin and phospholipase A2 as GAG-binding toxins: on the path from structure to cardiotoxicity and inflammation. **Trends Cardiovasc Med.** 8(6):270-8. 1998.

ZINGALI RB, CARLINI CR, FRANCISCHETTI IM, GUIMARÃES JA. *Bothrops jararaca* snake venom: effects on platelet aggregation. **Thromb Res.** 58(3). 303-331.1990.