Luana Valente Senise

Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por venenos de serpentes *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antibotrópico

Evaluation of the hemostatic disturbances evoked by young and adult *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) snake venoms and effectiveness of the treatment with botropic antivenin

São Paulo

2014

Luana Valente Senise

Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por venenos de serpentes *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antibotrópico

Evaluation of the hemostatic disturbances evoked by young and adult *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) snake venoms and effectiveness of the treatment with botropic antivenin

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências na Área de Fisiologia Geral.

Versão corrigida. A versão original desta tese está disponível no Instituto de Biociências da USP.

Orientadora: Dra. Ida Sigueko Sano Martins

São Paulo

2014

Luana Valente Senise

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Senise, Luana Valente
Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por venenos de serpentes *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antibotrópico / Luana Valente Senise ; orientadora Ida Sigueko Sano Martins. -- São Paulo, 2014.
140 f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. *Bothrops jararaca*. 2. Envenenamento. 3. Ontogenia. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

“Nothing in life is to be feared, it is to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”

Marie Curie

Dedico este trabalho aos meus pais, Lena e Wlade, meus maiores exemplos, meus melhores amigos.

Agradecimentos

Agradeço a Dra. Ida Sigueko Sano Martins, por ter aberto as portas do Laboratório de Fisiopatologia para mim, por ter aceitado me orientar, pela confiança depositada esses anos todos, pela amizade, por todas as conversas, pelo exemplo de caráter e competência, e principalmente por ter me ensinado como um bom pesquisador deve ser.

Agradeço aos pesquisadores do Laboratório de Fisiopatologia, Luis, Diva, Cris, Sandra e Renata pela amizade, pelas conversas, e pelo apoio para que eu pudesse chegar até aqui.

Agradeço ao Dr. Marcelo Santoro por todos os ensinamentos e pelo auxílio no desenvolvimento desse projeto.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Fisiopatologia, Neusa, André, Magna, Cema, Neuceli, Juscelino, Manoel, Meire, Leni e Jane, por todo auxílio e amizade ao longo desses anos.

Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório, com os quais convivi durante a maior parte das horas dos meus dias, especialmente, Carol, Tati, Marcio, Priscila, Karina, jeferson, e Bianca.

Agradeço especialmente a Sâmella Oliveira, pela amizade e por todo apoio, pois sem você este trabalho não teria sido possível.

Agradeço ao Dr. Benedito Prezoto, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, por permitir a realização dos experimentos de tromboelastometria em seu laboratório.

Agradeço a Dra. Marta Antoniazzi e a Beatriz Mauricio, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, por colaborar com o desenvolvimento dos experimentos MEV.

Agradeço ao pesquisador Sávio Sant´Anna, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pelo auxílio com o manejo das serpentes filhotes, e pelas orientações acerca da biologia desses animais.

Agradeço a Pasquale Morena, pelo treinamento no uso dos equipamentos de tromboelastometria e Impact-R, além de todo apoio ao longo do projeto.

Agradeço aos Professores, colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências, em especial a Roseli, por toda ajuda ao longo desses anos.

Agradeço aos funcionários da secretaria de Pós-graduação, em especial Helder, Erika e Eduardo, pela disposição em sempre ajudar e tornar a vida dos alunos mais fácil.

Agradeço a minha família, D. Helena, D. Ada, Wany, Jade, meus tios e primos pelo carinho e apoio, hoje e sempre.

Agradeço a Carmen por todos os sábios conselhos e ensinamentos. E por todo carinho e amizade dedicado a minha família ao longo destes anos

Agradeço aos amigos de longa data, por estarem sempre presentes, mesmo que não todos os dias.

Agradeço a Vilma, Jaime e família, por toda força, carinho e amizade ao longo desses anos.

Agradeço a Nina, Vicky, Amarildo e aos trigêmeos, que tornaram nossas vidas muito mais alegres nos últimos tempos.

Agradeço aos meus pais, Maria Helena e Wladimir, e ao meu irmão Maurício, por todo apoio para a realização do meu sonho, e também por todo amor, carinho, amizade, força e confiança.

Agradeço a Diego Orts, que esteve comigo desde o primeiro minuto do Doutorado, meu companheiro de todas as horas, meu colega cientista, meu amor, meu melhor amigo.

Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Bolsa de doutorado - CAPES DS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Auxílio à pesquisa nº 2010/19419-3

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Programa INCTTOX: CNPq 573790/2088-6 e FAPESP 2008/57898-0

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por *intermédio* do *Programa de Apoio à Pós-Graduação* (PROAP)

Auxílio para participação de evento: "First Oxford World Symposium Venoms: Venoms 2012" 18 a 20 de setembro de 2012, Oxford, Inglaterra.

Pró-reitoria de Pós-Graduação – Universidade de São Paulo

Auxílio para participação de evento: "17th Congress of the European Section of the International Society on Toxinology" 11 a 15 de Setembro 2011, Valencia, Espanha.

Índice

Lista de Figuras ..... **I**

Lista de Tabelas ..... **VI**

Lista de símbolos e Abreviaturas ..... **VII**

Lista de abreviaturas VIII

Lista de símbolos IX

1. Introdução **1**

1. SERPENTES: FAMÍLIA VIPERIDAE 2

1.1. GÊNERO BOTHROPS (WAGLER, 1824), ESPÉCIE BOTHROPS JARARACA (WIED-NEUWIED, 1824) 3

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO ENVENENAMENTO BOTRÓPICO 6

1.3 ENVENENAMENTO POR SERPENTES DO GÊNERO BOTHROPS: DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS 9

1.4 BOTHROPS JARARACA: VARIAÇÃO ONTOGENÉTICA 11

2. Justificativa e Objetivos **14**

2.1. JUSTIFICATIVA 15

2.2. OBJETIVOS 16

3. Material e Métodos **17**

3.1. ANIMAIS 18

3.2. VENENOS 18

3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 18

3.3.1. Grupos experimentais 18

3.4. COLETA DE AMOSTRAS 20

3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS 22

3.5.1 Hemograma, Leucograma e esfregaços sanguíneos 22

3.5.2 Dosagem de fibrinogênio 22

3.5.3 Dosagem de hemoglobina plasmática 23

3.5.4 Agregação plaquetária em PRP 23

3.5.5 Análise de função plaquetária por Impact R Research System® 24

3.5.6 Dosagem de fator II e fator X da coagulação 26

3.5.7 Dosagem de haptoglobina plasmática 27

3.5.8 Dosagem de fator de von Willebrand (vWF) 27

3.5.9 Dosagem do complexo trombina-antitrombina III (TAT) 28

3.5.10 Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f)..... 29
3.5.11. Análise por Tromboelastometria (ROTEM®) 31
3.5.12 Análise das alterações morfológicas da fibrina por microscopia eletrônica de varredura..... 36
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA 37
4. Resultados 38
4.1. TROMBOELASTOMETRIA..... 39
4.1.1. Representações gráficas: Ensaios de NATEM, EXTEM, INTEM e FIBTEM 39
4.1.2. Parâmetros: CT, CFT, MCF e ângulo alfa 43
4.2. HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA 52
4.3. PLAQUETAS 57
4.3.1. Contagem de plaquetas e morfologia plaquetária 57
4.3.2. Função plaquetária..... 61
4.4. FATORES DA COAGULAÇÃO 68
4.4.1. Fibrinogênio 68
4.4.2. Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f):. 70
4.4.3. Dosagem de fator de von Willebrand (vWF): 72
4.4.4. Fator II e Fator X da coagulação: 74
4.4.5. Dosagem do complexo trombina-antitrombina III (TAT):..... 78
4.5. HEMÓLISE INTRAVASCULAR 80
4.5.1. Dosagem de hemoglobina plasmática 80
4.5.2. Dosagem de haptoglobina plasmática 81
4.5.3. Hemólise intravascular 81
4.6. FIBRINA 85
4.6.1. Análise das alterações morfológicas da fibrina por microscopia eletrônica de varredura:..... 85
5. Discussão 87
6. Conclusões..... 99
7. Considerações Finais..... 101
8. Resumo 103
9. Abstract..... 105
10. Referências..... 107

Lista de Figuras

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA SERPENTE *BOTHROPS JARARACA* NO BRASIL (MAPA MODIFICADO DE CARDOSO E COL., 2003). (FONTE DA FOTO: HERPETO.ORG)

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE CASOS DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL NO ANO DE 2012 DE ACORDO COM TIPO DE ACIDENTE (SINAN, 2014).

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE CASOS DE ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL NO ANO DE 2012 DE ACORDO COM O GÊNERO DA SERPENTE, INCLUINDO NOTIFICAÇÕES SEM DEFINIÇÃO DE GÊNERO (IGNORADOS/BRANCOS) (SINAN, 2014).

FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE CASOS DE ACIDENTES OFÍDICOS NO ESTADO DE SÃO PAULO NO ANO DE 2012 DE ACORDO COM O GÊNERO DA SERPENTE (SINAN, 2014).

FIGURA 5 - ATUAÇÃO DOS ATIVADORES DO TIPO TROMBINA-SÍMILES (SETA VERDE) E PRÓ-COAGULANTES (SETA VERMELHA) DO VENENO DE SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*, NO PROCESSO DE COAGULAÇÃO. FL: FOSFOLÍPIDEOS. (ADAPTADO DE SANO-MARTINS & SANTORO, 2003).

FIGURA 6 – GRUPOS EXPERIMENTAIS: VBJA + SAL, VBJA + SAB, VBJF + SAL, VBJF + SAB E SAL + SAL. COLETA DE AMOSTRAS REALIZADA EM 3, 6, 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO DOS VENENOS.

FIGURA 7- GRUPOS EXPERIMENTAIS: VBJA E VBJF. COLETA DE AMOSTRAS REALIZADA EM 1 HORA APÓS A INOCULAÇÃO DOS VENENOS.

FIGURA 8 – METODOLOGIA DE CONE E PLACA DO DISPOSITIVO IMPACT-R (REF. VARON & SAVION, 2011).

FIGURA 9 – METODOLOGIA DE COPO E PINO DO SISTEMA ROTEM®, E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA GERADA PELO SOFTWARE DE ANÁLISE DO PROCESSO DE COAGULAÇÃO DO SANGUE, COM INDICAÇÃO DOS PARÂMETROS TEMPO DE COAGULAÇÃO (CT), TEMPO DE FORMAÇÃO DO COÁGULO (CFT), ÂNGULO ALFA, E FIRMEZA MÁXIMA DO COÁGULO (MCF) (MODIFICADO DE WWW.ROTEM.DE E ROTEM® SYSTEM – USER MANUAL, 2006).

FIGURA 10 – TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRA DE SANGUE DE RATO CONTROLE (SAL + SAL). REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ENSAIO EM SANGUE TOTAL NÃO CITRATADO (300ML) COM ADIÇÃO APENAS DE SOLUÇÃO SALINA (20 ML) (FIG. 10 A: NATEM) E ENSAIOS EM SANGUE TOTAL CITRATADO (300ML), COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO 0,2 M (20 ML) E REAGENTES ESPECÍFICOS (20 ML) PARA ANÁLISE DAS VIAS EXTRÍNSECA (FIG 10 B: EXTEM), INTRÍNSECA (FIG 10 C: INTEM), E FIBRINOGÊNIO (FIG 10 D: FIBTEM). DADOS CAPTADOS PELO SOFTWARE ROTEM® NO INTERVALO DE TEMPO DE 1 HORA.

FIGURA 11 – TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRA DE SANGUE DE RATO CONTROLE (SAL + SAB). REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ENSAIO EM SANGUE TOTAL NÃO CITRATADO (300ML) COM ADIÇÃO APENAS DE SOLUÇÃO SALINA (20 ML) (FIG. 10 A: NATEM) E ENSAIOS EM SANGUE TOTAL CITRATADO (300ML), COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO 0,2 M (20 ML) E REAGENTES ESPECÍFICOS (20 ML) PARA ANÁLISE DAS VIAS EXTRÍNSECA (FIG 10 B: EXTEM), INTRÍNSECA (FIG 10 C: INTEM), E FIBRINOGÊNIO (FIG 10 D: FIBTEM). DADOS CAPTADOS PELO SOFTWARE ROTEM® NO INTERVALO DE TEMPO DE1H.

FIGURA 12 – TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RATO COLETADAS APÓS 6 HORAS DA INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG) E TRATAMENTO *I.V.* COM SORO ANTIBOTRÓPICO (VBJA + SAB; VBJF + SAB) OU SALINA (VBJA + SAL; VBJF + SAL). REPRESENTAÇÃO GRÁFICA

DO ENSAIO EM SANGUE TOTAL NÃO CITRATADO (300ML) COM ADIÇÃO APENAS DE SOLUÇÃO SALINA (20 ML) (FIG. 12 A1-A4: NATEM), E ENSAIOS EM SANGUE TOTAL CITRATADO (300ML), COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO 0,2 M (20 ML) E REAGENTES ESPECÍFICOS (20 ML) PARA ANÁLISE DAS VIAS EXTRÍNSECA (FIG. 12 B1-B4: EXTEM), INTRÍNSECA (FIG. 12 C1-C4: INTEM), E FIBRINOGÊNIO (FIG. 12 D1-D4: FIBTEM). OS DADOS FORAM CAPTADOS PELO SOFTWARE ROTEM® NO INTERVALO DE TEMPO DE 1 HORA. CADA CONJUNTO DE GRÁFICOS (A-D) É REPRESENTATIVO DE UM ANIMAL DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL.

FIGURA 13 – TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RATO COLETADAS APÓS 24 HORAS DA INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG) E TRATAMENTO *I.V.* COM SORO ANTIBOTRÓPICO (VBJA + SAB; VBJF + SAB) OU SALINA (VBJA + SAL; VBJF + SAL). REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ENSAIO EM SANGUE TOTAL NÃO CITRATADO (300ML) COM ADIÇÃO APENAS DE SOLUÇÃO SALINA (20 ML) (FIG. 13 A1-A4: NATEM), E ENSAIOS EM SANGUE TOTAL CITRATADO (300ML), COM ADIÇÃO DE CLORETO DE CÁLCIO 0,2 M (20 ML) E REAGENTES ESPECÍFICOS (20 ML) PARA ANÁLISE DAS VIAS EXTRÍNSECA (FIG. 13 B1-B4: EXTEM), INTRÍNSECA (FIG. 13 C1-C4: INTEM), E FIBRINOGÊNIO (FIG. 13 D1-D4: FIBTEM). OS DADOS FORAM CAPTADOS PELO SOFTWARE ROTEM® NO INTERVALO DE TEMPO DE 1 HORA. CADA CONJUNTO DE GRÁFICOS (A-D) É REPRESENTATIVO DE UM ANIMAL DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL.

FIGURA 14 (A-F) – PARÂMETRO TEMPO DE COAGULAÇÃO (CT) DA ANÁLISE POR TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS EM 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DADOS CAPTADOS AO LONGO DE 1 HORA. DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE, PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB; **#** E VBJA+SAL EM RELAÇÃO A VBJF + SAL.

FIGURA 15 (A-F) – PARÂMETRO TEMPO DE FORMAÇÃO DO COÁGULO (CFT) DA ANÁLISE POR TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS EM 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DADOS CAPTADOS AO LONGO DE 1 HORA. DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE, PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL)**;** *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB. **#** CFT DEMASIADAMENTE PROLONGADO NO GRUPO VBJA + SAL, SENDO PARTE DAS AMOSTRAS CONSIDERADAS COMO INCOAGULÁVEIS PELO SOFTWARE DE ANÁLISE.

FIGURA 16 (A-C) – PARÂMETRO ÂNGULO ALFA (^{O}) DA ANÁLISE POR TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS EM 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DADOS CAPTADOS AO LONGO DE 1HORA. DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE, PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB; **#** VBJF + SAL E **#** VBJA+SAL EM 6 H EM RELAÇÃO A 24 H; **#** VBJA+SAB EM 24 H EM RELAÇÃO A 6 H .

FIGURA 17(A-C) – PARÂMETRO FIRMEZA MÁXIMA DO COÁGULO. ANÁLISE POR TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS EM 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DADOS CAPTADOS AO LONGO DE 1HORA. DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE, PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); *****ENTRE OS GRUPOS

VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB; **#** VBJF + SAL E **#** VBJA+SAL EM 6 H EM RELAÇÃO A 24 H.

FIGURA 18 (A-B) - CONTAGEM DE ERITRÓCITOS (A) E HEMATÓCRITO (B) DO SANGUE DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 H APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); **#** VBJA + SAL EM 24 H EM RELAÇÃO A 3 E 6 H; **#** E VBJF + SAL EM 24 H EM RELAÇÃO A 3 H E 6 H ; **#** VBJA EM RELAÇÃO A VBJF.

FIGURA 19 – CONTAGEM DE LEUCÓCITOS DO SANGUE DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 H APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); *****ENTRE OS GRUPOS VBJF + SAL E VBJF + SAB; **#** VBJA + SAL EM 6 H E RELAÇÃO A 3 H (P=0,004); **#** VBJF + SAL EM 6 H EM RELAÇÃO A 3 E 24 H (P<0,001).

FIGURA 20 – PERCENTUAL DE NEUTRÓFILOS, LINFÓCITOS E MONÓCITOS DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 H APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.*

FIGURA 21 (A-B) - CONTAGEM DE PLAQUETAS (A) E PLAQUETÓCRITO (B) DO SANGUE DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 H APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL)**;** *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** VBJF + SAL E VBJF + SAB; ## VBJA E VBJF EM 1 H EM RELAÇÃO AOS GRUPOS TRATADOS COM SAL EM 3 E 6 H; **#** VBJA + SAL E VBJF + SAL EM 3H E 6H, **#** VBJA+SAB EM 24 H EM RELAÇÃO A VBJF + SAB; GRUPOS **#** VBJA + SAB E **#** VBJF + SAB EM RELAÇÃO AOS OUTROS TEMPOS.

FIGURA 22 (A-B) - VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO (VPM) (A) E AMPLITUDE DE DISTRIBUIÇÃO PLAQUETÁRIA (ADP) (B) DO SANGUE DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 H APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL)**;** *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB.

FIGURA 23 – AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR COLÁGENO EM PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) DO SANGUE DE RATOS EM 3, 6 E 24 H APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA, PARA P<0,05, *EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB*; VBJF + SAL E VBJF + SAB*; E ENTRE OS GRUPOS TRATADOS COM SAB (#VBJA + SAB E #VBJF + SAB) EM 24 H EM RELAÇÃO A ESSES MESMOS GRUPOS EM 3 E 6 H.

FIGURA 24 – ADESÃO PLAQUETÁRIA POR IMPACT-R SYSTEM. AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS EM 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.*

FIGURA 25 (A-C) - ADESÃO PLAQUETÁRIA POR IMPACT-R SYSTEM. PERCENTUAL DE SUPERFÍCIE DE COBERTURA (SC) DA PLACA POR PLAQUETAS DE RATO EM 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA, PARA P<0,05, *EM

RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL), *E ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB, *E VBJF + SAL E VBJF + SAB.

FIGURA 26 (A-C) - ADESÃO PLAQUETÁRIA POR IMPACT-R SYSTEM. NÚMERO DE OBSERVAÇÕES DE PLAQUETAS DE RATO EM 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL), *E ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB, * E VBJF + SAL E VBJF + SAB.

FIGURA 27 (A-C) - ADESÃO PLAQUETÁRIA POR IMPACT-R SYSTEM. TAMANHO DE AGREGADOS PLAQUETÁRIOS (AS) EM μM^2, DE PLAQUETAS DE RATO EM 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL), *E ENTRE OS GRUPOS VBJF + SAL E VBJF + SAB.

FIGURA 28 – DOSAGEM DO FIBRINOGÊNIO PLASMÁTICO DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE, PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL)**;** *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB; # VBJF + SAB EM RELAÇÃO A VBJA+SAB; # VBJF + SAB EM 24 H EM RELAÇÃO A 3 E 6 H; # VBJA+SAB EM 3 H EM RELAÇÃO A 6 E 24H E VBJA + SAL EM 24 H EM RELAÇÃO A 3 E 24 H ; # VBJA+SAL EM RELAÇÃO A VBJF + SAL EM 24 H ; ## VBJA E VBJF EM 1 H EM RELAÇÃO AOS GRUPOS TRATADOS COM SAL EM 3, 6 E 24 H.

FIGURA 29 – DOSAGEM DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE FIBRINOGÊNIO E FIBRINA (PDF/F) DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); ***** ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB, ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB; # VBJA + SAB E VBJF + SAB EM 3 HORAS; # # GRUPOS TRATADOS COM SALINA OU SAB EM 3 H EM RELAÇÃO AOS MESMOS GRUPOS EM 6 E 24 HORAS.

FIGURA 30 – DOSAGEM DE FATOR DE VON WILLEBRAND (VWF) DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL); *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB, *****E VBJF + SAL E VBJF + SAB; #VBJA + SAB E #VBJF + SAB EM 3 H EM RELAÇÃO A 6 E 24 H; # VBJA+SAL EM RELAÇÃO A VBJF + SAL EM 24 H (P=0,015).

FIGURA 31 (A-D) - DOSAGEM DE FATOR II DA COAGULAÇÃO NO PLASMA DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL), *E ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB, E *VBJF + SAL E VBJF + SAB.

FIGURA 32 (A-D) - DOSAGEM DE FATOR X DA COAGULAÇÃO NO PLASMA DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL), *E ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB, *E VBJF + SAL E VBJF + SAB.

FIGURA 33 (A-D) - DOSAGEM DO COMPLEXO TROMBINA-ANTITROMBINA III (TAT) DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL), *****ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB, ***** E VBJF + SAL E VBJF + SAB, # ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJF + SAL EM 3 H (P<0,001), E ENTRE OS GRUPOS TRATADOS COM SAB EM 24 HORAS (P<0,001).

FIGURA 34 – DOSAGEM DE HEMOGLOBINA PLASMÁTICA DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL)**; *** ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** VBJF + SAL E VBJF + SAB; E ENTRE OS GRUPOS # VBJA + SAB / VBJA + SAL, E # VBJF + SAB / VBJF + SAL EM 3 H EM RELAÇÃO A 6 E 24HS.

FIGURA 35 – DOSAGEM DE HAPTOGLOBINA PLASMÁTICA DE RATOS EM 1, 3, 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE PARA P<0,05, *****EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE (SAL + SAL)**; *** ENTRE OS GRUPOS VBJA + SAL E VBJA + SAB; ***** VBJF + SAL E VBJF + SAB; ENTRE **#** VBJA + SAL / VBJA + SAB E **#** VBJF + SAL / VBJF + SAB EM 24 H EM RELAÇÃO A 3 E 6 H; E **#** ENTRE VBJA+ SAL E VBJF + SAL EM 24 HS (P<0,001).

FIGURA 36 – ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS REPRESENTANDO A MORFOLOGIA DAS HEMÁCIAS DO SANGUE DE RATOS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS SAL + SAL (A), VBJA (B), VBJF (C), VBJA + SAB (D1-D3), VBJA + SAL (E1-E3), VBJF + SAB (F1-F3) E VBJF + SAL (G1-G3) EM 1H (B,C), 3 H (D1-G1), 6 H (D2-G2) E 24 H (D3-G3) APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.* AS SETAS INDICAM A PRESENÇA DE ESQUIZÓCITOS EM TODOS OS GRUPOS INOCULADOS COM OS VENENOS, MAS PREDOMINANTEMENTE EM VBJA + SAL E VBJF + SAL EM 3H (E1, G1).

FIGURA 37 (A1-E2) - REDE DE FIBRINA DE AMOSTRAS DE PPP ANALISADAS AO MEV DE RATOS INOCULADOS COM VENENO DE *B. JARARACA* FILHOTES (D1-D2; E1-E2) E ADULTAS (B1-B2; C1-C2) E TRATADOS COM SAB (B1-B2; D1-D2) OU SAL (C1-C2; E1-E2), E RATOS CONTROLE (SAL + SAL), EM AUMENTOS DE 5.000 E 10.000X.

Lista de Tabelas

TABELA 1 – PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO DO ENSAIO FIBTEM DA ANÁLISE POR TROMBOELASTOMETRIA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS EM 6 E 24 HORAS APÓS A INOCULAÇÃO *S.C.* DO VENENO DE *B. JARARACA* ADULTAS E FILHOTES (1,6 MG/KG), E TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA OU SORO ANTIBOTRÓPICO *I.V.*

Lista de símbolos e Abreviaturas

Lista de abreviaturas

ADP	Amplitude de distribuição plaquetária
AS	Tamanho de agregado plaquetário
AVC	Acidente vascular cerebral
CEUAIB	Comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan
CFT	Tempo de formação de coágulo
CIM	Coagulação intravascular maciça
CT	Tempo de coagulação
ELISA	"*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*"
EXTEM	Ensaio de ativação da via extrínseca
FIBTEM	Ensaio de fibrinogênio
FII	Fator II
FIIa	Fator II ativado
FV	Fator V
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
GTA	Glutaraldeído
HVB	Hospital Vital Brazil
i.v.	via intravenosa
IgG	Imunoglobulina G
INTEM	Ensaio de ativação da via intrínseca
LI	Limite inferior
LS	Limite superior
MCF	Firmeza máxima do coágulo
MCF	Firmeza máxima do coágulo
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
NATEM	Ensaio de sangue nativo
Ob	Número de observações
OsO_4	Ósmio
PDF/f	Produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina

PPP	Plasma pobre em plaqueta
PRP	Plasma rico em plaquetas
ROTEM	Tromboelastometria rotacioal
RVV-X	Ativador de fator X de *Vipera russelli*
s.c.	via subcutânea
SAB	Soro comercial antibotrópico
SC	superfície de cobertura de placa
SINAN	Sistema nacional de agravos de notificação
TAT	Complexo trombina – antitrombina III
TEG	Tromboelastografia
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
vBjA	veneno de *Bothrops jararaca* adulta
vBjF	veneno de *Bothrops jararaca* filhote
VPM	volume plaquetário médio
vWF	Fator de von willebrand

Lista de símbolos

µL	microlitro
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
dL	decilitro
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCL	Ácido clorídrico
HRP	"*horseradish peroxidase*"
mM	milimolar
Na_2CO_3	Bicarbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OPD	ortofenilenodiamina
PBS	"*Phosphate Buffered Saline*"
SAL	Solução salina

TBS	"*Tris Buffered Saline*"
TMB	"*3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*"

1. Introdução

1. SERPENTES: FAMÍLIA VIPERIDAE

As serpentes são os representantes da subordem Ophidia, que juntamente com a Subordem Sáuria e Amphisbaenia, compõem a Ordem Squamata, o mais moderno e numeroso grupo dos répteis viventes (1, 2). No Brasil, Ophidia é representada por nove famílias, 75 gêneros e 321 espécies (2, 3)

Algumas das características diagnósticas que definem o grupo das serpentes incluem o corpo extremamente alongado, sem apêndices locomotores e cintura escapular, o fechamento lateral da parede da caixa craniana, a substituição da sutura óssea das hemimandíbulas por um ligamento elástico, e a perda de pálpebras móveis (3).

As serpentes são animais exclusivamente carnívoros, que apresentam ampla diversidade de hábitos alimentares. Dependendo da espécie, podem se alimentar tanto de invertebrados, como moluscos, anelídeos e artrópodes, quanto vertebrados, como peixes, anfíbios, lagartos, aves, mamíferos, e mesmo de outras serpentes. Algumas espécies são especialistas, alimentando-se de poucos tipos de presas, ou mesmo de um único tipo, enquanto outras são generalistas, incluindo em sua dieta uma ampla variedade de presas. O hábito alimentar pode se modificar ao longo da vida. Observa-se em diversas espécies do gênero *Bothrops* a mudança do padrão de alimentação, uma vez que indivíduos jovens que demonstravam preferência por presas ectotérmicas, como anfíbios, lagartos e lacraias, passam a se alimentar de presas endotérmicas quando se tornam adultos (4) Modificações corporais permitem que esses animais se alimentem presas inteiras, às vezes maiores que seu próprio diâmetro (3). Assim sendo, a especialização alimentar está diretamente ligada à morfologia do crânio das serpentes. Nesses animais, o crânio é muito mais flexível que o de um lagarto por possuir um maior número de ligações móveis, e com articulações que permitem rotação, ocasionando uma maior complexidade de movimentos. Nas mandíbulas existe uma região frouxamente conectada por um ligamento elástico, a hemimandíbula, que juntamente com a pele flexível da boca e pescoço permitem que as extremidades mandibulares se separem, de modo que a porção mais larga da presa passe ventralmente à articulação da mandíbula com o crânio (5, 6).

O desenvolvimento evolutivo da dentição ocorreu possivelmente de forma simultânea ao da glândula de veneno, sendo que o estágio extremo de especialização da

estrutura inoculadora, bem como da própria glândula, é observado nos membros família Viperidae, por conta de dentição do tipo solenóglifa, composta por um par de dentes maxilares, muito longos, agudos e com canais internos inteiramente fechados. Quando as maxilas estão fechadas as presas inoculadoras giram de modo a dobrarem-se dentro da boca. Esse mecanismo de dobramento torna possível a presença de dentes inoculadores longos, que injetam o veneno profundamente no tecido da presa (1, 7, 8).

Acredita-se que este mecanismo de atuação tenha função estratégica na imobilização e posterior digestão de presas capturadas (9, 10). Infelizmente, esta notável aptidão para caça se torna um problema de saúde pública à medida que ocorrem picadas acidentais em humanos, os chamados acidentes ofídicos, que acabam ocasionando sequelas de diversos níveis de gravidade, sendo algumas permanentemente debilitantes e até fatais (9).

A família Viperidae compreende cerca de 250 espécies. Além do aparelho inoculador do tipo solenóglifo, os membros desta família têm também como caracteres diagnósticos a cabeça triangular, recoberta de pequenas escamas de aspecto similar às do corpo, e a presença de fosseta loreal (1). Dentro desta família se encontra a subfamília Crotalinae Oppel, 1811, que contém três dos gêneros mais importantes do ponto de vista de acidentes ofídicos: *Crotalus* Linnaeus, 1758, *Lachesis* Daudin, 1803 e *Bothrops* Wagler, 1824.

1.1. GÊNERO *BOTHROPS* (WAGLER, 1824), ESPÉCIE *BOTHROPS JARARACA* (WIED-NEUWIED, 1824)

As serpentes do gênero *Bothrops* são popularmente conhecidas como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca do rabo branco, malha de sapo, patrona, surucucurana, combóia e caiçaca (11). Este gênero é composto por algumas das espécies responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, como a *Bothrops erythromelas, Bothrops neuwiedi, Bothrops atrox, Bothrops jararacussu, Bothrops alternatus, Bothrops leucurus, Bothrops moojeni* (12-16), e principalmente *a Bothrops jararaca* (1, 17-21), além de espécies raras, ou endêmicas, como a *Bothrops insulares*, restrita a Ilha de Queimada Grande, (22) e *Bothrops alcatraz*, restrita a Ilha de Alcatrazes (23).

Morfologicamente, as espécies do gênero *Bothrops* podem ser caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações (sem guizo), apresentando geralmente escamas subcaudais em pares. O padrão de cores pode variar muito, dependendo da espécie e da região onde vivem. Podem habitar desde áreas abertas e campos (*B. alternatus*), regiões de Caatinga (*B. erythromelas*) e Cerrado (*B. moojeni*), beiras de rios e igarapés (*B. atrox*) e faixas litorâneas (*B. leucurus*) (1).

Algumas espécies têm grande capacidade adaptativa, como a *B. jararaca*, que pode ser encontrada colonizando áreas silvestres, agrícolas, suburbanas e até urbanas, tendo preferência para ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores (24).

A distribuição geográfica da *B. jararaca* inclui o norte da Argentina e nordeste do Paraguai, mas esta ocorre predominantemente no Brasil (1, 18), desde o sul do Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo a espécie mais comumente encontrada na região sudeste do país (Fig. 1). Os exemplares adultos atingem em média 1 m de comprimento, podendo chegar a 1,5 m. São serpentes vivíparas, e os filhotes nascem com cerca de 20 cm, de ninhadas de 3 a 35 indivíduos, principalmente entre os meses de fevereiro e março. As escamas apresentam coloração variada, abrangendo tons de castanho, marrom, preto e verde, e tem como característica diagnóstica a presença de manchas escuras em formato de uma letra “V” invertida ao longo do corpo (1).

Figura 1 – Distribuição geográfica da serpente *Bothrops jararaca* no Brasil (Mapa modificado de Cardoso e col., 2003). **(**Fonte da foto: herpeto.org)

Em 2009, Fenwick e colaboradores realizaram uma revisão taxonômica do gênero *Bothrops* (25), baseada em dados obtidos por análises filogenéticas de sequências de DNA mitocondrial, e propuseram uma mudança na classificação do gênero com a criação de um novo gênero, denominado *Bothropoides*. Este passaria a incluir algumas das espécies de *Bothrops* como *B. jararaca*, *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*, sendo esta última definida como a espécie tipo do novo gênero. Em 2011, Carrasco e colaboradores (26) realizaram uma análise de parcimônia baseada em caracteres morfológicos e também ecológicos das espécies de *Bothropoides* da América do Sul e questionaram a nova classificação proposta por Fenwick, propondo que o novo gênero entrasse em sinonímia com *Bothrops*. Assim, como parece não haver ainda um consenso pela adoção do gênero *Bothropoides*, neste trabalho optamos por manter a classificação anterior à proposta de Fenwick e colaboradores.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO ENVENENAMENTO BOTRÓPICO

No Brasil, os acidentes ofídicos representam um grave problema de Saúde Pública, estando relacionados a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos de campo. Sendo assim, é possível observar um padrão sazonal para a ocorrência de acidentes. Normalmente, há um aumento dos acidentes nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste no período de setembro a março, e na região Nordeste no período de janeiro a maio. Não se observa padrão sazonal definido na região Norte. Com relação as característica dos indivíduos acometidos, existe um predomínio marcante nas faixas etária de 15 a 49 anos, que correspondem ao grupo onde se concentra a força de trabalho, além de uma clara preponderância de indivíduos do sexo masculino (70%) (24).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, no ano de 2012 foram notificados 140.004 casos de acidentes por animais peçonhentos em todo território nacional, sendo que destes, 28.079 casos (20,0%) foram decorrentes de acidentes por serpentes (27). Uma pequena parte destes acidentes é atribuída a serpentes não peçonhentas (4,0%), enquanto em relação às peçonhentas, pode-se observar um predomínio absoluto de acidentes por *Bothrops*, com 72,0%, seguido de acidentes por *Crotalus* (8,0%), *Lachesis* (3,0%) e *Micrurus* com apenas 1,0% (Fig. 3). Apesar da melhora nos serviços de notificação, muitas vezes a informação sobre o gênero de serpentes envolvido no acidente acaba não sendo preenchida na ficha, ou é preenchida de forma equivocada. Este fato se torna evidente ao se observar a quantidade de ignorados/brancos, que no ano de 2012 totalizou 9.389 mil notificações (12,0%).

No estado de São Paulo, foram notificados 1.875 casos de acidentes por serpentes no ano de 2012. Destes, 278 foram notificados como ignorados/brancos. Assim como ocorre para o território nacional, o gênero predominante foi *Bothrops* (64,0%), seguido por *Crotalus* (11,0%), Micrurus (1,0%) (Fig. 4).

Ribeiro e Jorge (28) avaliaram prontuários médicos de pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*, atendidos no Hospital Vital Brazil (HVB, SP) nos anos de 1981 a 1990, e concluíram que a espécie *Bothrops jararaca* foi responsável por mais de 95% desses acidentes.

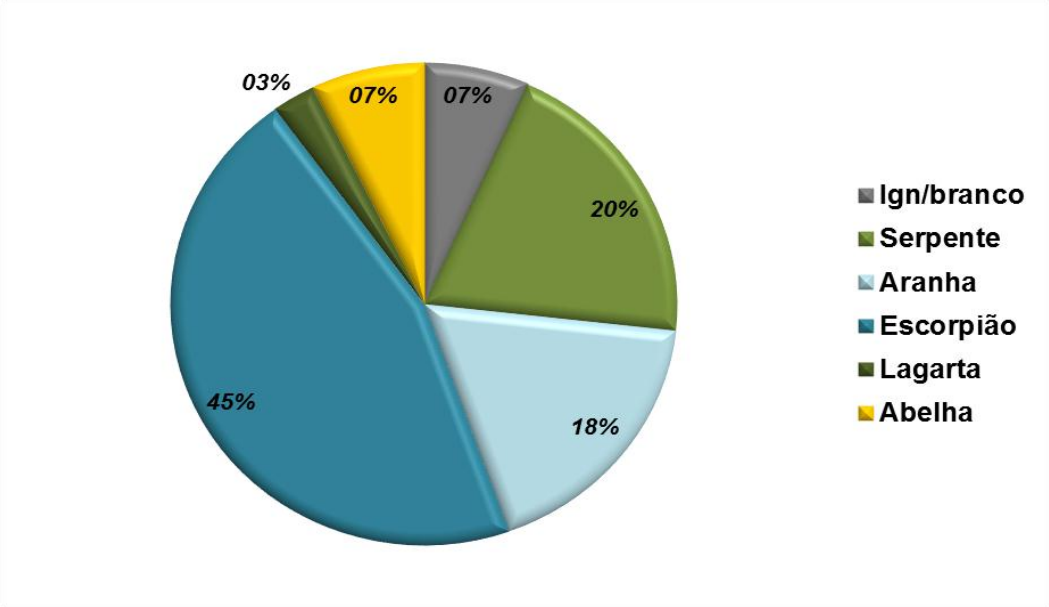

Figura 2 – Distribuição percentual de casos de acidentes por animais peçonhentos no Brasil no ano de 2012 de acordo com tipo de acidente (SINAN, 2014).

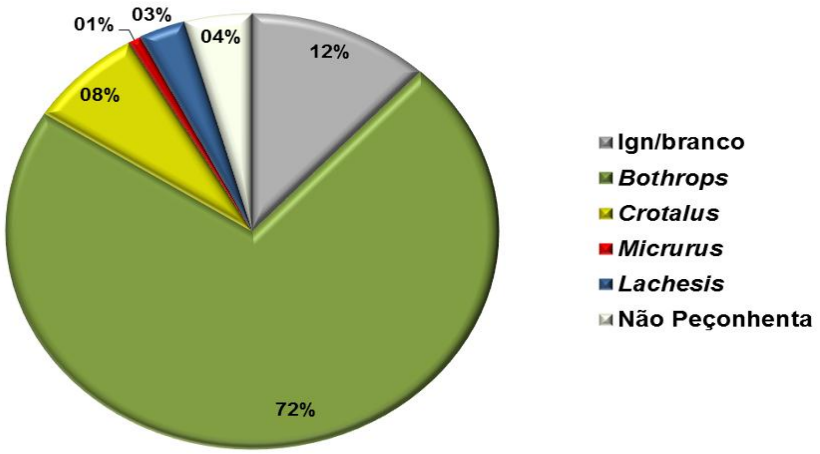

Figura 3 – Distribuição percentual de casos de acidentes ofídicos no Brasil no ano de 2012 de acordo com o gênero da serpente, incluindo notificações sem definição de gênero (ignorados/brancos) (SINAN, 2014).

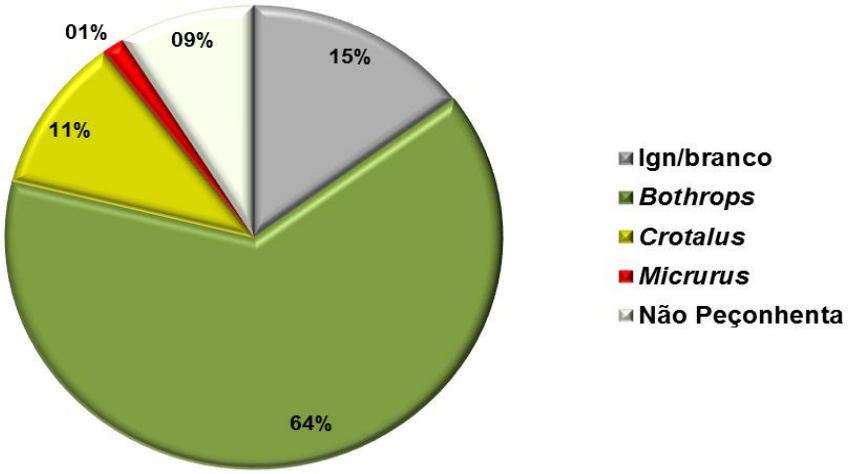

Figura 4 – Distribuição percentual de casos de acidentes ofídicos no Estado de São Paulo no ano de 2012 de acordo com o gênero da serpente (SINAN, 2014).

1.3 ENVENENAMENTO POR SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*: DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são misturas complexas, compostas por diversas proteínas e peptídeos biologicamente ativos que têm potencial para ocasionar quadros inflamatórios locais e distúrbios hemostáticos sistêmicos. A ação do veneno sobre o sistema hemostático acaba por lesionar vasos sanguíneos, ativando fatores de coagulação e interferindo com a função plaquetária e (7, 10, 29-31).

A atividade coagulante deste veneno se deve a presença de ativadores do tipo trombina-símiles, que hidrolisam diretamente o fibrinogênio (serinoproteases) (20, 32, 33), e de ativadores pró-coagulantes (metaloproteases), que são os ativadores de fator II (protrombina) (30, 32, 34) e de fator X (30, 35) (Fig. 5). Os quadros de inflamação aguda e hemorragias decorrem da ação de fosfolipases A2 (36, 37) e principalmente metaloproteinases pró-inflamatórias e hemorrágicas (38-43). Este veneno também age diretamente sobre as plaquetas, ativando estas células (atividade pró-agregante e aglutinante) ou inibindo suas funções (atividade antiagregante) (20, 44-47). Adicionalmente, também apresenta atividade fibrinolítica (7, 33, 38) e atividade anticoagulante, pela presença de ativadores de proteína C e inibidores de trombina, fator Xa e IX/X (20, 47-49). A incoagulabilidade sanguínea decorrente do envenenamento botrópico é causada pelo consumo dos fatores de coagulação e pela formação de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f) (50, 51).

O processo de envenenamento local por *Bothrops* é caracterizado por quadro de dor, edema, sangramento, aparecimento de bolhas e necrose tecidual. No envenenamento sistêmico, isto é, a distância do local da picada, observa-se normalmente gengivorragia, hematúria, equimose e coagulopatia de consumo (48, 52), sendo também relatados casos de insuficiência renal aguda (53). Mosquera e colaboradores (54) avaliaram 309 pacientes que sofreram envenenamento por *Bothrops ssp* e observaram uma prevalência de acidentes vasculares cerebrais (AVCs) de 2,6%, sendo 87,5% hemorrágicos e 12,5% isquêmicos. É interessante ressaltar que apesar da baixa prevalência de AVCs, o prognóstico deste tipo de ocorrência é muito ruim, uma vez que a mortalidade é alta e os sobreviventes apresentam sequelas (54).

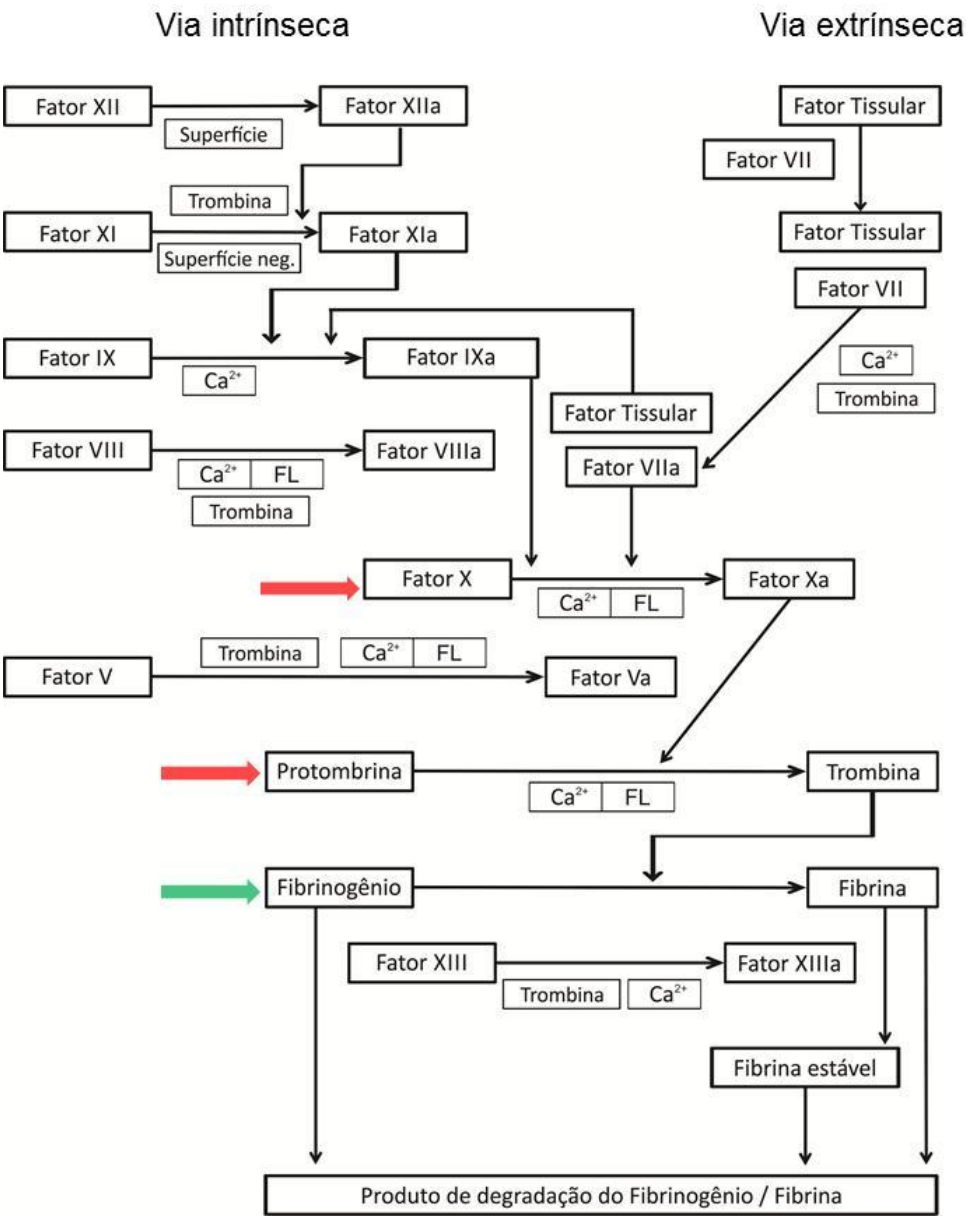

Figura 5 - Atuação dos ativadores do tipo trombina-símiles (seta verde) e pró-coagulantes (seta vermelha) do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, no processo de coagulação. FL: fosfolípideos. (Adaptado de Sano-Martins & Santoro, 2003).

Com relação à avaliação laboratorial dos distúrbios hemostáticos, observa-se que seres humanos e animais envenenados apresentam consumo de fibrinogênio circulante, disfunção plaquetária e plaquetopenia, consumo de fatores de coagulação V, VIII e II, geração de trombina intravascular, e ativação secundária do sistema fibrinolítico (55, 56).

É importante destacar que distúrbios hemostáticos, como os acima citados, podem ocorrer em mais de 50% dos casos de envenenamento por *Bothrops* em humanos (18) e que, em acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, o óbito está relacionado normalmente à insuficiência renal e respiratória agudas, choque, septicemia e hemorragia grave (19, 57).

1.4 *BOTHROPS JARARACA*: VARIAÇÃO ONTOGENÉTICA

Variações na composição e na atividade enzimática dos venenos de adultos e filhotes (recém-nascidas e jovens) de *B. jararaca* implicam em diferenças nas manifestações clínicas, locais e sistêmicas (58). Ribeiro e colaboradores (18) observaram que o comprimento de *B. jararaca* é um importante fator prognóstico para o desenvolvimento de necrose, cuja ocorrência seria característica de envenenamentos por serpentes maiores (adultas). Em envenenamento acidental de humanos por filhotes, observa-se que a formação de edema ou necrose tecidual no local da picada são ocorrências raras. Portanto, pode-se dizer que em comparação com o veneno de adultos, o veneno de filhotes de *B. jararaca* apresentaria menor efeito local (17). A distribuição dos ativadores de fatores coagulação sanguínea dos venenos serpentes do gênero *Bothrops* é variável conforme a espécie (32) e, intra-especificamente, conforme variações individuais, estágio ontogenético e diferenças geográficas (22, 48, 59-62). Os venenos de *B. jararaca* adultas e filhotes possuem ativadores de fatores X e II e enzimas trombina-símiles (32). Porém, são observadas diferenças no potencial de ativação das enzimas que agem sobre os fatores II e X no veneno de filhotes, o que acarreta em um aumento da atividade coagulante desse veneno (17, 48, 58-60, 62). Portanto, em relação ao efeito sistêmico, o veneno de filhotes de *B. jararaca* teria maior potencial para causar alterações de coagulação e quadros de incoagulabilidade sanguínea (17, 51, 59). De fato, Ribeiro e Jorge observaram uma maior frequência de incoagulabilidade sanguínea em pacientes picados por filhotes de *B. jararaca* (63). Outra diferença com relação ao quadro clínico do acidente botrópico causado por

serpentes adultas e filhotes foi vista recentemente pela avaliação de diversos parâmetros laboratoriais de pacientes atendidos no HVB (64). Nesse estudo, foram observados indícios de hemólise intravascular subclínica em pacientes picados por serpentes *B. jararaca*, cuja frequência foi maior naqueles pacientes picados por serpentes filhotes. A presença de hemólise subclínica no envenenamento botrópico (64, 65) foi relatada anteriormente, mas sua patogenia era desconhecida. Recentemente, Senise e colaboradores (66, 67) evidenciaram que a etiopatogenia de hemólise subclínica pelo envenenamento por serpentes *B. jararaca* adultas está vinculada à geração de trombina e fibrina estável, e que os ativadores pró-coagulantes do veneno (ativadores de FII e FX) teriam papel crucial no consumo do fibrinogênio plasmático. Sendo assim, ao considerar-se que as alterações na coagulação sanguínea decorrentes do envenenamento sistêmico por *B. jararaca* são atribuídas não somente às enzimas trombina-símile, mas também aos ativadores de fatores II e X, pode-se inferir que existe um maior risco de ocorrência de coagulopatias de consumo, insuficiência renal, anemia hemolítica microangiopática (decorrente de formação de trombina intravascular) e AVCs no envenenamento por filhotes de *B. jararaca*.

Com base nas manifestações clínicas do envenenamento, os casos são classificados atualmente quanto a sua gravidade em leves, moderados ou graves. Um caso de natureza leve é aquele em que não existe dor ou edema evidente, e manifestações hemorrágicas locais e sistêmicas são pouco intensas ou ausentes. Um caso de natureza moderada é caracterizado por dor e edema evidente, acompanhado ou não de alterações hemorrágicas locais e sistêmicas. Em um caso grave, o edema local é intenso e extenso, acompanhado de dor também intensa e presença de bolhas, além de hemorragia, choque, anúria e equimose (24). É interessante ressaltar que diferenças no tempo de coagulação podem não ser levadas em consideração na classificação de um caso, e normalmente as manifestações locais acabam sendo o critério para a categorização de gravidade (24). Este fato minimiza a gravidade do processo de envenamento por filhotes de *B. jararaca*, cujos casos acabam sendo considerados como de natureza leve por não ocasionarem lesões locais aparentes.

A indicação do número de ampolas a serem utilizadas na soroterapia é definida após a classificação de um caso como leve, moderado ou grave. De acordo com o manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos (24), a

recomendação da quantidade de soro antibotrópico a ser administrado é a seguinte: casos leves, de 2 a 4 ampolas; moderados, de 4 a 8 ampolas e graves, 12 ampolas.

Nos últimos anos, a dose a ser ministrada de soro capaz de neutralizar o veneno tem sido revista. Atualmente, existem indícios de que a dose ideal para o tratamento não seria aquela capaz somente de neutralizar o veneno, mas sim, aquela que o fizesse em curto espaço de tempo. Em trabalho de Jorge e Ribeiro (68) com pacientes atendidos no Hospital Vital Brazil, foi observado que as doses recomendadas pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo e pelo Ministério da Saúde para o tratamento de casos leves e moderados de envenenamento por *B. jararaca* poderiam ser desnecessariamente altas. Em estudo realizado por Jorge e colaboradores (69) foi demonstrado que a utilização de soro antibotrópico em menor dose, em casos leves e moderados não proporciona uma recuperação mais tardia da coagulação. Entretanto, não é possível saber por este estudo se ocorre aumento da letalidade ou se há diferença de recuperação entre os acidentes com serpentes filhotes e adultas, visto que os dois grupos não foram analisados separadamente.

Como citado anteriormente, em envenenamentos por filhote de *B. jararaca* existe uma maior frequência de quadros de incoagulabilidade sanguínea. Mesmo assim, esses casos são classificados como sendo de natureza leve, já que os pacientes normalmente não apresentam lesões locais importantes. Assim, a dose de soro antibotrópico preconizada para envenenamentos por filhotes de *B. jararaca* pode não ser a adequada no que se refere à presença de coagulopatias, e a administração de uma dose menor poderia acarretar em uma recuperação mais delongada do quadro de distúrbio hemostático do paciente, o que aumentaria as chances de ocorrência de agravos decorrentes do envenenamento sistêmico**.**

2. Justificativa e Objetivos

2.1. JUSTIFICATIVA

Há vários estudos que evidenciam as diferenças na composição dos venenos de serpentes B*othrops* filhotes e/ou adultas com relação às suas atividades *in vitro* sobre a hemostasia (58, 59, 61) e, atualmente, estudos de proteoma (60, 70). Por outro lado, estudos publicados com relação às diferenças no quadro clínico de pacientes humanos picados por serpentes filhotes ou adultas de *Bothrops jararaca* (17, 63) levaram em consideração somente testes básicos da coagulação, como o tempo de coagulação em sangue total, que não avalia em profundidade a gravidade das alterações hemostáticas desses pacientes. Recentemente, Antunes e colaboradores (58) analisaram detalhadamente as mudanças na atividade biológica e composição química, bem como aspectos relacionados à soroneutralização *in vitro* do veneno de *B. jararaca*. Neste trabalho foram observadas diferenças claras entre as atividades hemorrágica, hemostática, proteolítica, letal e inflamatória, em filhotes e serpentes adultas, dados que reforçam a ideia de que o veneno passa por importantes mudanças na sua composição durante o desenvolvimento ontogenético de *B. jararaca.* Ao final, os autores enfatizam a necessidade de uma reavaliação na abordagem clínica atualmente utilizada na administração de soro antibotrópico a pacientes envenenados por serpentes *B. jararaca* filhotes. Dados preliminares de estudos recentes em pacientes acidentados por *Bothrops ssp* mostraram que além do número de pacientes com incoagulabilidade sanguínea ser mais alta em envenenamento por filhotes (61.9 %) do que em serpentes adultas (27.7%), os pacientes acidentados pelas serpentes jovens tiveram um quadro de coagulopatia mais grave do que os acidentados por serpentes adultas, mostrando nível de fibrinogênio e factor X mais baixos, e nível de produto de degradação de fibrinogênio/ fibrina, D-dimero e complexo trombina-antitrombina mais elevados na admissão. A contagem de plaquetas foi menor nos pacientes acidentados por serpentes adultas do que por jovens, (114 ±13,8 109/L, 200 ±16,9×109/L, respectivamente) (71). Estes resultados mostraram que os distúrbios hemostáticos observados no envenenamento por serpentes *B. jararaca* filhotes parecem ser mais graves do que os causados por serpentes adultas, uma vez que neste ocorreria geração de uma quantidade maior de trombina intravascular, induzindo a um maior consumo de fibrinogênio e fator X (56). Adicionalmente, o consumo de plaquetas parece não estar relacionada apenas com a geração de trombina (71).

Um estudo aprofundado *in vivo*, em condições controladas, que compare experimentalmente as diferenças nos distúrbios hemostáticos causados por estes venenos e preencha as lacunas nesse conhecimento nunca foi efetivamente realizado. Além disso, levando-se em conta que o veneno de filhotes de *B. jararaca* não é incorporado ao *pool* de venenos utilizados para produzir anticorpos neutralizantes em cavalos, torna-se necessário testar a eficiência do soro comercial antibotrópico (SAB) em normalizar os distúrbios hemostáticos causados pelo envenenamento experimental por veneno bruto de *B. jararaca* filhotes e adultas, e verificar possíveis diferenças no processo de neutralização, de tal modo que esses dados sirvam de indicativo e guia para a administração de quantidades realmente efetivas de soro no tratamento clínico desses dois tipos de acidentes.

2.2. OBJETIVOS

i Comparar as principais alterações hemostáticas sistêmicas induzidas pelos venenos de serpentes *B. jararaca* filhotes e adultas, utilizando o rato como modelo experimental *in vivo*.

ii Avaliar a eficácia da neutralização pelo soro antibotrópico, 1 hora após o envenenamento induzido pelos venenos de serpentes *B. jararaca* filhotes e adultas.

3. Material e Métodos

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Durante todo o procedimento, os animais foram mantidos com suprimento irrestrito de comida e água. Todos os procedimentos envolvendo uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, protocolo n° 660/09).

3.2. VENENOS

As amostras de veneno utilizadas nesse trabalho foram fornecidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Foram formados dois *pools* de venenos extraídos de espécimes de *B. jararaca*, um referente a serpentes adultas e o outro referente a filhotes (recém-nascidas e juvenis). Os venenos extraídos foram liofilizados e armazenados a -20°C até o momento de uso. Os espécimes adultos de *B. jararaca*, fêmeas e machos, diferenciam-se dos filhotes pelo comprimento rostro-cloacal, sendo considerados adultos os indivíduos com comprimento maior que 40 cm (72-74).

3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A dose dos venenos a ser administrada *s.c.* nos animais foi definida previamente em experimento piloto, que incluiu as seguintes concentrações dos venenos: 0,8mg/Kg, 1,6mg/Kg e 3,2mg/Kg. A dose preconizada para este trabalho foi a de 1,6mg/Kg, tanto em relação ao veneno de serpentes filhotes quanto de adultas, por ser a que melhor reproduz os distúrbios hemostáticos decorrentes do envenenamento humano para este modelo animal.

3.3.1. Grupos experimentais

Para a avaliação da atividade *in vivo* dos venenos sobre a hemostasia de ratos foram utilizados três grupos: um grupo tratado com o *pool* de veneno de serpentes adultas (vBjA + SAL), um com o *pool* de veneno de serpentes filhotes (vBjF + SAL) e

outro apenas com solução salina (154 mM) (SAL + SAL), denominado grupo controle (Fig. 6).

O veneno foi diluído imediatamente antes do uso e os ratos foram inoculados *s.c.* no dorso com 1,6 mg/kg (3,2 mg/mL) de cada um dos *pools* de venenos ou com solução salina. Após 1 hora da inoculação do veneno, os animais receberam 100 µL de solução salina estéril (154 mM) *i.v.*

Para a avaliação da neutralização dos venenos sobre a hemostasia de ratos, foram delineados outros dois grupos (vBjA + SAB; vBjF + SAB), nas mesmas condições descritas no item anterior, exceto que aos animais foi administrado 100 µL de soro antibotrópico (SAB) *i.v.*, uma hora após a inoculação dos venenos (Fig. 6).

As amostras de sangue foram coletadas de cada grupo experimental em 3, 6 e 24 horas após a inoculação dos venenos. Foram também coletadas amostras de sangue no tempo de 1 hora, dos grupos experimentais vBjA (veneno de *B. jararaca* adultas) e vBjF (veneno de *B. jararaca* filhotes) (Fig. 7) a fim de verificar como estavam os parâmetros hemostáticos dos animais no momento do tratamento com SAB ou solução salina.

Para cada intervalo de tempo de cada grupo experimental foram utilizados no mínimo dez animais, exceto nas análises por tromboelastometria, onde foram utilizados seis animais por grupo.

Adicionalmente, foi utilizado um grupo SAL + SAB (n=6) como controle da soroterapia, cujos animais foram inoculados com 100 µL de salina estéril *s.c.* e após 1 hora receberam 100 µL de SAB *i.v.* Após análise das amostras de sangue dos animais deste grupo por tromboelastometria, e realização de hemograma com contagem plaquetária e dosagem de fibrinogênio plasmático, não foi observada diferença estatística significante entre este grupo e o grupo controle SAL + SAL.

A quantidade de soro administrada nos animais está de acordo com a bula do soro antibotrópico, produzido pelo Instituto Butantan, o qual é apresentado em ampolas contendo 10 mL de solução injetável da fração F(ab´)2 de imunoglobulinas específicas e purificadas, obtidas de plasma de eqüinos hiperimunizados com um *pool* de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (12,5% *B. neuwied,* 12,5 % *B. alternatus,* 12,5% *B.*

jararacussu, 12,5 % *B. moojeni*, 50% *B. jararaca*). A fração F(ab´)2 de imunoglobulinas neutraliza no mínimo 50 mg de veneno de *B. jararaca.*

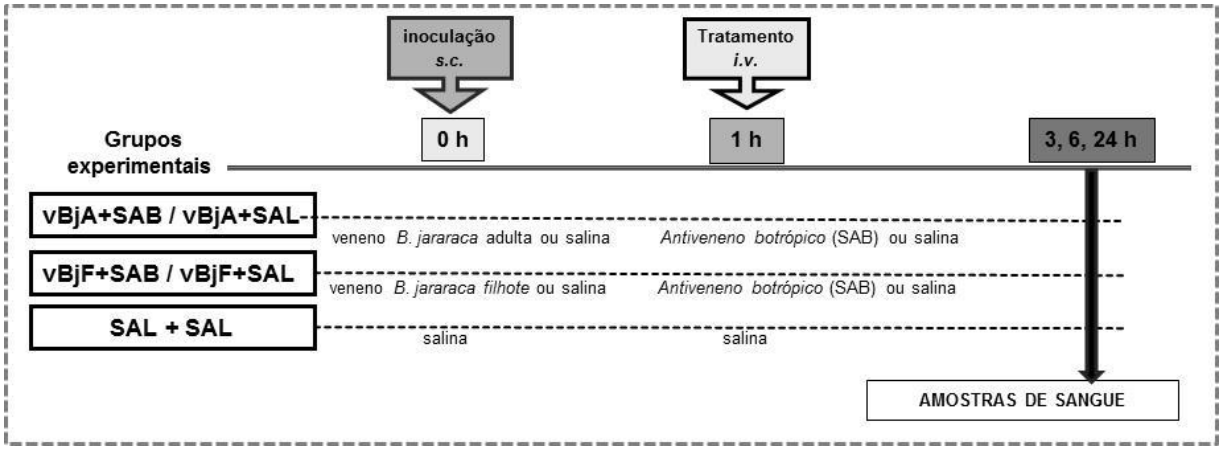

Figura 6 – Grupos experimentais: vBjA + SAL, vBjA + SAB, vBjF + SAL, vBjF + SAB e SAL + SAL. Coleta de amostras realizada em 3, 6, 24 horas após a inoculação dos venenos.

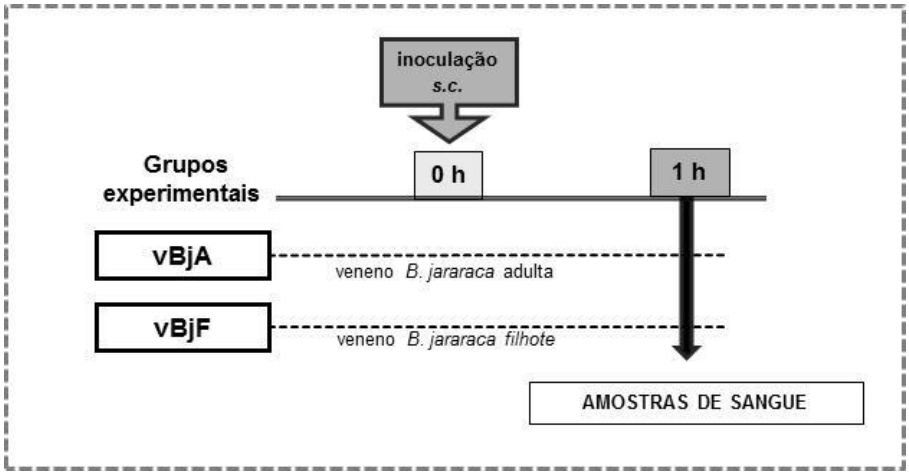

Figura 7- Grupos experimentais: vBjA e vBjF. Coleta de amostras realizada em 1 hora após a inoculação dos venenos.

3.4. COLETA DE AMOSTRAS

Os animais foram anestesiados por via respiratória, com solução de isoflurano (*isuflurane*®, Cristália). Neste procedimento foi utilizando um aparelho de anestesia

respiratória da marca Takaoka, (modelo KT-20) conectado a uma câmara anestésica devidamente adaptada para esta finalidade, para que o processo de indução da anestesia não provocasse *stress* aos animais. Durante todo procedimento de coleta foi utilizada uma máscara inalatória, adaptada ao tamanho do animal.

Para coleta de sangue para análise por tromboelastometria, os animais foram anestesiados com uma solução combinada de uma parte de cloridrato de xilazina a 2% (Calmium) para quatro partes de cloridrato de cetamina a 10% (Holiday), na dose de 1mL por quilograma *i.p.*

O sangue foi coletado por punção da artéria aorta abdominal em seringas plásticas de 10 mL, sendo imediatamente transferido para tubos falcon, com anticoagulante adequado. O processo de eutanásia se deu pela sangria total e por overdose de anestésico (75).

O sangue de cada indivíduo foi coletado em tubos plásticos do tipo falcon com diferentes anticoagulantes, dependendo da análise a ser realizada:

- Na2-EDTA 10% (1 parte de EDTA para 99 partes de sangue): As amostras foram coletadas para hemograma completo e confecção de lâminas de esfregaços sanguíneos.
- Citrato de sódio a 3,8% (1 parte de citrato de sódio para 9 partes de sangue): As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 *g* por 15 minutos a 4ºC. O plasma obtido foi aliquotado e congelado a – 80ºC. As alíquotas foram utilizadas para dosagem de fibrinogênio, hemoglobina, fator II e X da coagulação e ensaios de ELISA. Amostras de sangue total foram utilizadas nas análises por tromboelastometria (ROTEM®).
- Heparina de baixo peso molecular (6µL para cada 1 mL de sague) (Clexane, 100mg/mL, Sanofi): Análise de função plaquetária por *Impact R Research System*®.

Para neutralizar o veneno circulante nas amostras, foram adicionados 10µL de soro antibotróbico (Inst. Butantan lote: 1010281/A) para cada mL de sangue, inclusive nas amostras inoculadas apenas com salina (controles).

3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Hemograma, Leucograma e esfregaços sanguíneos

Foi feito hemograma e leucograma completos com contagem plaquetária em amostras de sangue total dos grupos experimentais. Para isso, utilizou-se um analisador hematológico veterinário da marca Mindray®, (modelo BC-2800 VET). A partir destas amostras, foram também confeccionadas lâminas de esfregaços sanguíneos, corados com corante hematológico May-Grunwald-Giemsa (corante de Rosenfeld)(76). As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico (modelo DM500, Leica) e fotografadas em fotomicroscópio (modelo DMLB, Leica), em objetiva de imersão (aumento 100x).

3.5.2 Dosagem de fibrinogênio

O fibrinogênio plasmático foi dosado pelo método colorimétrico de Ratnoff e Menzie (77). Foram adicionados 200 µL do plasma citratado de cada amostra a tubos plásticos do tipo falcon (45 mL), juntamente com 0,5 mL de vidro moído, 10 mL de solução salina (NaCl 154mM) e 50 µL de EACA 10 % (inibidor da plasmina). Para gerar um coágulo, foi pipetado 35 µL de trombina bovina (720 U, Sigma) em cada tubo. Os tubos foram imediatamente homogeneizados após a adição da trombina e mantidos em incubação a 37°C de 5 a 10 minutos, para formação do coágulo de fibrina. Após esse período, os tubos foram centrifugados três vezes, a 2000 rpm por 5 min. Após cada centrifugação, o coágulo foi cuidadosamente espremido, o sobrenadante descartado e foram adicionados mais 10 mL de salina. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 1 mL de NAOH 10%. Os tubos foram cobertos com papel alumínio e mantidos em banho maria-fervente por 10 min. Após o resfriamento, são adicionados aos tubos 7 mL de água destilada, 3 mL de Na_2CO_3 20% e 1 mL de reagente fenólico (Folin, Sigma), seguido de homogeneização em vortex. Os tubos são mantidos a temperatura ambiente durante 30 min, para desenvolvimento da cor.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução de tirosina (5 mg/ dL em HCl 0,1 M) na diluição seriada de 1/2. A leitura de absorbância das amostras e da curva padrão foi feita a 650 nm, em um espectrofotômetro da marca Utrospec (modelo 2100). Os dados foram analisados pelo programa CurveExpert 1.4.

3.5.3 Dosagem de hemoglobina plasmática

A hemoglobina plasmática foi dosada pelo método da peroxidase, em microplacas de 96 poços utilizando TMB (3,3´, 5, 5´- tetrametilbenzidina, Sigma) como substrato. Esta metodologia foi adaptada do trabalho de Crosby e colaboradores (78, 79).

Primeiramente foi preparada uma solução de TMB 0,1% em ácido acético 21%. Esta solução foi misturada a uma solução de H_2O_2 0,3%, resultando em uma solução reativa para uso. Para preparação da curva padrão, utilizou-se um padrão de hemoglobina (Bioclin®), e foi feita uma diluição seriada na razão de 1/2, a partir de 0,2 mg/mL.

As amostras de plasma citratado e o branco (NaCl 154Mm) foram pipetadas na microplaca em triplicata (1µL de amostra por poço) e adicionou-se 200 µL da solução reativa em cada poço. Após homogeneização, a placa foi mantida a temperatura ambiente por 15 min, para desenvolvimento de cor. A leitura da absorbância foi feita a 655 nm, em um leitor de placas da marca Thermo Scientific (Modelo Multiskan EX). Os dados foram analisados pelo programa CurveExpert 1.4.

3.5.4 Agregação plaquetária em PRP

Para avaliação da função plaquetária *in vitro* foram realizados ensaios de agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP), utilizando colágeno (Chrono-log®,USA) como agonista plaquetário (10µL de colágeno 1mg/mL para 400 µL de PRP). O protocolo experimental foi adaptado de Cardinal & Flower (80). Utilizando um agregômetro de dois canais, da marca Chrono-log Corporation® (Modelo 560VS), foi empregada a metodologia óptica (espectrofotômetro). Para obtenção do PRP, o sangue citratado foi centrifugado a 190 g (25 ^{o}C) por 15 min. O sobrenadante (PRP) foi retirado e mantido a 37 ºC, enquanto o restante da amostra foi novamente centrifugada a 3000g (25°C) para obtenção do PPP (plasma pobre em plaquetas). Para verificar a concentração de plaquetas da amostra de PRP, utilizou-se um analisador hematológico veterinário da marca Mindray®, (modelo BC-2800 VET). A concentração de PRP foi ajustada para 500 x10^9/L plaquetas por amostra utilizando o PPP correspondente. Nas amostras de animais com menos de 500 x10^9/L, o teste foi desempenhado sem ajuste.

O teste de agregação de cada amostra de PRP é desempenhado juntamente com seu PPP correspondente. Assim, considera-se que antes do início do teste a amostra de PRP possui 0% de agregação, por se encontrar na condição mais opaca possível em relação ao seu PPP, que representa 100% de agregação (100% de transparência). As plaquetas agregam em resposta ao agonista aplicado (colágeno) e o aparelho registra o aumento da transmissão da luz ao longo do tempo conforme se formam os agregados plaquetários (81).

3.5.5 Análise de função plaquetária por Impact R Research System®

Para melhor compreender a fisiologia de plaquetas é essencial estudar a função plaquetária em condições fisiológicas. O dispositivo *Impact-R* (Diamed, Bélgica) possibilita a realização de testes de adesão em condições similares as de fluxo arterial, sem o uso de agentes agonistas plaquetários. O ensaio utiliza a metodologia de cone e placa desenvolvida por Varon & Savion (82). Foi feita uma padronização inicial com sangue de ratos não tratados (n=20), para definir o padrão normal, o anticoagulante adequado e também o tempo de rotação. Assim, o sangue foi coletado utilizando heparina de baixo peso molecular como anticoagulante (Clexane 100mg/mL, Sanofi), Foram aplicados 130µL de amostra à região central de uma placa de poliestireno de 16 mm de diâmetro, sobre a qual é encaixado um cone de teflon® de 14 mm de diâmetro. A placa rotaciona sob o cone a 900 RPM, durante 4 min. O sistema de rotação, juntamente com o peso do cone, gera uma força de 1800 sec-1, mimetizando a força de cisalhamento (*shear force*) e o alto stress de cisalhamento (*shear stress*) presente nos vasos sanguíneos (83, 84). Após o período de rotação, a placa é retirada do sistema e lavada cuidadosamente com H_2O destilada utilizando uma pipeta plástica. Após a lavagem, a placa é corada com corante May-Grünwald eosina-metileno (Merck) e mantida secando a temperatura ambiente. As placas coradas são visualizadas e fotografadas utilizando um microscópio de luz invertida (Olympus, Japão) acoplado ao aparelho. As análises foram feitas pelo software Diamed Impact-R versão 1.28, e os parâmetros quantitativos analisados foram: superfície de cobertura da placa (SC), número de objetos por placa (Ob), que nada mais são que os agregados plaquetários formados, e o tamanho desses agregados (AS). Todas as amostras dos grupos experimentais foram testadas em duplicata.

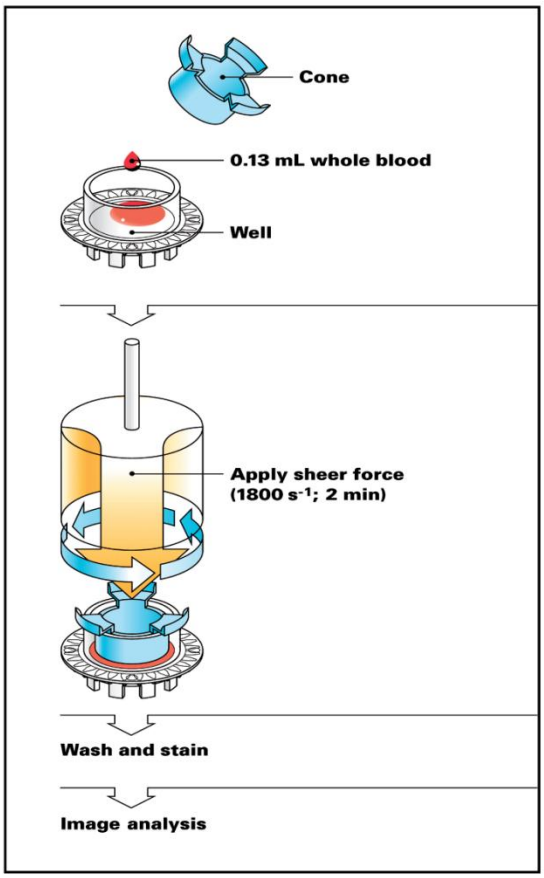

Figura 8 – Metodologia de cone e placa do dispositivo Impact-R (Ref. Varon & Savion, 2011).

3.5.6 Dosagem de fator II e fator X da coagulação

Para quantificar os níveis de fator II (protrombina) nas amostras de plasma citratado dos grupos experimentais, utilizou-se plasma humano deficiente em fator II (American Diagnostica / Sekisui Diagnostics, Japão) para diluição das amostras, e o veneno bruto da serpente *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (Latoxan®, França) que contém um potente ativador de protrombina (85, 86). Em um coagulômetro (modelo Star4, Stago, França), foram incubados, em duplicata, 75 µL do plasma a ser analisado (diluição 1/5 em plasma deficiente em II) juntamente com 75 µL de cefalina de coelho (diluída 1/1000 em tampão TBS pH 7,4), a 37°C por 1 minuto. Em seguida adicionou-se 75 µL do veneno de *O. scutellatus scutellatus*, previamente diluído em solução de $CaCl_2$ (0,025M). O cronômetro do aparelho foi imediatamente acionado e a contagem de tempo interrompida quando detectada a formação da rede de fibrina.

Em relação à quantificação do fator X utilizou-se plasma humano deficiente em fator X (American Diagnostica / Sekisui Diagnostics, Japão**)** para diluição das amostras e o ativador de fator X já purificado, presente no veneno da serpente *Daboia russellii* (RVV-X American Diagnostica / Sekisui Diagnostics, Japão).

A metodologia é similar à empregada para a dosagem de fator II. No entanto, o plasma a ser analisado (75 µL, diluído 1/5 em plasma deficiente em X) e a cefalina de coelho (75 µL, diluída 1/1000 em tampão TBS pH 7,4), são incubados conjuntamente com 75 µL do ativador RVV-X, durante 1 minuto a 37°C. Após esse período, são adicionados 75 µL de solução de $CaCl_2$ (0,025M). O cronômetro do aparelho foi imediatamente acionado e a contagem de tempo interrompida quando detectada a formação da rede de fibrina (85).

Para confecção da curva padrão, foram feitas diluições de um *pool* de plasma de rato normal (n= 10) em plasma deficiente em II e em X, na razão de 1/5, 1/20, 1/80 e 1/320, representando respectivamente as concentrações de 100%, 25%, 6,25% e 1,56% de cada fator. Os dados obtidos em segundos de cada amostra de plasma foram plotados nas curvas padrão e expressos em porcentagem de fator II e X. Estas análises foram feitas com auxílio do programa CurveExpert 1.4.

3.5.7 Dosagem de haptoglobina plasmática

A haptoglobina é uma glicoproteína plasmática que se associa à hemoglobina livre durante o processo de hemólise intravascular, impedindo possíveis danos renais decorrentes da perda de ferro pela excreção renal. A mensuração dos níveis plasmáticos de haptoglobina pode ser utilizada como um marcador de hemólise intravascular (87). A dosagem de haptoglobina plasmática foi feita por ensaio de ELISA, utilizando kit da marca Genway® (USA), no qual os reagentes estão prontos para uso e a placa já vem sensibilizada com anticorpo monoclonal anti-haptoglobina de rato. Assim, são adicionados 100 µL em cada poço das amostras de plasma citratado em duplicata, diluídas 1/10000 em solução diluente de amostra fornecida no kit. Adicionalmente, foi feita uma diluição seriada na razão de 2 do padrão de haptoglobina de rato, na concentração inicial de 125 ng/mL, sendo pipetados 100 µL de cada diluição em duplicata por poço. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 min, e depois lavada três vezes (5 min) com tampão de lavagem (PBS-Tween 20) fornecido no kit. Foram então adicionados 100 µL em cada poço do anticorpo anti-haptoglobina de rato conjugado com peroxidase (HRP - *horseradish peroxidase*), e a placa foi incubada novamente a temperatura ambiente por 15 min, protegida da luz. Após nova etapa de lavagem (3 vezes 5 min), são adicionados 100 µL por poço da solução de substrato cromogênico TMB (3,3´, 5, 5´- tetrametilbenzidina e H_2O_2 em tampão de ácido cítrico pH 3,3). A placa é incubada a temperatura ambiente e protegida da luz por precisamente 10 min. Após esse período são adicionados 100 µL por poço da solução *stop* (H_2SO_4 0,3 M) pronta para uso. A absorbância foi lida a 450 nm em um leitor de placas da marca Thermo Scientific (Modelo Multiskan EX). Os dados das amostras de plasma resultantes do ensaio foram plotados e analisados com base na curva padrão de haptoglobina, feita com auxílio do programa CurveExpert 1.4.

3.5.8 Dosagem de fator de von Willebrand (vWF)

O fator de von Willebrand (vWF) é uma proteína multimérica que faz a ligação entre o colágeno da matriz subendotelial e o receptor de membrana GP-Ib/IX/V da plaqueta (88). A dosagem do vWF nas amostras de plasma citratado dos grupos experimentais foi feita por ensaio de ELISA, utilizando um kit da marca Affinity Biologicals® (Canadá), com reagentes prontos para uso. A placa foi sensibilizada com 100 µL por poço de anticorpo policlonal de captura anti-vWF, diluído 1/100 em tampão

de sensibilização (tampão carbonato 50 mM, pH 9,6), e incubada *overnight* a 4°C. Após esse período, o conteúdo da placa foi totalmente aspirado com auxílio de uma pipeta multicanal e foram adicionados 150 µL de tampão de bloqueio (PBS-BSA 0,1%, pH 7,4) por poço. A placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e depois lavada por três vezes (5 min) com tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,1%, pH 7,4). Foram então adicionados 100 µL por poço das amostras de plasma citratado, em duplicata, diluídas 1/10 em tampão de amostra (HBS-BSA-Tween 20, pH 7,2). A curva padrão foi feita utilizando um plasma padrão para vWF (10µg/ml), sendo adicionados 100 µL por poço em duplicata, em diluição seriada na razão de 2, a partir da concentração inicial de 100 ng/mL. A placa foi incubada por 1 hora 30 min a temperatura ambiente, e depois lavada por três vezes (5 min) com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo policlonal de detecção anti-vWF conjugado com peroxidase, diluído em tampão de amostra (HBS-BSA-Tween 20, pH 7,2). A placa foi incubada por 1 hora e 30 min a temperatura ambiente e depois lavada três vezes (5 min) com tampão de lavagem. O substrato cromogênico OPD (o-fenilenodiamina, tabletes 5 mg, Sigma), foi dissolvido em 12 mL de tampão de substrato (tampão citrato-fosfato pH 5,0), juntamente com 12 µL de H2O2 30% (Merck) e foram adicionados 100 µL por poço. A placa foi incubada por 10 min a temperatura ambiente para desenvolvimento da cor e a reação foi interrompida após a adição de 50 µL por poço de solução *stop* (H_2SO_4 30%). A leitura foi feita em 490 nm de absorbância em um leitor de placas da marca Thermo Scientific (Modelo Multiskan EX). Os dados das amostras de plasma resultantes do ensaio foram plotados e analisados com base em na curva padrão de vWF, feita com auxílio do programa CurveExpert 1.4.

3.5.9 Dosagem do complexo trombina-antitrombina III (TAT)

A antitrombina III (ATIII) é um inibidor de serinoproteases que age sobre fatores de coagulação. Ela forma um complexo com a trombina (TAT), inativando-a. A quantificação do TAT pode ser usada como medida indireta da formação de trombina intravascular (89). A dosagem do TAT no plasma dos grupos experimentais foi feita por ensaio de ELISA, utilizando um kit da marca Affinity Biologicals® (Canadá), com reagentes prontos para uso. A placa foi sensibilizada com 100 µL por poço de anticorpo policlonal de captura anti-trombina, diluído 1/100 em tampão de sensibilização (tampão carbonato 50 mM, pH 9,6), e incubada overnight a 4°C. Após esse período, o conteúdo

da placa foi totalmente aspirado com auxílio de uma pipeta multicanal e foram adicionados 150 µL de tampão de bloqueio (PBS-BSA 0,1%, pH 7,4) por poço. A placa foi incubada por 1 hora 30 min a temperatura ambiente e depois lavada por três vezes (5 min) com tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,1%, pH 7,4). Foram então adicionados 100 µL por poço das amostras de plasma citratado, em duplicata, diluídas 1/100 em tampão de amostra (HBS-BSA-Tween 20, pH 7,2). A curva padrão foi feita utilizando um plasma padrão para trombina (10µg/ml), sendo adicionados 100 µL por poço em duplicata, em diluição seriada na razão de 2, a partir da concentração inicial de 1,6 µg/mL. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente, e depois lavada por três vezes (5 min) com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo policlonal de detecção anti-ATIII conjugado com peroxidase, diluído 1/100 em tampão de diluição para conjugado. A placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e depois lavada três vezes (5 min) com tampão de lavagem. O substrato cromogênico OPD (o-fenilenodiamina, tabletes 5 mg, Sigma), foi dissolvido em 12 mL de tampão de substrato (tampão citrato-fosfato pH 5,0), juntamente com 12 µL de H_2O_2 30% (Merck) e foram adicionados 100 µL por poço. A placa foi incubada por 10 min a temperatura ambiente para desenvolvimento da cor e a reação foi interrompida após a adição de 50 µL por poço de solução *stop* (H_2SO_4 30%). A leitura foi feita em 490 nm de absorbância em um leitor de placas da marca Thermo Scientific (Modelo Multiskan EX). Os dados das amostras de plasma resultantes do ensaio foram plotados e analisados com base na curva padrão para TAT, feita com auxílio do programa CurveExpert 1.4.

3.5.10 Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f)

A fibrina é o produto final da ativação da cascata de coagulação sanguínea, em resposta a uma lesão vascular. É um polímero insolúvel resultante da clivagem do fibrinogênio plasmático pela trombina (90). Durante a formação do coágulo de fibrina, a plasmina degrada polímeros de fibrina, gerando produtos de degradação solúveis, de diversos pesos moleculares, os chamados produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f). Os PDF/f podem ser encontrados em níveis basais em indivíduos saudáveis, mas têm sua quantidade plasmática aumentada em decorrência de distúrbios

hemostáticos (91). Os PDF/f foram dosados por ensaio de ELISA, com base em metodologia de Yamashita e colaboradores (92).

Alíquotas de 200 µL de cada amostra de plasma dos grupos experimentais foram incubadas com 10 µL aprotinina (10000 U/mL; Bayer-Translol) e 200 µL trombina (30 U/mL; Sigma) por 15 minutos a 37°C. Depois de formado o coágulo, as amostras foram centrifugadas a 10000*g* e o sobrenadante foi utilizado na reação imunoenzimática. Placas de ELISA MaxiSorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL por poço de IgG anti-fibrinogênio de rato (10 µg/ mL) em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas *overnight* em câmara úmida, a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes (5 min por lavagem) com tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,05%). Após essa procedimento, foi feito o bloqueio da placa com 200 µL por poço de solução bloqueadora (albumina bovina 3% em tampão carbonato pH 9,6), durante 2 h a 37°C em câmara úmida. Após o bloqueio, a placa passou por mais três lavagens (5 min cada) e foram então adicionadas 100 µL por poço de cada amostra, em duplicata, na diluição de 1/2000 em tampão de incubação (Salina - Albumina bovina 1%). Foi feita uma curva padrão a partir de fibrinogênio de rato purificado na concentração inicial de 1 µg/mL, em diluição seriada na razão de 2. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora, em câmara úmida. A placa foi então lavada com tampão de lavagem, por 5 vezes de 5 minutos. Após a lavagem foi adicionado 100 µL por poço de IgG anti-fibrinogênio de rato conjugado com biotina (1,59 mg/mL) na diluição de 1/10000 em tampão de incubação. A placa foi incubada a 37°C por 1 hora, em câmara úmida, e depois lavada por cinco vezes (5 min) com tampão de lavagem. Foram então adicionados 100 µL por poço de solução de conjugado avidina-peroxidase (A3151, Sigma), na diluição 1/10000, seguido de incubação a 37°C por 1 hora, em câmara úmida. A reação foi revelada com solução de substrato OPD (o-fenilenodiamina, 1 mg/mL, Sigma) e H_2O_2 0,03%, (Merck), diluídos em tampão citrato (pH 5,0). A reação foi interrompida após a adição de 50 µL por poço de solução *stop* (H_2SO_4 30%). A leitura foi feita em 492 nm de absorbância em um leitor de placas da marca Thermo Scientific (Modelo Multiskan). Os dados das amostras de plasma resultantes do ensaio foram plotados e analisados com base na curva padrão para PDF/f, feita com auxílio do programa CurveExpert 1.4.

3.5.11. Análise por Tromboelastometria (ROTEM®)

A primeira linha de testes de coagulação utilizados para análise de coagulopatias inclui o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), que avaliam respectivamente as vias extrínseca e intrínseca da coagulação (93-95). Estes testes são muito utilizados para acompanhamento de tratamento com anticoagulantes, como heparina e varfarina (95), mas são apenas indicativos da ocorrência de coagulopatias e do risco de sangramento. No caso de uma coagulopatia sem causa conhecida, não é possível afirmar apenas pelo TP e TTPa se a alteração na coagulação se deve a deficiência de fatores de coagulação ou presença de inibidores (93). Assim, para fins diagnósticos, os resultados destes testes são normalmente comparados com a contagem plaquetária, com o nível de fibrinogênio plasmático, e com testes específicos para deficiência de fatores de coagulação, realizados, por exemplo, pela metodologia de ELISA (93). Além disso, o resultado do TP tem que ser sempre corrigido pelo INR (96), uma vez que as quantidades de fator tissular e fosfolipídios variam de acordo com a marca do reagente utilizado (97).

Nos testes normais de coagulação, como os acima citados, o tempo é interrompido assim que o coágulo de fibrina é formado. Já na metodologia de tromboelastometria, a formação do coágulo é praticamente o início da análise. Assim sendo, esta metodologia tem se mostrado muito eficiente para a avaliação de distúrbios hemostáticos, pois analisa ao longo do tempo todo o processo de formação do coágulo, até sua lise, gerando informações sobre a deficiência de fatores e de plaquetas (98, 99).

Infelizmente, o alto custo torna a uso da tromboelastometria praticamente inviável fora dos grandes centros urbanos, justamente onde ocorre a maioria dos acidentes por serpentes peçonhentas. Assim, os testes auxiliares mais utilizados para avaliação dos distúrbios hemostáticos decorrentes do envenenamento ofídico, bem como do acompanhamento da terapia com soro, continuam sendo o TP, o TTPa (100), e o tempo de coagulação em sangue total (TC) (24, 101), descrito por Lee & White em 1913, e ainda amplamente empregado, apesar de apesentar baixa sensibilidade.

A tromboelastometria tem sido muito utilizada nos centros cirúrgicos para monitoramento da ocorrência de alterações na coagulação e risco de sangramento em transplantes hepáticos, cirurgias cardíacas, e traumas em geral (102-104) e, atualmente, tem auxiliado também na pesquisa clínica e pesquisa básica (105-108).

Na década de 1990, a metodologia começou a ser empregada para avaliação dos efeitos de venenos das serpentes *Calloselasma rhodostoma* (sudeste asiático) e *Pseudechis australis* (Austrália) na coagulação sanguínea (98, 109). Em 1996, Vasconcelos (110) realizou uma caracterização bioquímica e biológica do veneno da serpente *B. erythromelas*, na qual a tromboelastometria pela metodologia TEG (111) foi empregada em análises *in vitro* do potencial coagulante do veneno em sangue humano.

Muitos anos se passaram até que essa metodologia fosse novamente utilizado na avaliação de distúrbios hemostáticos causados por veneno de serpentes.

Assim, para avaliação do processo geral de coagulação após a inoculação dos venenos e do tratamento foram realizados experimentos de pela metodologia de tromboelastometria, utilizando o sistema e software de análise de coagulação *Rotation Trombelastogram analyser* ROTEM® (Pentapharm GmbH, Alemanha) (112, 113). Este sistema foi adaptado da metodologia de tromboelastografia por copo e pino (TEG), desenvolvida inicialmente por Hartet em 1948 (111, 114).

Para padronizar o uso desta metodologia ao sangue de ratos, foi feito um experimento piloto com ratos que não receberam qualquer tipo de tratamento (grupo sem tratamento n= 10 animais). Assim, foi possível definir o padrão normal tanto da representação gráfica, quanto dos parâmetros números de coagulação. Adicionalmente, foi testado também o sangue de ratos inoculados com solução salina (NaCl 154 mM) *s.c.* e *i.v.* (grupo SAL + SAL, n= 5) a também solução salina *s.c.* e SAB *i.v.* (grupo SAL + SAB, n= 8). Não foi observada diferença estatística entre os grupos SAL + SAL, SAL + SAB e os animais sem tratamento. Além disso, o tempo dos ensaios foi padronizado para 1 hora de captação de dados ao invés de 2 horas (programação padrão do software), uma vez que o objetivo não era analisar o processo de fibrinólise do coágulo formado, mas verificar a existências de diferenças na formação do coágulo de animais inoculados com os venenos, e também se haveria ou não recuperação pela soroterapia.

Assim, amostras de sangue dos grupos experimentais foram coletadas em 6 e 24 horas após a inoculação dos venenos ou salina.

Após a coleta, as amostras são pipetadas em cubetas plásticas descartáveis (300 μL de sangue por cubeta) e o próprio software de análise faz a indicação dos reagentes a serem pipetados, de acordo com o ensaio em questão. A homogeneização das amostras

é feita com uma pipeta eletrônica acoplada ao equipamento e com ponteiras específicas do sistema ROTEM®. Após a etapa de homogeneização, a cubeta é acoplada ao aparelho. Entre a cubeta e o pino fixo permanece um espaço de 1 mm que é ocupado pela amostra de sangue total. A amostra é mantida aquecida a 37°C, enquanto o pino se movimenta para a direita e esquerda. Enquanto o sangue permanece liquido o movimento é irrestrito. Quando o coágulo começa a se formar, este passa a restringir o movimento do pino. As informações de movimento do pino são detectadas mecanicamente, gerando um gráfico representativo de todo o processo de formação do coágulo até a lise, além de uma planilha de parâmetros numéricos.

Uma vez que o sistema conta com quatro canais de análise, foi possível realizar simultaneamente os seguintes ensaios *in vitro* com a amostra de sangue coletada de cada indivíduo:

- Ensaio para análise de sangue nativo (ensaio NATEM):

O ensaio de sangue nativo visa acessar dados de formação de coágulo em sangue total, na ausência da ativação da cascata de coagulação por recalcificação ou ativação por contato espontânea. Neste ensaio a amostra de sangue a ser analisada foi coletada sem anticoagulante, sendo imediatamente pipetada na cubeta plástica, sendo adicionados apenas 20 μL de solução salina (154 mM).

- Ensaios para análise da via extrínseca da coagulação (ensaio EXTEM), da via intrínseca da coagulação (ensaio INTEM) e para análise do fibrinogênio (ensaio FIBTEM):

Nestes ensaios foram utilizadas amostras de sangue coletadas com anticoagulante citrato de sódio 3,8%. No ensaio EXTEM, foram adicionados à amostra 20 μL de cloreto de cálcio ($CaCl_2$ 0,2 M) e 20 μL do reagente EXTEM®, que simula a ativação da cascata de coagulação via fator tissular (115). No ensaio de INTEM, foram adicionados à amostra 20 μL de cloreto de cálcio ($CaCl_2$ 0,2 M) e 20 μL do reagente INTEM®, que simula a ativação da cascata de coagulação via sistema de contato (ativação do F XII) (116). Já no ensaio para análise do fibrinogênio, a via extrínseca foi ativada adicionando-se 20 μL do reagente EXTEM® porém, foi também pipetado o reagente FIBTEM®, composto por citocalasina- D, um metabólito fúngico que age como um potente inibidor plaquetário uma vez que impede a reorganização do

citoesqueleto plaquetário após sua ativação (117). Assim, foi possível avaliar o fibrinogênio presente na amostra, estando as plaquetas inibidas no processo de formação do coágulo.

Em cada ensaio foram analisados os seguintes parâmetros:

- CT (Tempo de coagulação, em segundos): determina a velocidade da formação da fibrina, detectando o nível de anticoagulação ou deficiência de fatores da coagulação (106, 112). Pela Figura 9, este corresponde a linha verde, que corresponde ao tempo entre a adição ao tempo e a formação de um coágulo com 2 mm amplitude (Fig. 9, eixo y do gráfico). O parâmetro CT não deve ser confundido com o teste de tempo de coagulação clássico (101), uma vez que neste ponto do ensaio ainda não existe a formação de fibrina estável em quantidade suficiente para gerar um coágulo propriamente dito.
- CFT (Tempo de formação do coágulo, em segundos): Fase de formação do coágulo logo após o CT, que representa o tempo que o coágulo demora a atingir o grau máximo de viscoelasticidade, causado pela rede de fibrina estável e pela ativação das plaquetas. Este parâmetro determina a qualidade do coágulo e a sua consistência (106, 112). O CFT, representado graficamente na cor rosa, pode ser definido como o intervalo de tempo entre 2 e 20 mm de amplitude (Fig. 9). Um CFT reduzido é pode ser indicativo de um quadro de hipercoagulabilidade (tendência à trombose), enquanto um CFT prolongado indica hipocoagulabilidade (risco de sangramento). Quando a amostra apresenta firmeza do coágulo muito baixa, o CFT encontra-se bastante prolongado e normalmente com ângulo alfa menor. Nesse caso o software acaba não gerando informações numéricas acerca deste parâmetro, considerando a amostra como incoagulável.
- Ângulo alfa: Ângulo formado entre a linha de base e a tangente da curva de formação do coágulo, a partir de 2 mm de firmeza (Fig. 9). Este parâmetro determina a velocidade na qual o coágulo é formado e, assim como o CFT, é indicativo de quadros de hipocoagulabilidade ou hipercoagulabilidade (106, 112).
- MCF (Firmeza máxima do coágulo, em mm): Amplitude máxima que o coágulo formado atinge antes da fibrinólise. Este parâmetro determina a qualidade do coágulo de fibrina, representando a interação entre a rede de fibrina e as plaquetas. O parâmetro MCF que esclarece o motivo do sangramento e direciona a terapia para reposição de fibrinogênio e/ou plaquetas. Uma redução no MCF indica um

aumento do risco de sangramento pela diminuição na estabilidade do coágulo, que pode ser ocasionada pela deficiência na quantidade e/ou polimerização da fibrina e também pela diminuição do número de plaquetas (trombocitopenia) (106, 112).

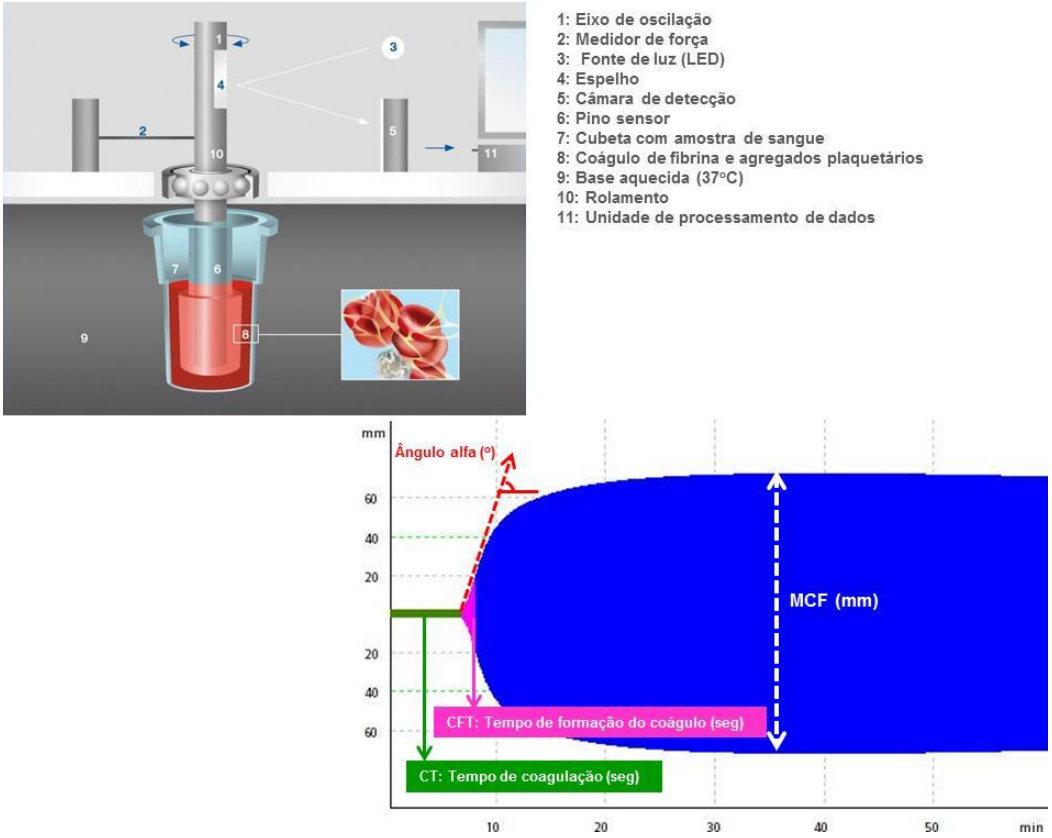

Figura 9 – Metodologia de copo e pino do sistema ROTEM®, e representação gráfica gerada pelo software de análise do processo de coagulação do sangue, com indicação dos parâmetros tempo de coagulação (CT), tempo de formação do coágulo (CFT), ângulo alfa, e firmeza máxima do coágulo (MCF) (Modificado de www.rotem.de e ROTEM® System – User Manual, 2006).

3.5.12 Análise das alterações morfológicas da fibrina por microscopia eletrônica de varredura

Para avaliar as alterações morfológicas na estrutura das fibras de fibrina após o envenenamento e se o tratamento com soro antibotrópico tem efeito positivo na manutenção da estrutura destas fibras. A metodologia de coleta das amostras de sangue é a mesma descrita no item *coleta de amostras*. Foram utilizadas alíquotas das amostras de plasma citratado já utilizadas em outras análises.

Primeiramente lamínulas de vidro foram incubadas com uma solução de 0,02% polilisina (Sigma), durante 5 min. As lamínulas foram colocadas verticalmente em um suporte, onde permaneceram secando *overnight*, a temperatura ambiente. Em uma placa de poliestireno, estas foram alocadas horizontalmente, sendo uma lamínula por poço. Foram adicionados 20 µL de cada amostra de plasma citratado e depois mais 20 µL de trombina bovina (40 U/ml, Sigma), para gerar um coágulo. Para que o coágulo se formasse uniformemente, foi feita a homogeneização da trombina com o plasma com o auxílio da pipeta, no momento de adição da trombina. A placa com os coágulos foi incubada por 30 min, a 37°C em um banho-maria com agitação horizontal (Reciprocal shaking bath, Precision Scientific, USA). Os coágulos foram então lavados com tampão tyrode (Tyrode-NaCl pH 7,3), por três vezes de 5 min, e depois incubados com 1 mL de GTA 2,5 % (glutaraldeido) por poço, por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período, estes foram novamente lavados com tampão tyrode (3 lavagens de 5 min) e foi adicionado aos poços 1 mL de solução de tetróxido de ósmio 1% (OsO_4), seguindo nova etapa de incubação, por 1 hora a temperatura ambiente. Para retirar o OsO_4, os coágulos foram lavados com água destilada (3 lavagens de 5 min). Seguiu-se uma bateria de desidratação seriada de álcool, iniciando em etanol 30% até 100% (Merck). A metodologia para preparo dos coágulos para análise ao MEV foi adaptada dos trabalhos de Pretorius e colaboradores (118, 119).

Os coágulos passaram por procedimento de secagem por ponto crítico (*Critical Point Drying Device*, modelo: EM CPD030, Laica), recobertos com ouro em pó (*Cool Sputtering Device*, modelo: EM SCD050, Laica), e depois visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV, modelo: Quanta 250, FEI).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar se existe diferença estatística entre os parâmetros analisados nos grupos controle e soroterapia foi utilizando o teste de ANOVA, de três vias, acompanhada pelo teste post hoc de Tukey. Quando necessário, também foram realizadas análises não paramétricas, utilizando o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do teste de Dunn. As análises foram realizada pelos programas estatísticos Sigmastat 3.5 e GraphPad Prisma. Foram consideradas significativas as diferenças com $p<0,05$. Nos gráficos e tabelas, a variação é apresentada na forma de erro padrão da média.

4. Resultados

4.1. TROMBOELASTOMETRIA

4.1.1. Representações gráficas: Ensaios de NATEM, EXTEM, INTEM e FIBTEM

Nas figuras 10 e 11 são apresentadas as representações gráficas dos ensaios de NATEM, EXTEM, INTEM e FIBTEM, realizados pelo sistema ROTEM® em amostras de sangue do grupo controle SAL + SAL (Fig. 10 A-D) e do grupo controle de soroterapia SAL + SAB (Fig. 11 A-D). Os gráficos de ambas as figuras são representativos de um animal de cada um dos grupos supracitados e ilustram o perfil de coagulação sanguínea considerado padrão para ratos machos da linhagem *Wistar*, que foi obtido após etapa de padronização da análise por tromboelastometria para esses animais. Não foi observada diferença estatística entre os parâmetros do grupo controle SAL + SAL e os do grupo controle de soroterapia SAL + SAB. Nas figuras 12 e 13 observamos as representações gráficas resultantes dos quatro ensaios realizados nas amostras de sangue coletadas dos grupos vBjA + SAL, vBjA + SAB, vBjF + SAL e vBjF + SAL, após 6 e 24 horas da inoculação dos venenos. Em 6 horas (Fig. 12) nota-se uma grande alteração no padrão de coagulação dos grupos tratados apenas com salina. Comparando-se os perfis gráficos de cada grupo de acordo com o ensaio realizado, podemos verificar que existem diferenças visíveis entre os perfis dos grupos tratados com salina em relação ao dos grupos tratados com SAB, em todos os parâmetros analisados. Tanto o tempo de coagulação (CT, representado em verde), quanto o tempo de formação do coágulo (CFT, representado em rosa) estão bastante prolongados em ambos os grupos. O prolongamento do CFT interfere na abertura do ângulo alfa, que fica bem menor em relação ao observado para o controle. Os coágulos formados também são de qualidade inferior ao do grupo controle, uma vez que a amplitude do parâmetro firmeza máxima do coágulo (MCF) está diminuída. Em 24 horas (Fig. 13) há uma tendência de retorno dos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL aos padrões normais, notadamente nos ensaios de NATEM e INTEM, enquanto parâmetros dos ensaios de EXTEM e FIBTEM permanecem bastante alterados. Podemos observar também que o tratamento com SAB foi efetivo em neutralizar os efeitos de ambos os venenos no processo de coagulação, uma vez que os perfis gráficos dos grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB estão mais similares ao que foi observado para o grupo controle.

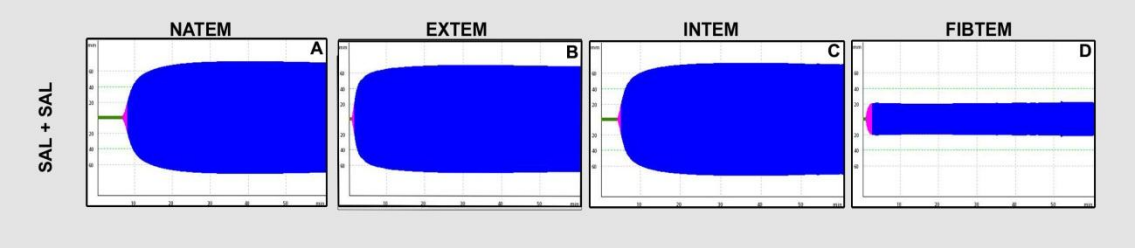

Figura 10 – Tromboelastometria de amostra de sangue de rato controle (SAL + SAL). Representação gráfica do ensaio em sangue total não citratado (300µL) com adição apenas de solução salina (20 µL) (Fig. 10 A: NATEM) e ensaios em sangue total citratado (300µL), com adição de cloreto de cálcio 0,2 M (20 µL) e reagentes específicos (20 µL) para análise das vias extrínseca (Fig 10 B: EXTEM), intrínseca (Fig 10 C: INTEM), e fibrinogênio (Fig 10 D: FIBTEM). Dados captados pelo software ROTEM® no intervalo de tempo de 1 hora.

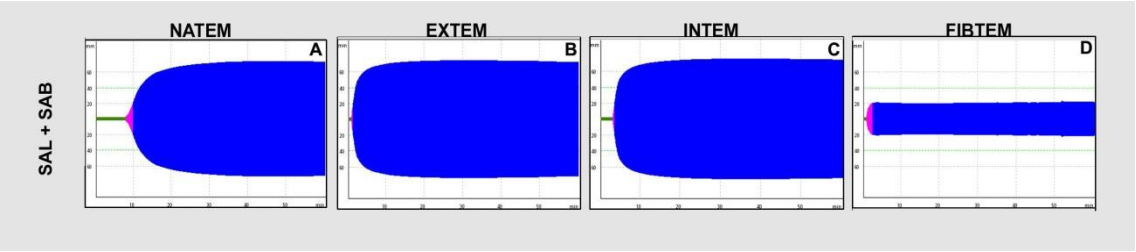

Figura 11 – Tromboelastometria de amostra de sangue de rato controle (SAL + SAB). Representação gráfica do ensaio em sangue total não citratado (300µL) com adição apenas de solução salina (20 µL) (Fig. 10 A: NATEM) e ensaios em sangue total citratado (300µL), com adição de cloreto de cálcio 0,2 M (20 µL) e reagentes específicos (20 µL) para análise das vias extrínseca (Fig 10 B: EXTEM), intrínseca (Fig 10 C: INTEM), e fibrinogênio (Fig 10 D: FIBTEM). Dados captados pelo software ROTEM® no intervalo de tempo de1h.

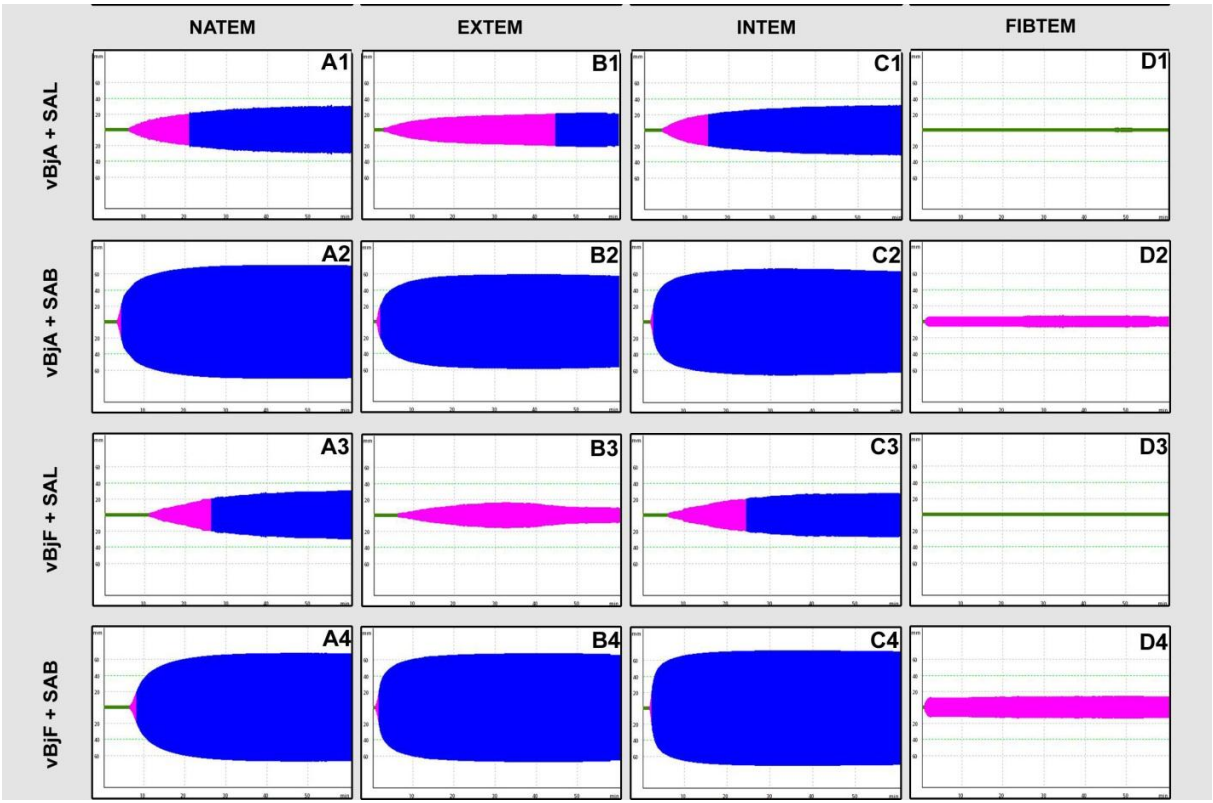

Figura 12 – Tromboelastometria de amostras de sangue de rato coletadas após 6 horas da inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg) e tratamento *i.v.* com soro antibotrópico (vBjA + SAB; vBjF + SAB) ou salina (vBjA + SAL; vBjF + SAL). Representação gráfica do ensaio em sangue total não citratado (300µL) com adição apenas de solução salina (20 µL) (Fig. 12 A1-A4: NATEM), e ensaios em sangue total citratado (300µL), com adição de cloreto de cálcio 0,2 M (20 µL) e reagentes específicos (20 µL) para análise das vias extrínseca (Fig. 12 B1-B4: EXTEM), intrínseca (Fig. 12 C1-C4: INTEM), e fibrinogênio (Fig. 12 D1-D4: FIBTEM). Os dados foram captados pelo software ROTEM® no intervalo de tempo de 1 hora. Cada conjunto de gráficos (A-D) é representativo de um animal de cada grupo experimental.

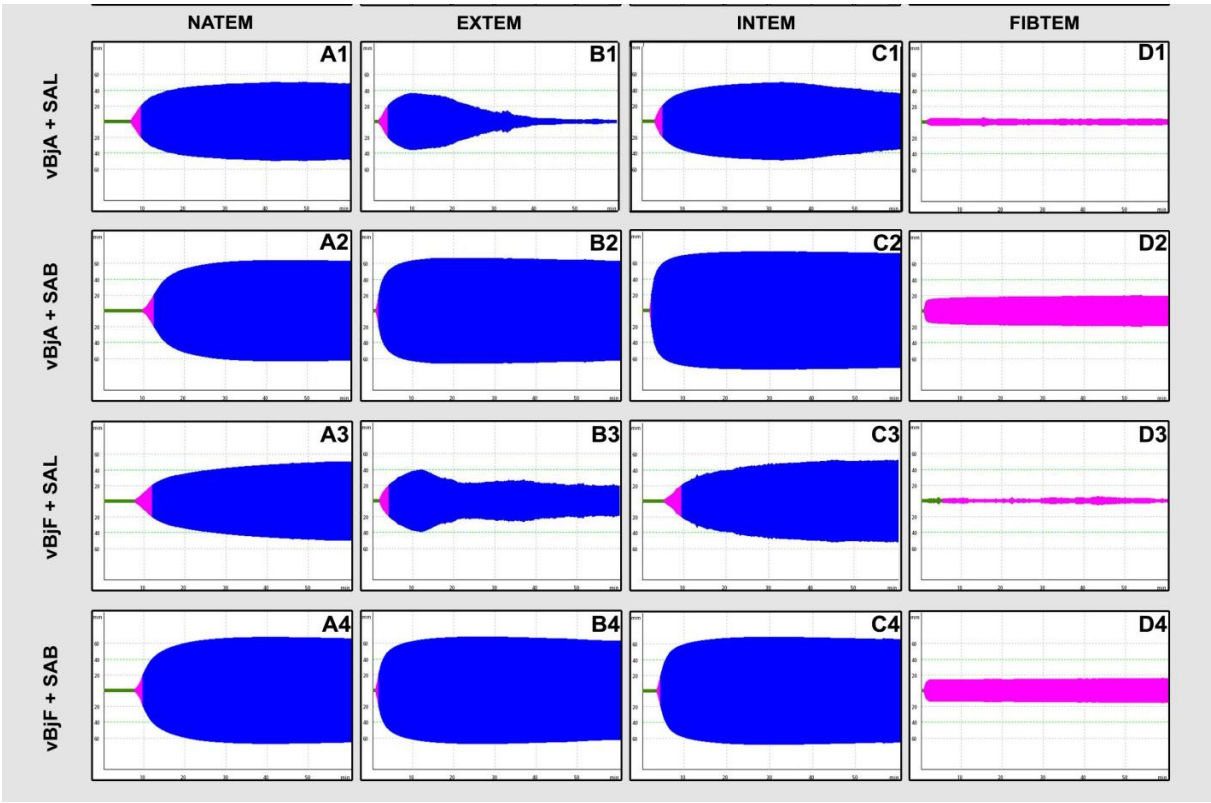

Figura 13 – Tromboelastometria de amostras de sangue de rato coletadas após 24 horas da inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg) e tratamento *i.v.* com soro antibotrópico (vBjA + SAB; vBjF + SAB) ou salina (vBjA + SAL; vBjF + SAL). Representação gráfica do ensaio em sangue total não citratado (300µL) com adição apenas de solução salina (20 µL) (Fig. 13 A1-A4: NATEM), e ensaios em sangue total citratado (300µL), com adição de cloreto de cálcio 0,2 M (20 µL) e reagentes específicos (20 µL) para análise das vias extrínseca (Fig. 13 B1-B4: EXTEM), intrínseca (Fig. 13 C1-C4: INTEM), e fibrinogênio (Fig. 13 D1-D4: FIBTEM). Os dados foram captados pelo software ROTEM® no intervalo de tempo de 1 hora. Cada conjunto de gráficos (A-D) é representativo de um animal de cada grupo experimental.

4.1.2. Parâmetros: CT, CFT, MCF e ângulo alfa

As figuras 14 a 17 referem-se aos parâmetros CT, CFT, MCF e ângulo alfa de cada ensaio, que foram analisados separadamente a fim de verificar a existência de diferenças quantitativas entre os grupos experimentais nos tempos de 6 e 24 horas após a inoculação dos venenos.

Assim, podemos observar pela figura 14 que em 6 horas, o tempo de coagulação (CT) encontra-se bastante prolongado para o grupo vBjA + SAL. Nos ensaios de NATEM e INTEM (Fig 14 A, E) os limites inferiores obtidos para o CT aproximaram-se da média e mediana dos valores do grupo controle SAL + SAL (NATEM: média 344 ± 19.0 seg, mediana 350 seg; INTEM: média 105 ± 4.5 seg, mediana 111 seg). Mesmo assim, houve uma variação de tempo grande neste grupo, e as medianas e limites superiores ficaram muito acima dos tempos observados no controle (NATEM: mediana 1008 seg, LS 1703 seg; INTEM: mediana 637 seg, LS 1170 seg), com diferença estatística significativa. No tempo de 24 horas nota-se que após o prolongamento acentuado do CT no grupo vBjA + SAL, ocorre um retorno para valores de tempo próximos aos do grupo controle (Fig. 14 B, F). No grupo vBjF + SAL, o aumento no CT se deu de forma mais lenta. Foi observado um prolongamento no tempo do CT nos ensaios de NATEM e INTEM em 6 horas (Fig. 14 A, E), não suficiente para que este grupo se diferenciasse do grupo controle, enquanto o aumento real ocorreu mesmo em 24 horas (Fig. 14 B, F), onde é notável a diferença deste grupo em relação ao controle e também a forma mais homogênea de distribuição dos valores, diferentemente da grande variação que ocorreu para vBjA + SAL em 6 horas (Fig. 14 A, C, E).

No ensaio de EXTEM (Fig. 14 C), tanto o grupo vBjA + SAL quanto vBjF + SAL apresentaram valores de média e mediana de CT mais prolongados que o grupo controle (média 46 ± 2.0 seg, mediana 46 seg) e similares entre si (média: 216 ± 76.0 seg e 225± 53.0 seg; mediana 183 seg e 209 seg, respectivamente).

Em relação aos grupos tratados com SAB, nota-se que o tratamento foi eficiente em conter as alterações no CT, já que em 6 horas as médias e medianas de tempo nos grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB ficaram muito próximas as do grupo controle, nos três tipos de ensaio (Fig. 14 A, C, E), só aumentando em 24 horas no ensaio de NATEM e notadamente no grupo vBjA + SAB (Fig 14 B), como se nesse caso o tratamento

tivesse contido apenas parcialmente a prolongação acentuada do CT, observada no grupo vBjA + SAL no tempo de 6 horas (Fig. 14 A).

Na figura 15 (A-F), observa-se que em 6 horas o tempo de formação do coágulo (CFT) do grupo vBjA + SAL encontra-se extremamente prolongado em todos os ensaios, não sendo possível a definição e análise deste parâmetro pelo software do ROTEM®, que considera a amostra como incoagulável. Isto ocorreu em parte das amostras deste grupo, não sendo possível então realizar a análise estatística. Já no grupo vBjF + SAL, também ocorre o prolongamento significativo do CFT, não tão acentuado como o observado para o grupo vBjA + SAL, e de forma similar nos três ensaios, uma vez que os valores médios obtidos foram bem próximos (NATEM: 534±132 seg; EXTEM: 535±153 seg; INTEM: 543±193 seg). Adicionalmente, nota-se que os valores obtidos nos ensaios de NATEM e INTEM concentraram-se predominantemente no terceiro quartil, com um valor de limite superior um pouco mais alto no para o ensaio de INTEM (LS: 1096 seg) (Fig. 15 A, E), enquanto no ensaio EXTEM, a distribuição dos dados se deu de maneira mais uniforme (Fig. 15 C). Em 24 horas, ocorreu uma diminuição do CFT nos três ensaios, tanto no grupo BjF + SAL, quanto vBjA + SAL, cujos valores agora puderam ser captados pelos software de análise. Mesmo assim, os dois grupos permanecem com valores de tempo mais prolongados em relação ao grupo controle, e em relação aos grupos tratados.

A figura 16 está relacionada ao parâmetro ângulo alfa. Para o grupo controle, os valores médios normais de alfa estão ao redor de 80º nos ensaios de EXTEM, INTEM e FIBTEM, e 75º no ensaio de NATEM. Valores de ângulo alfa abaixo do valor dos controles são indicativos de quadros de incoagulabilidade sanguínea. Assim sendo, no tempo de 6 horas, ambos os grupos apresentam diminuição no tamanho do ângulo alfa nos três ensaios. No ensaio de NATEM, tanto o grupo vBjA + SAL, quanto vBjF+ SAL apresentaram média de ângulos em torno de 40º (39º ± 6,0; 39º ± 3,0, respectivamente), enquanto os ensaios para via extrínseca e intrínseca os valores médios foram respectivamente 37º (±20,0) e 34º (±9,0) para o EXTEM, e 58º (±13,0) e 42º (±10,0) para o INTEM. Nestes dois ensaios nota-se uma grande variação, ilustrada pelos valores de desvio padrão da média, nos dois grupos para este horário (Fig. 16 B, C), o que impediu a verificação de possível diferença entre eles. Mesmo assim, foi observada diferença em relação ao grupo controle. Em 24 horas os ângulos aumentaram, atingindo valores próximos a 70º no ensaio de EXTEM (Fig. 16 B) e 65º no INTEM (Fig. 16 C),

mas ainda com diferença em relação ao controle e aos grupos tratados com SAB. No ensaio de NATEM o aumento no grupo vBjF + SAL foi mais sutil (média 44º ±5,0) e um pouco maior para vBjA + SAL (média: 55º±4,0) (Fig. 16 A). Com o tratamento com SAB, este parâmetro retornou a normalidade tanto em 6 horas quanto 24 horas nos dois grupos, em todos os ensaios, com exceção do grupo vBjA + SAB em 24 horas no ensaio de NATEM, cuja média de valor do ângulo permaneceu mais baixa (61º ±6,0) e próxima a do grupo tratado com salina (Fig. 16 A).

De maneira similar ao observado para o ângulo alfa, o parâmetro firmeza máxima do coágulo também se encontra bastante alterado nos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL, cujo MCF dos ensaios de NATEM, EXTEM E INTEM chegou a valores médios abaixo de 40 mm em 6 horas (Fig. 17 A-C), enquanto no grupo controle o comprimento médio ficou ao redor de 75 mm nos três ensaios. No grupo vBjA + SAL o valor médio mais baixo foi observado no ensaio de NATEM (28 ±12,0 mm), seguido pelo EXTEM (33 ±15,0 mm) e INTEM (37 ±15,0 mm) Nos três ensaios houve uma grande variação nos dados captados, resultando em um erro padrão mais elevado, o que não ocorreu para o grupo vBjF + SAL, cuja distribuição dos dados se deu de maneira mais homogênea. Este fato acabou mascarando possíveis diferenças entre os dois grupos em relação à ativação das vias extrínseca e intrínseca, uma vez que no vBjF + SAL foram observados valores médios de MCF mais baixos para o EXTEM (27 ±5.0 mm) e INTEM (35 ±4.0 mm). Já no ensaio de NATEM o valor médio para vBjF + SAL permaneceu ao redor de 40 mm (38 ±4.0 mm). Houve um aumento no MCF de 24 horas em ambos os grupos tratados com salina em todos os ensaios, mas não o suficiente para atingir valores próximos ao observado para o controle. No ensaio de NATEM, ambos os grupos chegaram a valores de MCF ao redor de 48 mm. Já nos ensaio de EXTEM e INTEM o grupo vBjF + SAL atingiu valores médios mais altos (40 ± 7,0 mm; 51 ±9,0 mm, respectivamente) que vBjA + SAL (34 ±2,5 mm; 45 ±4,0 mm), porém, não foi observada diferença estatística significante entre os grupos. Com o tratamento, o MCF chegou a valores próximos aos do controle já em 6 horas, nos três ensaios e de maneira similar para os grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB.

Na tabela 1 estão indicados os parâmetros CT, CFT, MCF e ângulo alfa do ensaio de FIBTEM. Neste ensaio são acessadas informações sobre a participação do fibrinogênio presente nas amostras na formação do coágulo de fibrina sem a influência das plaquetas, uma vez que estas encontram-se fortemente inibidas pela ação da

citocalasina D (117). Assim, pode-se notar que em 6 horas, tanto o CT quanto o CFT e ângulo alfa dos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL ficaram tão alterados que não foi possível a definição e análise destes parâmetros pelo software, sendo as amostras consideradas como incoaguláveis. Além disso, o MCF, principal parâmetro para avaliação do fibrinogênio pelo ensaio de FIBTEM(112), ficou também bastante alterado no grupo vBjF+ SAL em relação ao controle (média: 19 ±0,7 mm), enquanto no grupo vBjA + SAL as amostras ficaram incoaguláveis. Em relação aos grupos tratados com SAB, podemos observar que houve uma diminuição do CT para valores próximos aos observados para o grupo controle, e também um aumento do ângulo alfa, notadamente no grupo vBjF + SAB. O MCF de ambos os grupos apresentou uma amplitude mais próxima da observada para o controle, mas ainda abaixo do valor considerado normal. De forma semelhante ao que ocorreu para os grupos tratados com salina, observa-se que o CFT dos grupos tratados com SAB permaneceu prologado até o final do ensaio, indicando que, apesar do tratamento com SAB, o coágulo formado ainda apresentava deficiências de consistência e qualidade. Em 24 horas, não foi observada mudança em relação ao tempo de 6 horas para este parâmetro. Já o CT, ângulo alfa e MCF dos grupos tratados com SAB se normalizaram, enquanto os valores dos grupos tratados com salina permaneceram alterados.

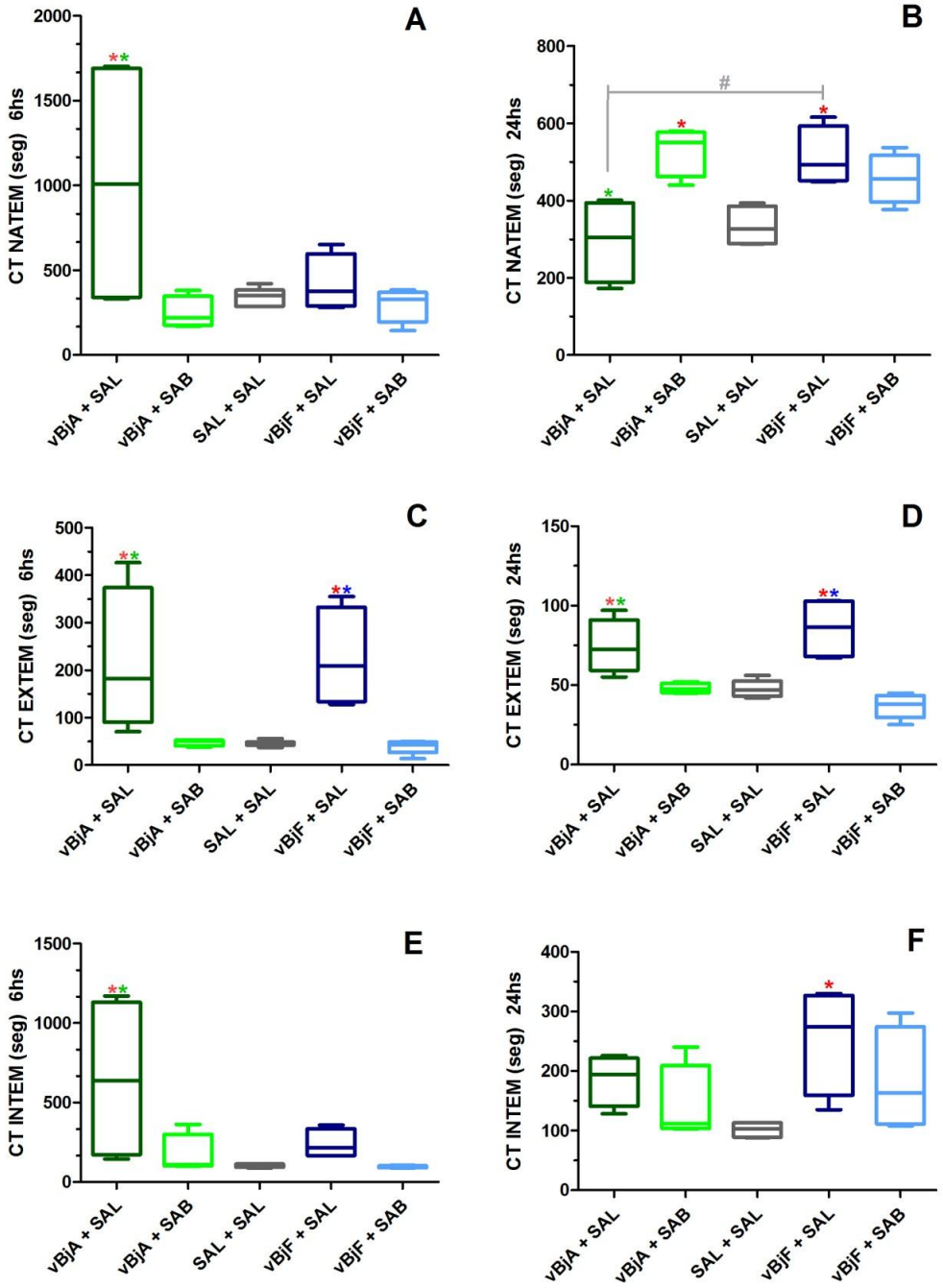

Figura 14 (A-F) – Parâmetro tempo de coagulação (CT) da análise por tromboelastometria de amostras de sangue de ratos em 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v*. Dados captados ao longo de 1 hora. Diferença estatística significante, para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * e vBjF + SAL e vBjF + SAB; # e vBjA+SAL em relação a vBjF + SAL.

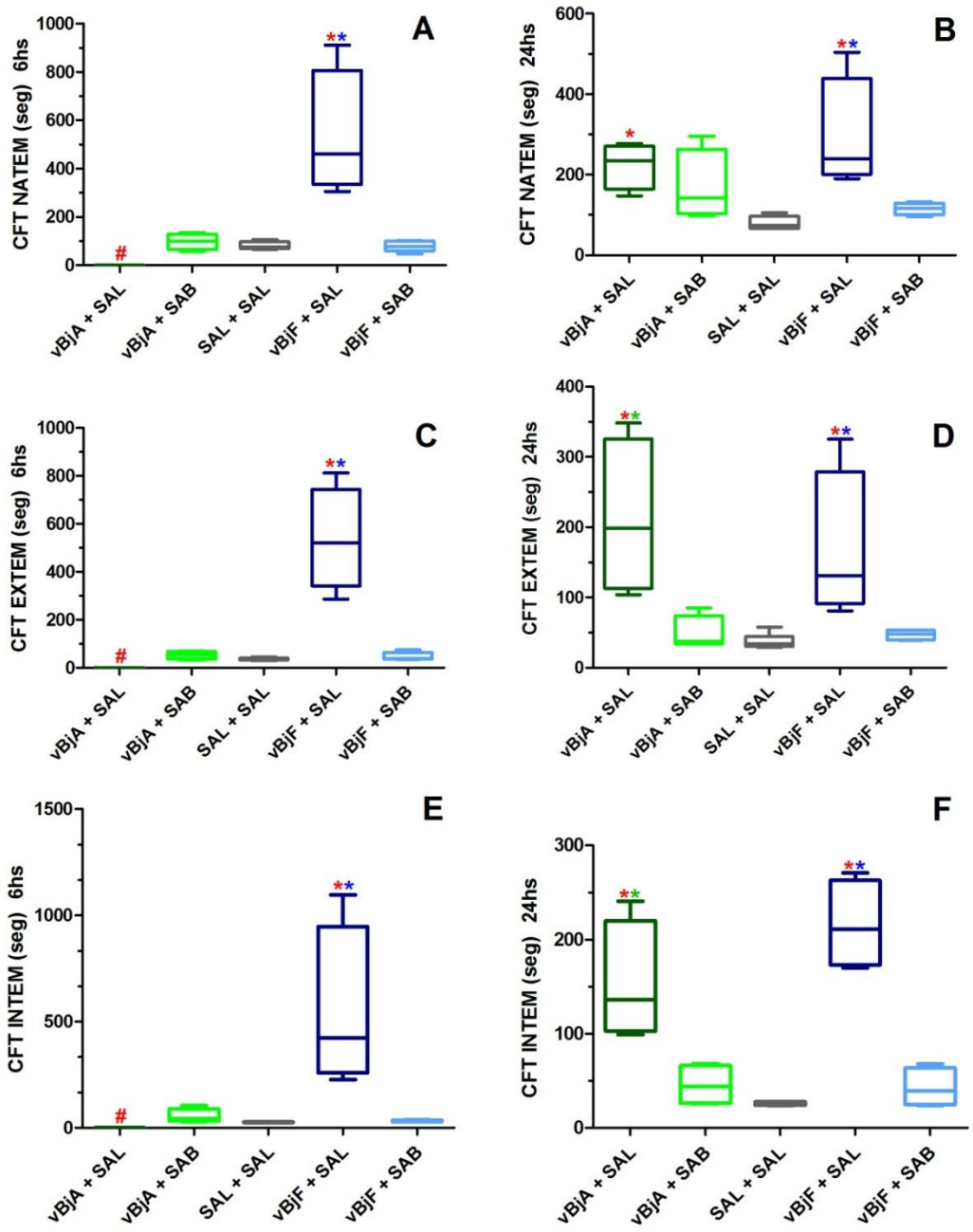

Figura 15 (A-F) – Parâmetro tempo de formação do coágulo (CFT) da análise por tromboelastometria de amostras de sangue de ratos em 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Dados captados ao longo de 1 hora. Diferença estatística significante, para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL)**;** *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * e vBjF + SAL e vBjF + SAB. # CFT demasiadamente prolongado no grupo vBjA + SAL, sendo parte das amostras consideradas como incoaguláveis pelo software de análise.

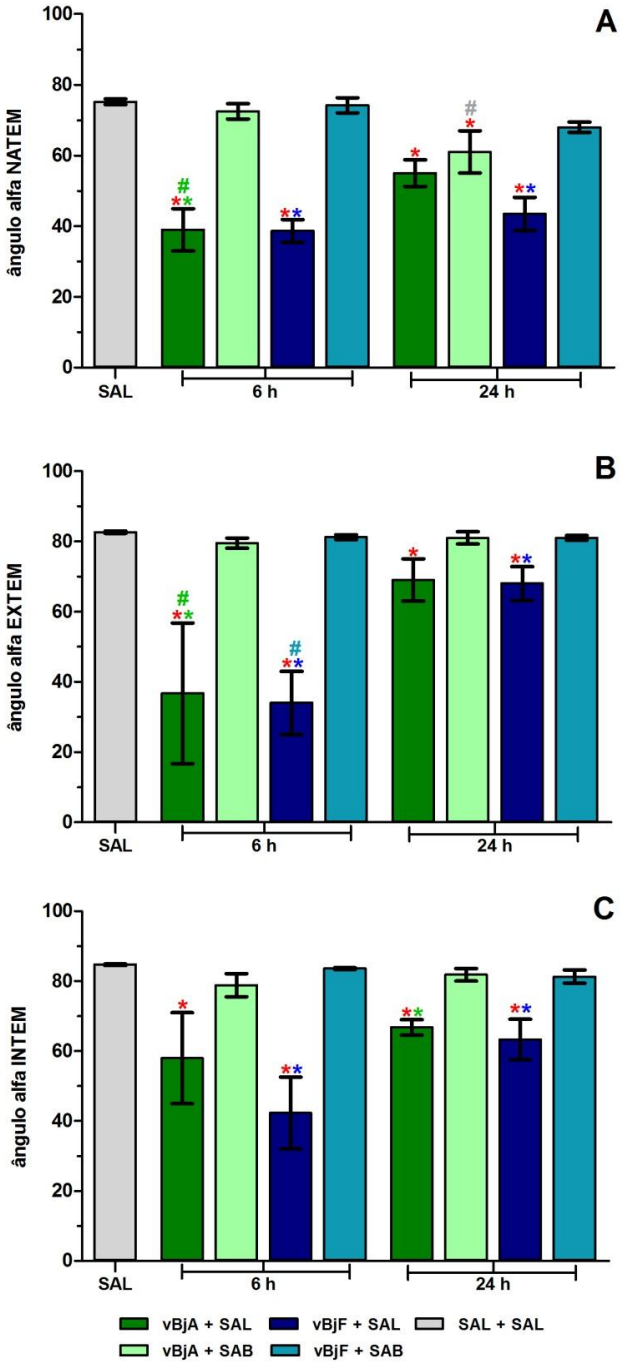

Figura 16 (A-C) – Parâmetro ângulo alfa (°) da análise por tromboelastometria de amostras de sangue de ratos em 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Dados captados ao longo de 1hora. Diferença estatística significante, para $p<0,05$, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * e vBjF + SAL e vBjF + SAB; # vBjF + SAL e # vBjA+SAL em 6 h em relação a 24 h; # vBjA+SAB em 24 h em relação a 6 h .

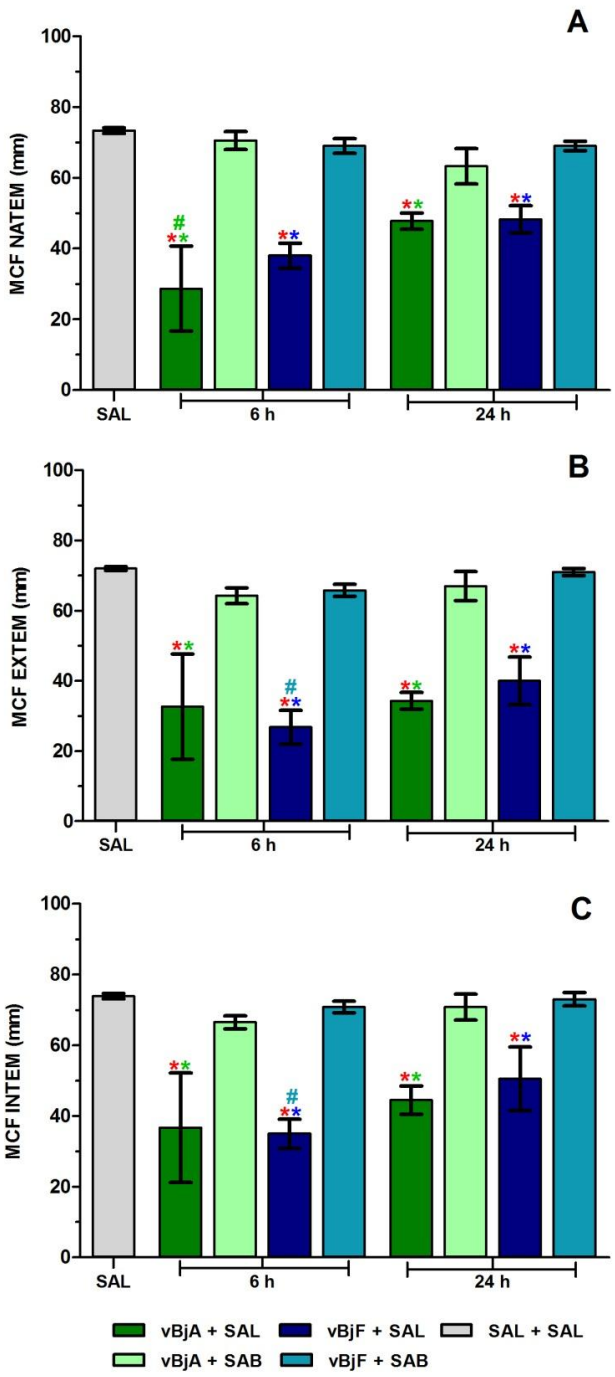

Figura 17(A-C) – Parâmetro Firmeza máxima do Coágulo. Análise por tromboelastometria de amostras de sangue de ratos em 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v*. Dados captados ao longo de 1hora. Diferença estatística significante, para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * e vBjF + SAL e vBjF + SAB; # vBjF + SAL e # vBjA+SAL em 6 h em relação a 24 h.

Tabela 1 – Parâmetros de coagulação do ensaio FIBTEM da análise por tromboelastometria de amostras de sangue de ratos em 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.*

Ensaio FIBTEM		**6 Horas**				**24 Horas**			
	SAL + SAL	**vBjA + SAL**	**vBjA + SAB**	**vBjF + SAL**	**vBjF + SAB**	**vBjA + SAL**	**vBjA + SAB**	**vBjF + SAL**	**vBjF + SAB**
Tempo de coagulação (CT) (seg)	42 ± 1.1	#	45 ± 3.9	#	41 ± 2.8	314 ± 150	42 ± 1.3	441 ± 250	42 ± 2.5
Tempo de formação do coágulo (CFT) (seg)	298 ± 150.0	#	#	#	#	#	#	#	#
Ângulo alfa	82 ± 0.7	#	*69 ± 5.0	#	76 ± 2.0	#	80 ± 2.5	#	81 ± 0.6
Firmeza máxima do coágulo (MCF) (mm)	19 ± 0.7	#	*12 ± 3.0	**6 ± 1.1	*12 ± 1.0	**3 ± 0.6	19 ± 2.9	**4 ±0.1	17 ± 1.5

Dados captados ao longo de 1hora. Diferença estatística significante para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL)**;** *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * e vBjF + SAL e vBjF + SAB. # O parâmetro analisado encontra-se demasiadamente alterado, sendo as amostras consideradas como incoaguláveis pelo software de análise. Dados representados na forma de média e erro padrão da média.

4.2. HEMOGRAMA E LEUCOGRAMA

Pelo hemograma podemos observar que em 1 hora na (Fig. 18 A) há um ligeiro aumento na quantidade de eritrócitos no grupo de animais inoculados com veneno de *B. jararaca* adultas (vBjA), sendo que esse grupo diferenciou-se significativamente do grupo controle (SAL + SAL), mas não dos demais grupos experimentais. Esse processo de hemoconcentração pode ser visualizado de forma similar ao analisar a figura (Fig. 18 B) referente ao hematócrito, onde se observa um aumento significativo de cerca de 6% no grupo vBjA em relação ao controle, e 4,5% em relação ao grupo vBjF. Em 3 e 6 horas não houve alteração considerável na quantidade de hemácias. Porém, em 24 horas pode-se notar uma diminuição destas células em ambos os grupos inoculados com os venenos e que receberam apenas solução salina, sendo que pelo hematócrito observou-se diferença destes grupos não só em relação ao controle, mas também em relação aos grupos tratados com SAB.

Com relação à quantidade de leucócitos (Fig. 19), em 1 hora foi observada leucopenia significativa nos grupos vBjA e vBjF em relação ao controle, que foi revertida em 3 horas em todos os grupos inoculados com os venenos, independentemente do tratamento. Em 6 horas ocorre um processo de leucocitose significativa nos grupos tratados com salina, sem diferença entre os venenos. No grupo vBjA + SAL foi observada diferença significativa no tempo de 6 horas em relação a 3 horas ($p=0,004$), enquanto no grupo vBjF + SAL, foi observada diferença tanto em relação ao tempo de 3 quanto de 6 horas ($p<0,001$). Nos grupos tratados com SAB, pode ser observado também aumento em relação ao controle, porém sem diferença estatística significante.

Adicionalmente, é possível notar uma mudança no padrão de distribuição dos tipos de leucócitos ao longo do tempo (Fig. 20). Em ratos normais, como os do grupo controle (SAL + SAL), a proporção de granulócitos, linfócitos e monócitos é de aproximadamente 28,5%, 69% e 2,5%, respectivamente. Esta proporção é mantida nos grupos vBjA e vBjF em 1 hora. No entanto, no tempo de 3 horas nota-se uma mudança neste padrão de distribuição por conta do aumento do número de neutrófilos circulantes (neutrofilia), em todos os grupos inoculados com os venenos. Assim, o número de linfócitos decai para cerca de 45%, enquanto o de granulócitos aumenta para aproximadamente 51%, sendo observado um maior aumento no grupo vBjA + SAL

(58%), significativo em relação ao grupo controle. Essa mudança na distribuição dos tipos celulares se mantém no tempo de 6 horas, retornando para o padrão normal em 24 horas.

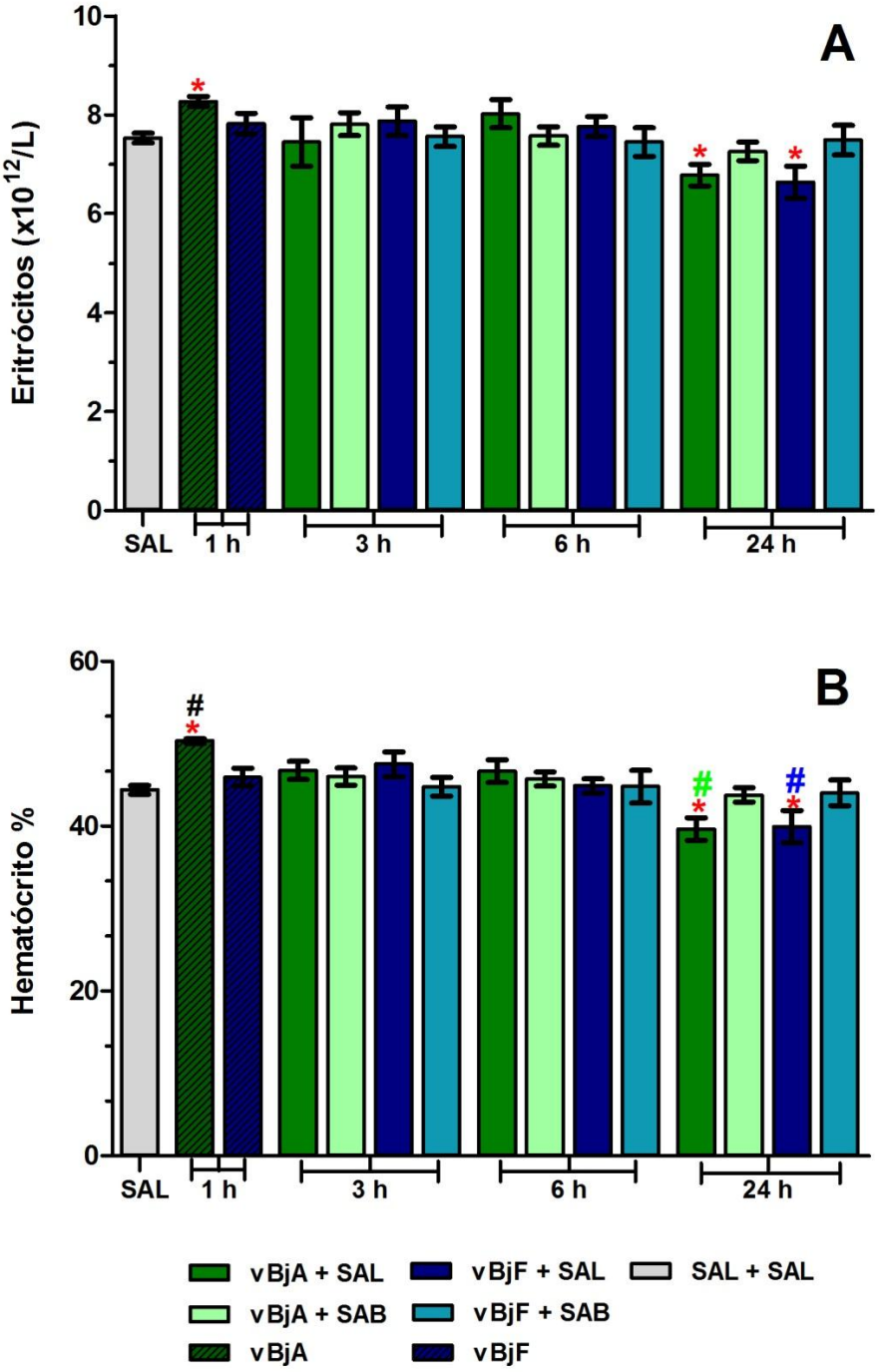

Figura 18 (A-B) - Contagem de eritrócitos (A) e hematócrito (B) do sangue de ratos em 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v*. Diferença estatística significativa para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); # vBjA + SAL em 24 h em relação a 3 e 6 h; # e vBjF + SAL em 24 h em relação a 3 h e 6 h ; # vBjA em relação a vBjF.

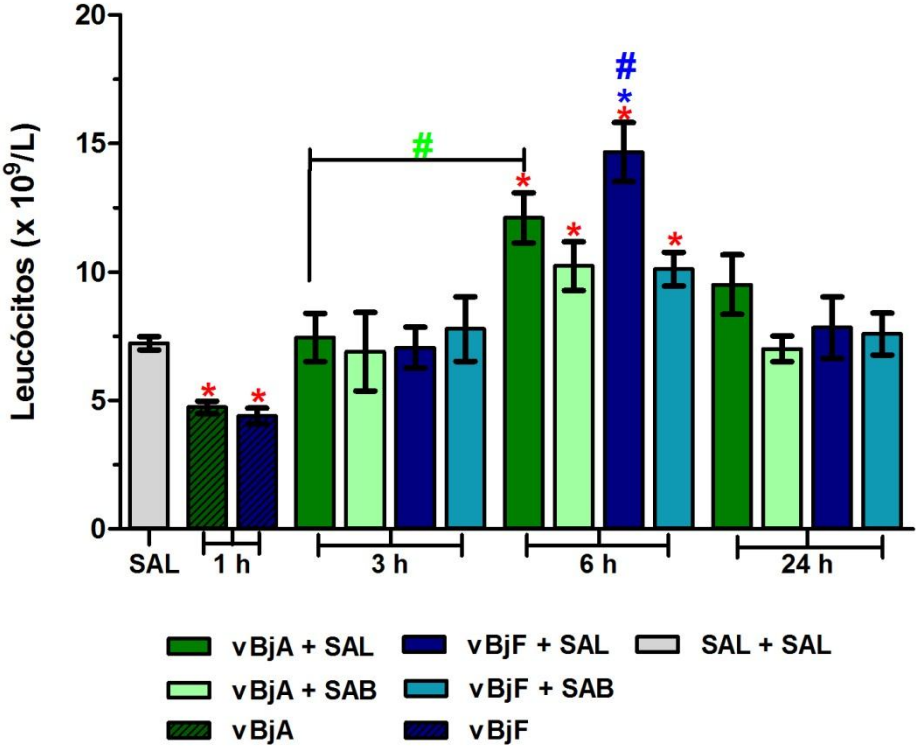

Figura 19 – Contagem de leucócitos do sangue de ratos em 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); *entre os grupos vBjF + SAL e vBjF + SAB; # vBjA + SAL em 6 h e relação a 3 h (p=0,004); # vBjF + SAL em 6 h em relação a 3 e 24 h (p<0,001).

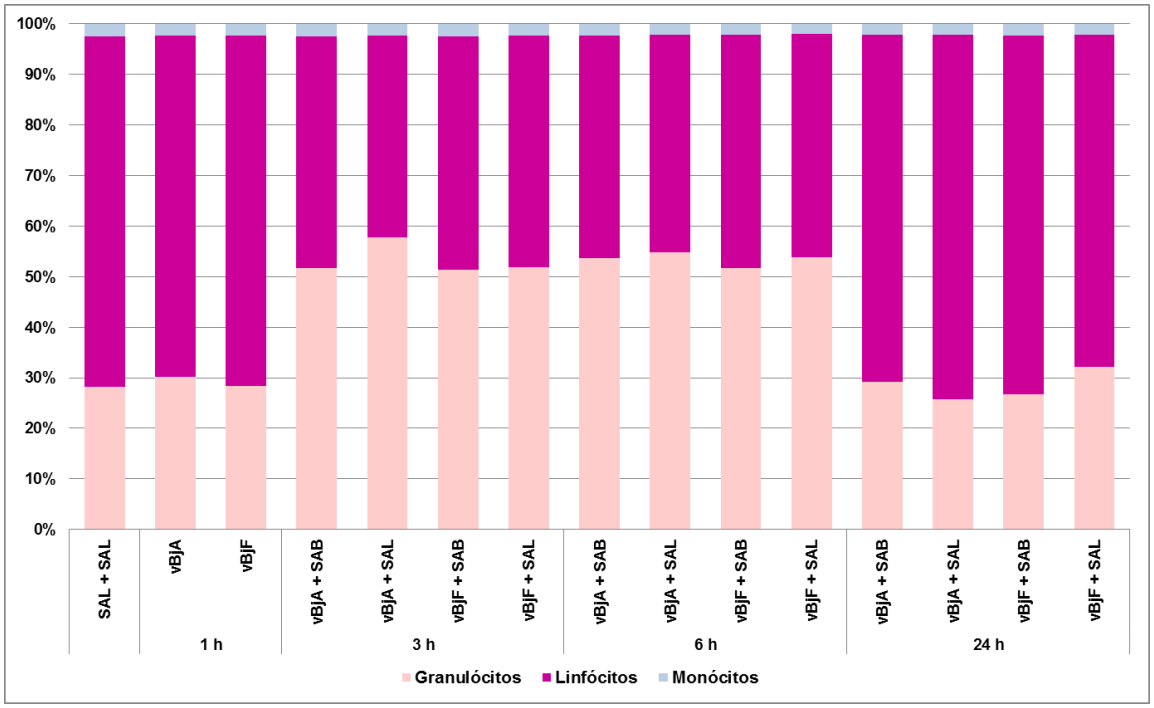

Figura 20 – Percentual de neutrófilos, linfócitos e monócitos de ratos em 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.*

4.3. PLAQUETAS

4.3.1. Contagem de plaquetas e morfologia plaquetária

Pelo hemograma foram acessados dados referentes à contagem plaquetária (Fig. 21 A) e ao plaquetócrito (Fig. 21 B), além dos índices de volume plaquetário médio (VPM) (Fig. 22 A) e amplitude de distribuição plaquetária (ADP) (Fig. 22 B) obtidos pela curva de distribuição plaquetária (120).

Em 1 hora (Fig. 21 A) a contagem plaquetária dos grupos inoculados com veneno de serpentes *B. jararaca* adultas e filhotes diminuiu para aproximadamente a metade em relação ao do grupo controle SAL + SAL (921 ±18,0 x 10^9/L), de forma similar para ambos os venenos (vBjA 443±48,0 x 10^9/L; vBjF 466 ±18,0 x 10^9/L). Em 3 horas houve uma queda abrupta na contagem dos grupos tratados apenas com solução salina, sendo esta mais acentuada no grupo inoculado com veneno de *B. jararaca* adultas (vBjA + SAL 181±34,0 x 10^9/L; vBjF + SAL 333 ±48,0 x 10^9/L). Foi observada diferença estatística significativa entre os dois venenos. Já em 3 horas, a trombocitopenia foi revertida de forma efetiva pelo tratamento com soro, e a contagem plaquetária para ambos os grupos tratados com SAB ficou muito próxima a do grupo controle (vBjA + SAB 906±36,0 x 10^9/L; vBjF + SAB 833 ±40,0 x 10^9/L). Em 6 horas a contagem plaquetária dos grupos tratados com salina permaneceu similar àquela observada no tempo de 3 horas. Já em 24 horas, foi possível notar uma tendência à recuperação espontânea do quadro de trombocitopenia, com os grupos vBjA+ SAL e vBjF + SAL atingindo valores próximos aos de 1 hora de envenenamento (470±31,0 x 10^9/L e 552 ±29,0 x 10^9/L, respectivamente), sem diferença estatística significante entre ambos.

Paralelamente, nos grupos tratados com SAB, a tendência se inverteu, e os grupos apresentaram uma queda na contagem já em 6 horas (vBjA + SAB 815±22,0 x 10^9/L; vBjF + SAB 706±30,0 x 10^9/L), notadamente no grupo inoculado com veneno de filhotes, que apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p<0,001$). Em 24 horas a contagem dos grupos tratados com SAB se aproximou a dos tratados apenas com salina, sendo menor no grupo inoculado com veneno de jararacas adultas (vBjA + SAB 487 ±43,0; vBjF + SAB 639±31,0 x 10^9/L), com diferença significante entre ambos ($p=0,010$).

Assim como o hematócrito (Fig. 18 B), o plaquetócrito (Fig. 21 B) corresponde ao percentual de plaquetas em relação ao volume total de sangue (121). A análise do plaquetócrito confirmou as semelhanças e diferenças entre os grupos experimentais observadas na contagem de plaquetas (Fig. 21 A), com exceção do grupo vBjA + SAB em 24 horas, cujo percentual de plaquetas foi mais elevado, não ocorrendo diferença estatística entre este e o grupo vBjF + SAB neste tempo. Foi observado também uma variação maior no grupo vBjF + SAB em 3 e 6 horas, resultando em um desvio padrão mais alto e, consequentemente, ausência de diferença significativa do tempo de 3 horas em relação a 6 e 24 horas, e do tempo de 6 horas em relação ao grupo controle.

A ativação gera alterações morfológicas nas plaquetas, incluindo mudanças no formato esférico, formação de pseudópodes e consequentemente aumento de tamanho. O VPM e a ADP são marcadores de reatividade plaquetária, e um aumento no valor desses índices, principalmente na ADP, está associado à ativação das plaquetas (122, 123). Assim, em 1 hora foi observado aumento significativo no VPM dos grupos vBjA e vBjF em relação ao controle, mas não na ADP (Fig. 22 A-B). Já em 3 horas, nota-se um aumento considerável no VPM e ADP de ambos os grupos inoculados com os venenos e tratados apenas com salina, em relação tanto ao grupo controle quanto aos grupos tratados com SAB, sendo este mais evidente no grupo vBjA + SAL. Em 6 horas, os valores deste grupo permanecem mais altos, enquanto no grupo vBjF + SAL já ocorre um retorno para valores próximos aos basais.

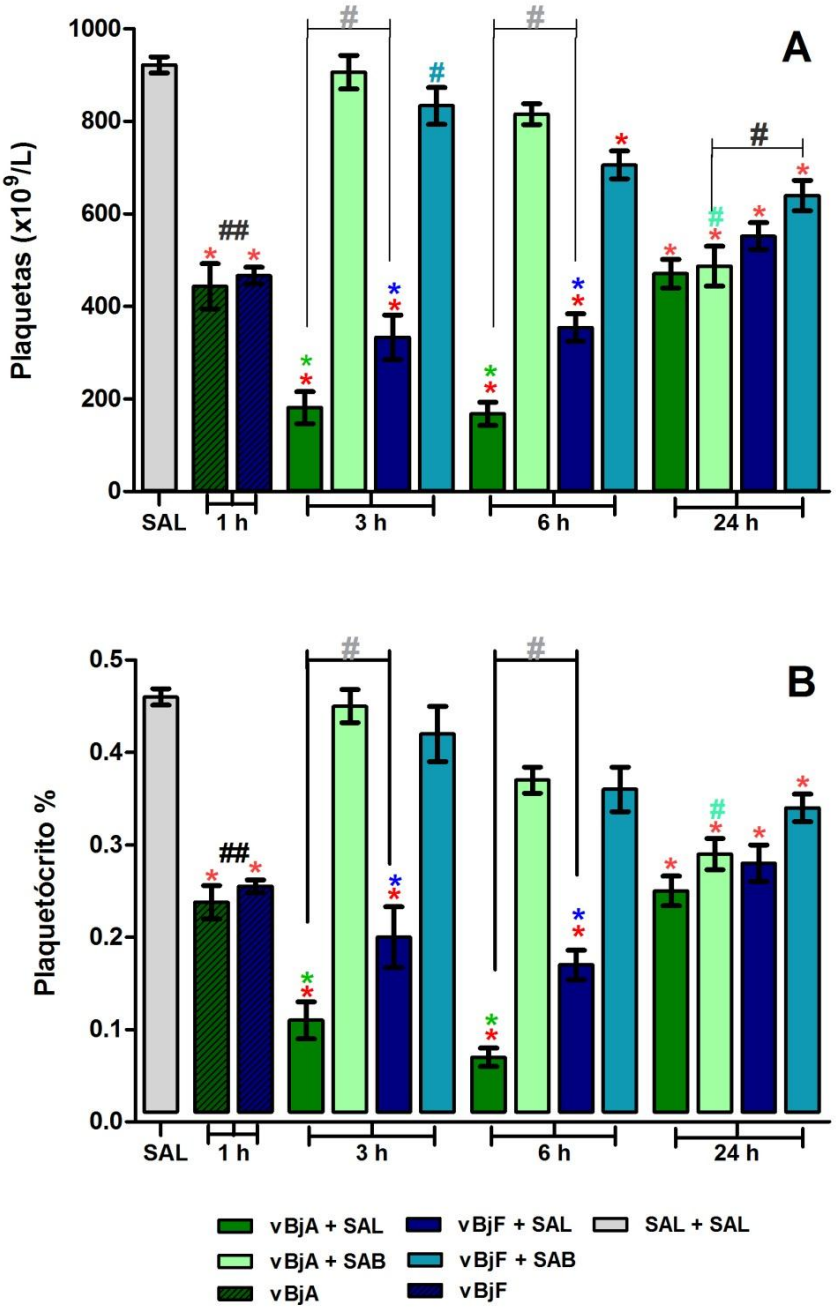

Figura 21 (A-B) - Contagem de plaquetas (A) e plaquetócrito (B) do sangue de ratos em 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa para $p<0,05$, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL)**;** *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * vBjF + SAL e vBjF + SAB; ## vBjA e vBjF em 1 h em relação aos grupos tratados com SAL em 3 e 6 h; # vBjA + SAL e vBjF + SAL em 3h e 6h, # vBjA+SAB em 24 h em relação a vBjF + SAB; grupos # vBjA + SAB e # vBjF + SAB em relação aos outros tempos.

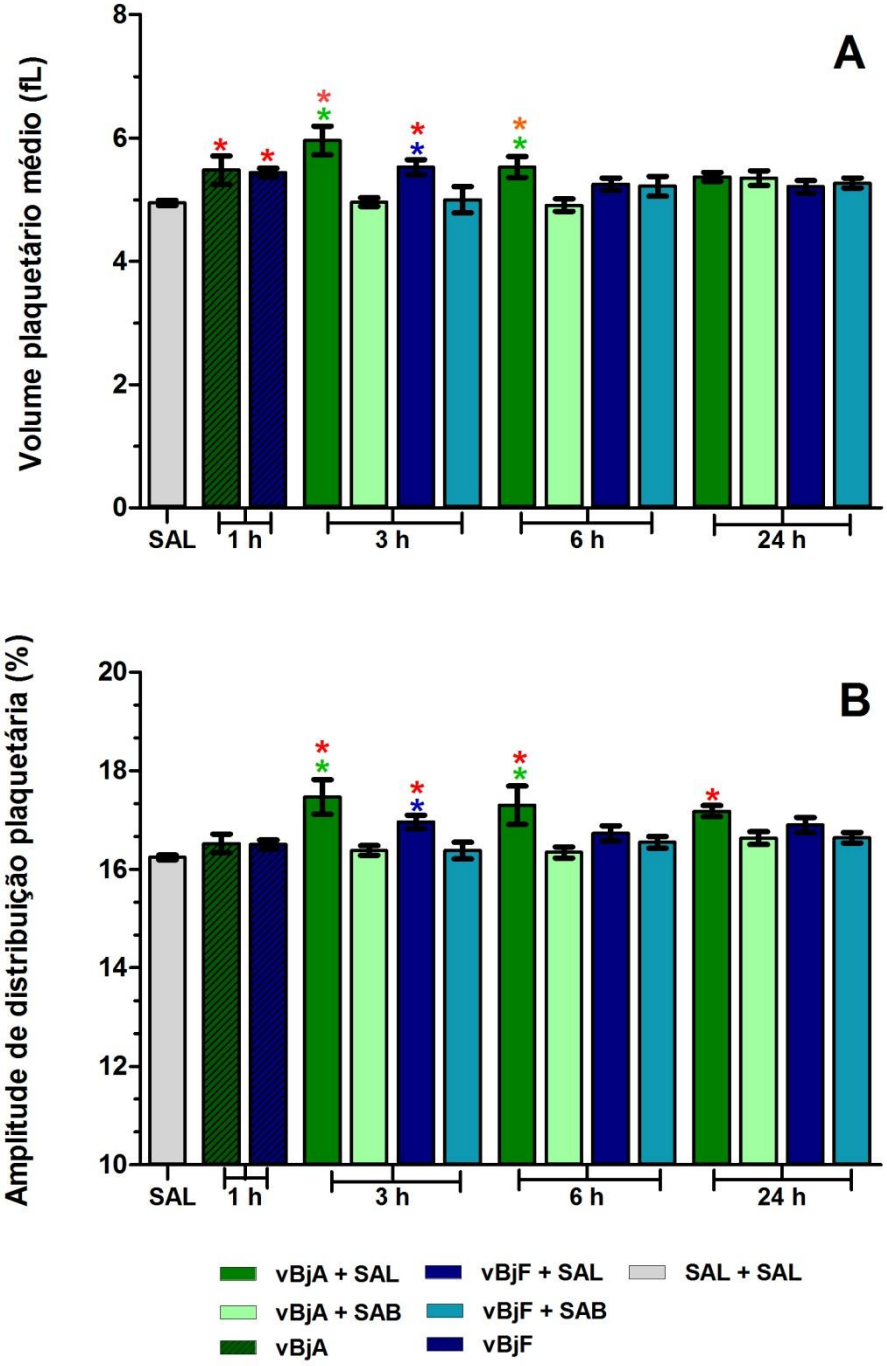

Figura 22 (A-B) - Volume plaquetário médio (VPM) (A) e Amplitude de distribuição plaquetária (ADP) (B) do sangue de ratos em 1, 3, 6 e 24 h após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL)**;** *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * e vBjF + SAL e vBjF + SAB.

4.3.2. Função plaquetária

Foi constatado pelos ensaios de agregação e adesão por Impact-R que a função plaquetária encontra-se bastante alterada nos animais inoculados com ambos os venenos e tratados apenas com salina (Fig. 23-27).

Os resultados dos ensaios de agregação em PRP com colágeno (Fig. 23) evidenciaram a diminuição da função plaquetária nos grupos inoculados com os venenos e tratados com salina, já em 3 horas. Enquanto a agregação média no grupo SAL + SAL foi de 67%, esta chegou a 6% no grupo vBjA + SAL, e a apenas 3% no grupo vBjF + SAL. Nos tempos subsequentes ocorreu uma leve queda no percentual de agregação, sendo que o grupo vBjA + SAL chegou a 5% em 6 horas e 3% em 24 horas, enquanto vBjF + SAL atingiu 1% em 6 horas, mantendo-se com esse percentual até 24 horas. Não foi observada diferença estatística significante entre os tempos, bem como entre os grupos inoculados com veneno de filhotes ou adultos de *B. jararaca.*

Com o tratamento com SAB, observou-se uma reversão da hipofunção plaquetária em 3 horas, para ambos os venenos. No entanto, em 6 horas ocorreu uma leve queda na função, não significativa em relação ao grupo controle e aos grupos tratados com SAB em 3 horas. Em 24 horas, porém, o decréscimo foi considerável e os grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB atingiram percentuais de agregação de 26 e 40%, respectivamente. Assim, além da queda na contagem de plaquetas observada para este horário, as plaquetas existentes dos grupos tratados com SAB apresentaram também uma evidente diminuição de função.

Nos ensaios de adesão plaquetária, as plaquetas se comportaram de forma semelhante ao observado para os ensaios de agregação (Fig. 24; Fig.25 A-C; Fig.26 A-C; Fig.27 A-C). Na figura 24, nota-se que nos tratados apenas com salina, praticamente não houve adesão à placa das plaquetas existentes, tanto em 3 quanto em 6 horas. Em 24 horas, diferentemente do que foi observado no ensaio de agregação, houve uma tendência de recuperação do quadro de hipofunção plaquetária, especialmente no grupo vBjA + SAL. Essa impressão visual é comprovada pelos parâmetros quantitativos relativos a superfície de cobertura (SC), número de observações (Ob), e tamanho de agregados plaquetário (AS) (Fig.25-27). Em 3 horas, ocorreu uma diminuição do número de observações e consequentemente, uma diminuição do percentual de cobertura da superfície da placa pelas plaquetas, tanto no grupo vBjA + SAL quanto

vBjF + SAL, em relação ao controle (SC: 9,5%; Ob: 1600 observações) (Fig. 25 A; Fig. 26 A). O valor da mediana de SC do grupo vBjA + SAL em 3 horas não se altera em relação a 6 horas (2%), enquanto a mediana do Ob passa de 300 observações para 400. Já no grupo vBjF + SAL, a mediana da SC passa de 1% para 2% em 6 horas, e o Ob aumenta de 150 observações para 400 em 6 horas. Apesar do aumento, observado principalmente no Ob do grupo vBjF + SAL, não foi houve diferença estatística significante entre os tempos para ambos os grupos (Fig. 25 A-B; Fig. 26 A-B). Em relação ao tamanho dos agregados plaquetários não houve diferença entre os grupos tratados com salina e o grupo controle (AS: 27 μm^2), tanto em 3 quanto 6 horas (Fig. 27 A-B). Em 24 horas, a mediana de SC do grupo vBjA + SAL aumentou para 5% e o Ob para 630 observações, enquanto para vBjF + SAL, a SC aumentou para 3,5%, mas o Ob permaneceu em 400 observações (Fig. 25 C; Fig. 26 C). Neste horário, a maior mudança ocorreu no parâmetro AS (Fig. 27 C), onde o tamanho dos agregados plaquetários de ambos os grupos superou o observado para o controle, sendo maior em termos de mediana para o grupo vBjA + SAL (AS: 45 μm^2) em relação a vBjF + SAL (AS: 35 μm^2), no entanto, os valores encontrados no grupo inoculado com veneno de filhotes se concentraram predominantemente no terceiro quartil, o que fez com que esse grupo se distinguisse significativamente tanto do controle quanto do grupo vBjF + SAB.

Paralelamente, nota-se visualmente a similaridade entre o grupo controle SAL + SAL e os grupos inoculados com ambos os venenos e tratados com SAB, em 3 e 6 horas (Fig. 24). Assim como ocorreu no ensaio de agregação, em 24 horas houve uma queda tanto na SC quanto no Ob de ambos os grupos (Fig. 25 C, Fig. 26 C), sendo que em relação a SC, apenas o grupo vBjF+ SAB se diferenciou do grupo controle (SC: 9,5%; Ob: 1600), com um valor de mediana de 2%, enquanto no Ob, ambos os grupos se diferenciaram do controle (vBjA + SAB Ob: 630; vBjF + SAB Ob: 400), mas não entre si ou entre os grupos tratados com salina. Adicionalmente, o tamanho dos agregados plaquetários dos grupos tratados com SAB foi similar ao que foi observado para o controle (Fig. 27 C).

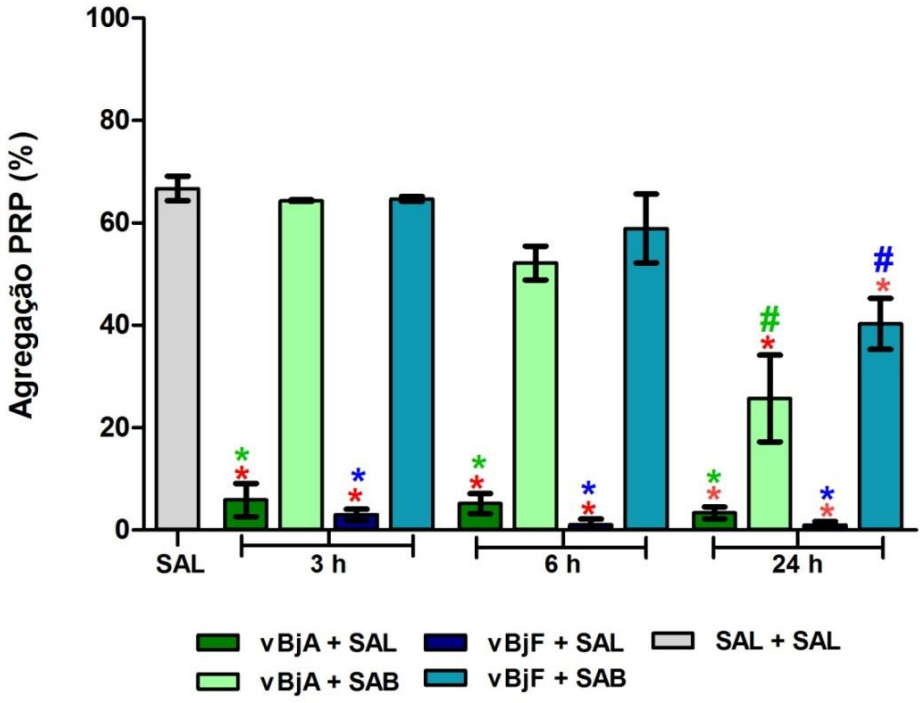

Figura 23 – Agregação plaquetária induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP) do sangue de ratos em 3, 6 e 24 h após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa, para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB*; vBjF + SAL e vBjF + SAB*; e entre os grupos tratados com SAB (#vBjA + SAB e #vBjF + SAB) em 24 h em relação a esses mesmos grupos em 3 e 6 h.

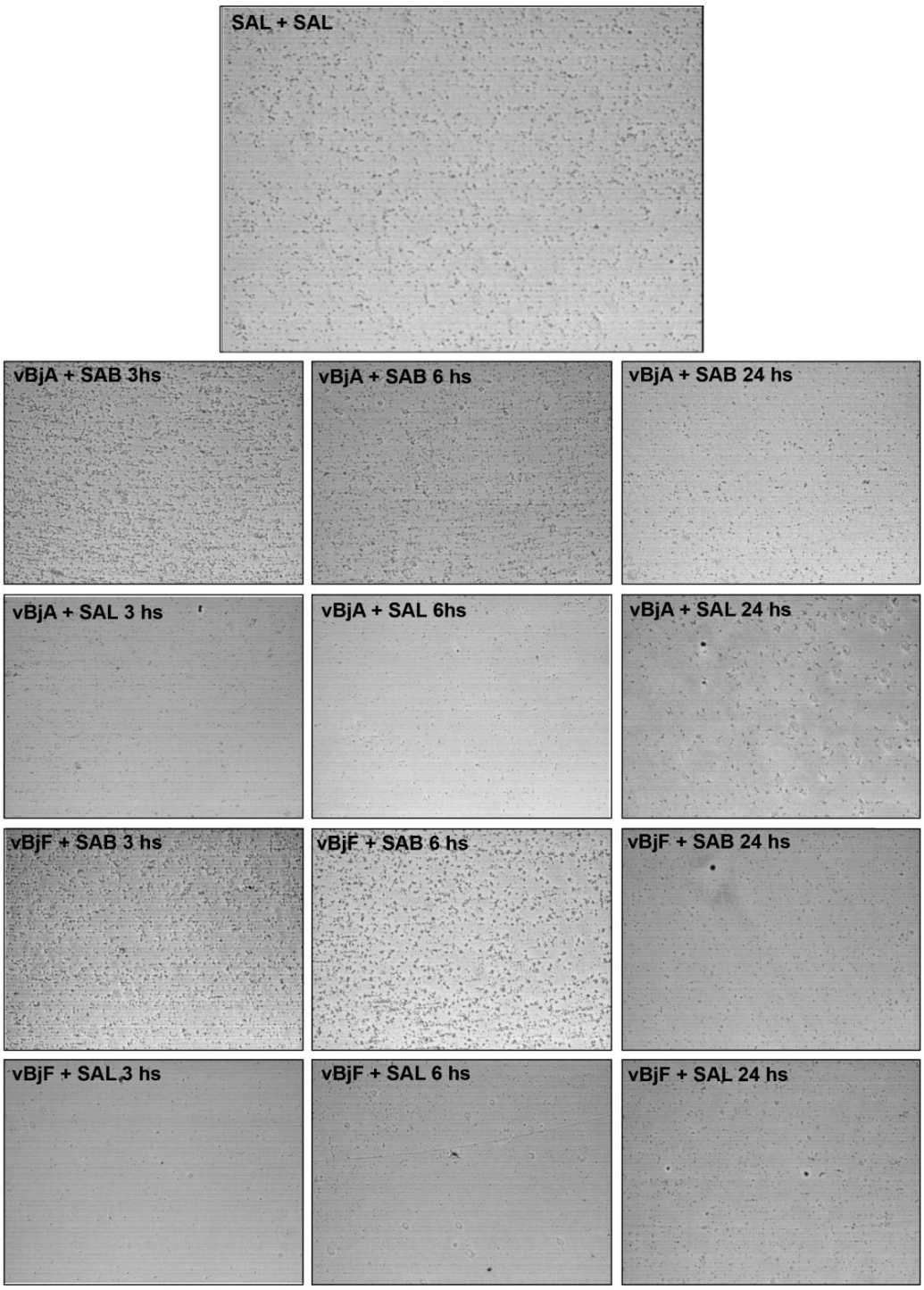

Figura 24 – Adesão plaquetária por Impact-R System. Amostras de sangue de ratos em 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.*

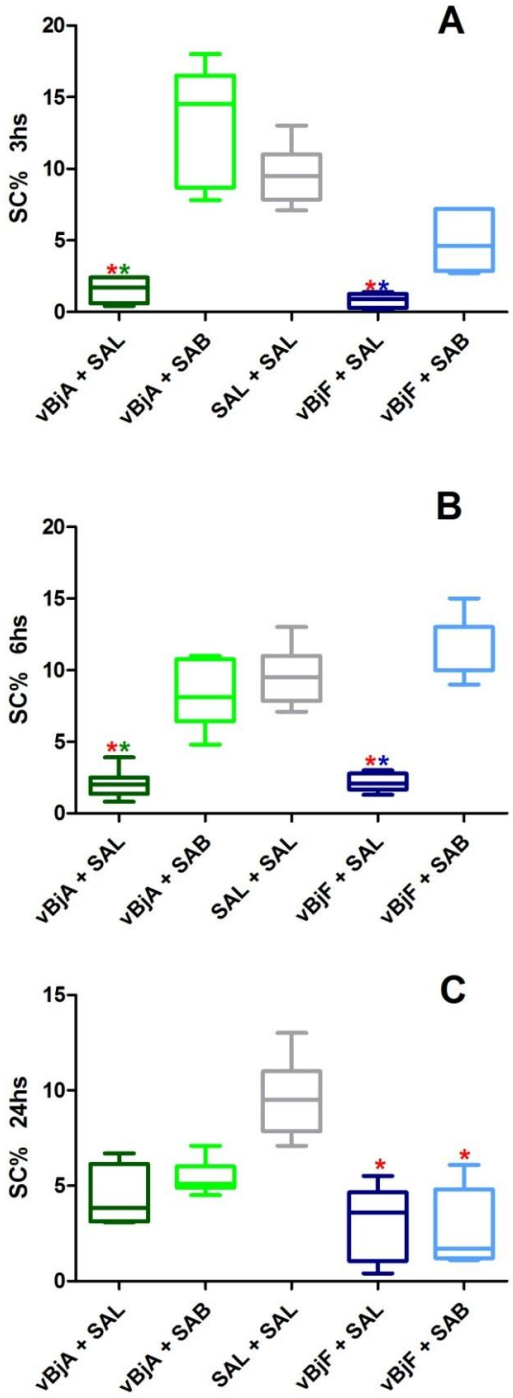

Figura 25 (A-C) - Adesão plaquetária por Impact-R System. Percentual de superfície de cobertura (SC) da placa por plaquetas de rato em 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa, para $p<0,05$, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL), *e entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB, *e vBjF + SAL e vBjF + SAB.

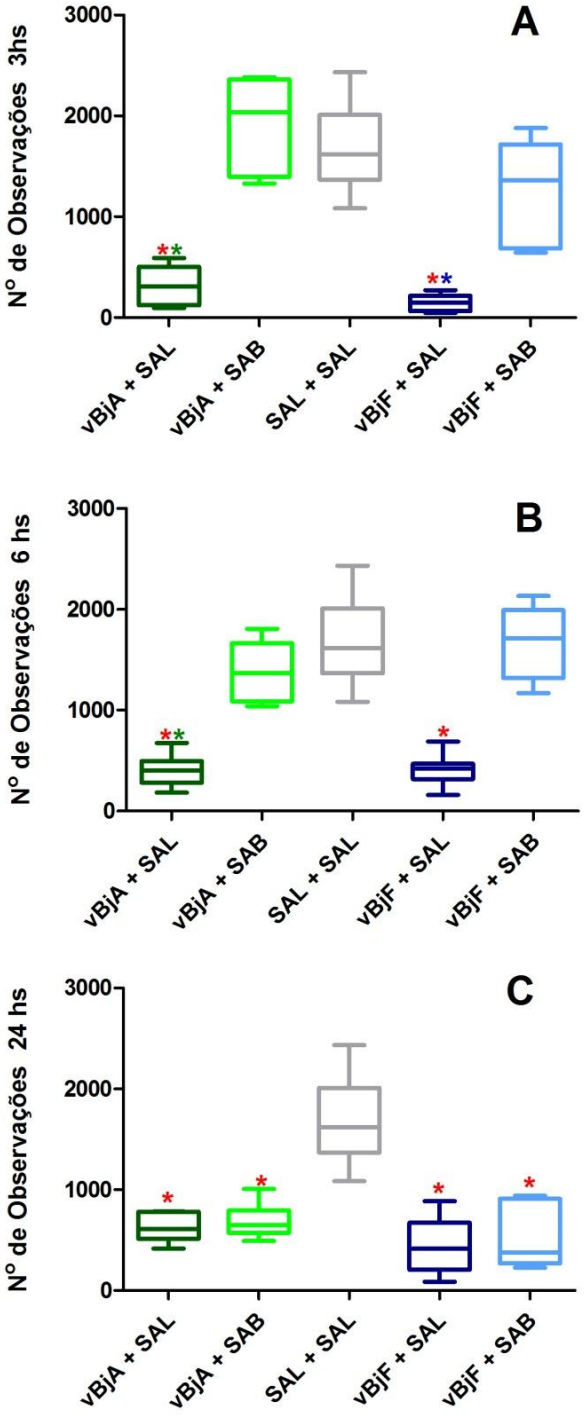

Figura 26 (A-C) - Adesão plaquetária por Impact-R System. Número de observações de plaquetas de rato em 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa para $p<0,05$, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL), *e entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB, * e vBjF + SAL e vBjF + SAB.

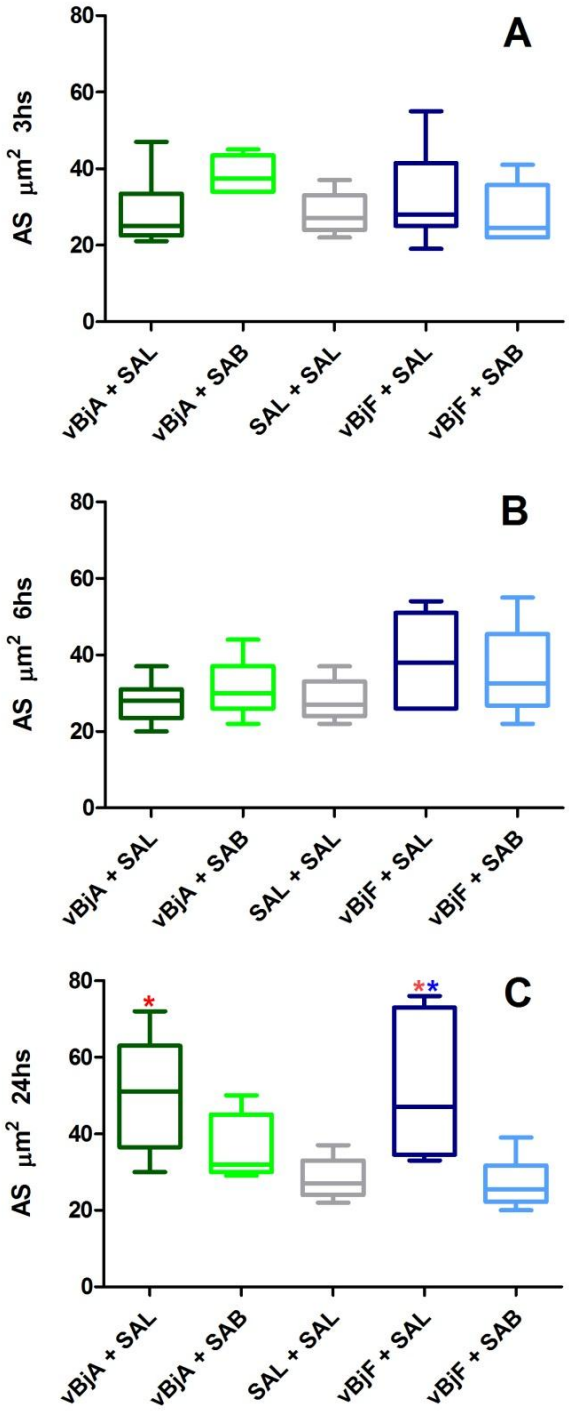

Figura 27 (A-C) - Adesão plaquetária por Impact-R System. Tamanho de agregados plaquetários (AS) em µm^2, de plaquetas de rato em 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa para $p<0,05$, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL), *e entre os grupos vBjF + SAL e vBjF + SAB.

4.4. FATORES DA COAGULAÇÃO

4.4.1. Fibrinogênio

Em uma hora após a inoculação dos venenos, o nível do fibrinogênio plasmático (Fig. 28) reduziu 47% no grupo vBjA, e 40% no grupo vBjF, em relação a controle SAL + SAL (223 ± 7,5 mg/dL). Este fator atinge seu nível mais baixo em 3 horas após a inoculação dos venenos, e de forma similar para ambos os grupos (vBjA + SAL: 37 ± 3,0 mg/dL; vBjF + SAL: 47 ± 7,0 mg/dL). Não houve um aumento significativo nestes grupos em 6 horas em relação ao observado para 3 horas (vBjA + SAL: 55 ± 5,0 mg/dL; vBjF + SAL: 54 ± 6,0 mg/dL). E, em 24 horas, apenas o grupo vBjA + SAL apresentou um aumento considerável e significante em relação ao mesmo grupo em 3 horas e ao grupo vBjF + SAL (p=0,01), mas, ainda assim, atingindo apenas 40% do nível de fibrinogênio do grupo controle.

O tratamento reverteu parcialmente o consumo de fibrinogênio já em 3 horas, mas apenas no grupo inoculado com veneno de filhotes de jararaca, que atingiu cerca de 70% do nível do grupo controle, enquanto o grupo vBjA + SAB chegou a somente 30%. Em 6 horas, os níveis de fibrinogênio de ambos os grupos tratados com SAB se equipararam, mas ainda foi observada diferença entre estes grupos e o controle. Em 24 horas, o consumo de fibrinogênio foi totalmente revertido em ambos os grupos, contudo, foi observado um aumento significativo acima do nível do controle para o grupo vBjA + SAB. Esse aumento da quantidade de fibrinogênio circulante é desencadeado pelo consumo do mesmo, sendo comumente observado em envenenamento acidental humano já que se trata de uma proteína plasmática de fase aguda, cujos valores podem aumentar após a ocorrência de uma injúria (124).

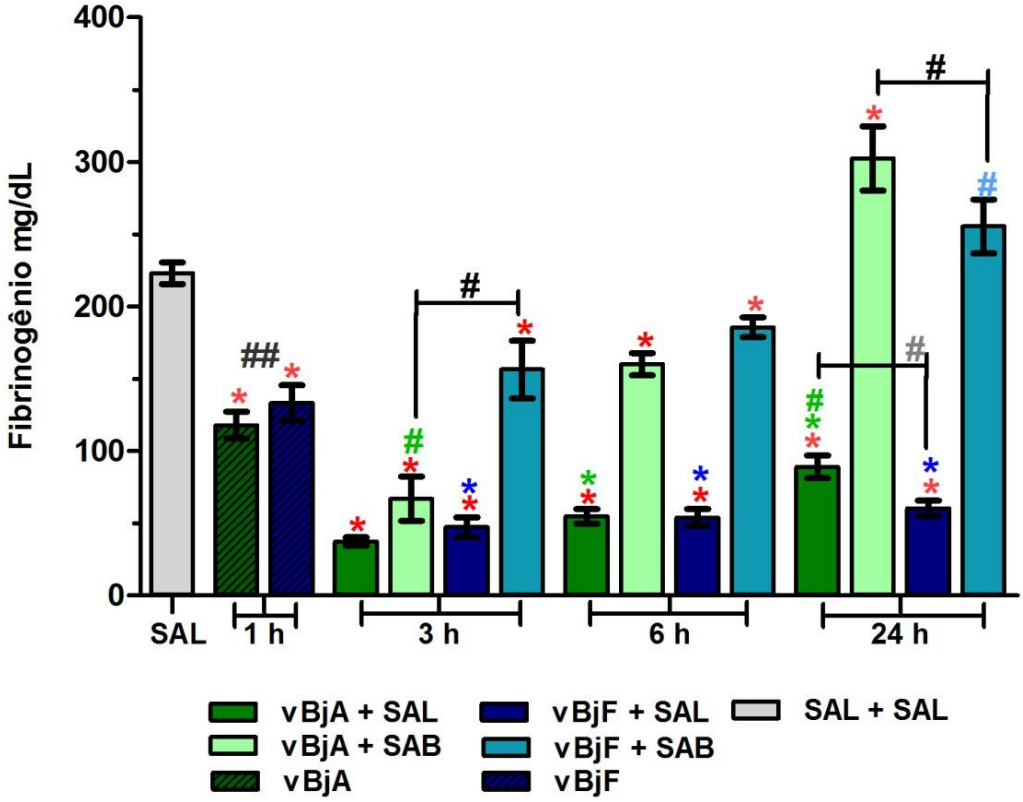

Figura 28 – Dosagem do fibrinogênio plasmático de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significante, para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL)**;** *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * e vBjF + SAL e vBjF + SAB; # vBjF + SAB em relação a vBjA+SAB; # vBjF + SAB em 24 h em relação a 3 e 6 h; # vBjA+SAB em 3 h em relação a 6 e 24h e vBjA + SAL em 24 h em relação a 3 e 24 h ; # vBjA+SAL em relação a vBjF + SAL em 24 h ; ## vBjA e vBjF em 1 h em relação aos grupos tratados com SAL em 3, 6 e 24 h.

4.4.2. Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f):

Na figura 29 podemos observar o aumento dos PDF/f já em 1 hora após a inoculação dos venenos. Em 3 horas o aumento no grupo vBjA + SAL foi de cerca de 450 vezes em relação ao controle (13 ± 5,5 ng/mL), e de quase 400 vezes no grupo vBjF + SAL. Os níveis de PDF/f permaneceram significantemente alterados em 6 horas, de forma similar para ambos os grupos, sendo que em 24 horas, o acréscimo ainda era cerca de 210 vezes em relação ao controle. Os animais tratados com soro também tiveram seus níveis significativamente aumentados. Porém, o tratamento foi mais efetivo no grupo vBjF + SAB, revertendo parcialmente o aumento dos níveis de PDF/f, que atingiram a aproximadamente a metade do observado para os outros grupos já em 3 horas. Em 6 e 24 horas, os valores ainda permaneciam mais altos que os do controle, mas consideravelmente mais baixos que o dos grupos tratados com salina.

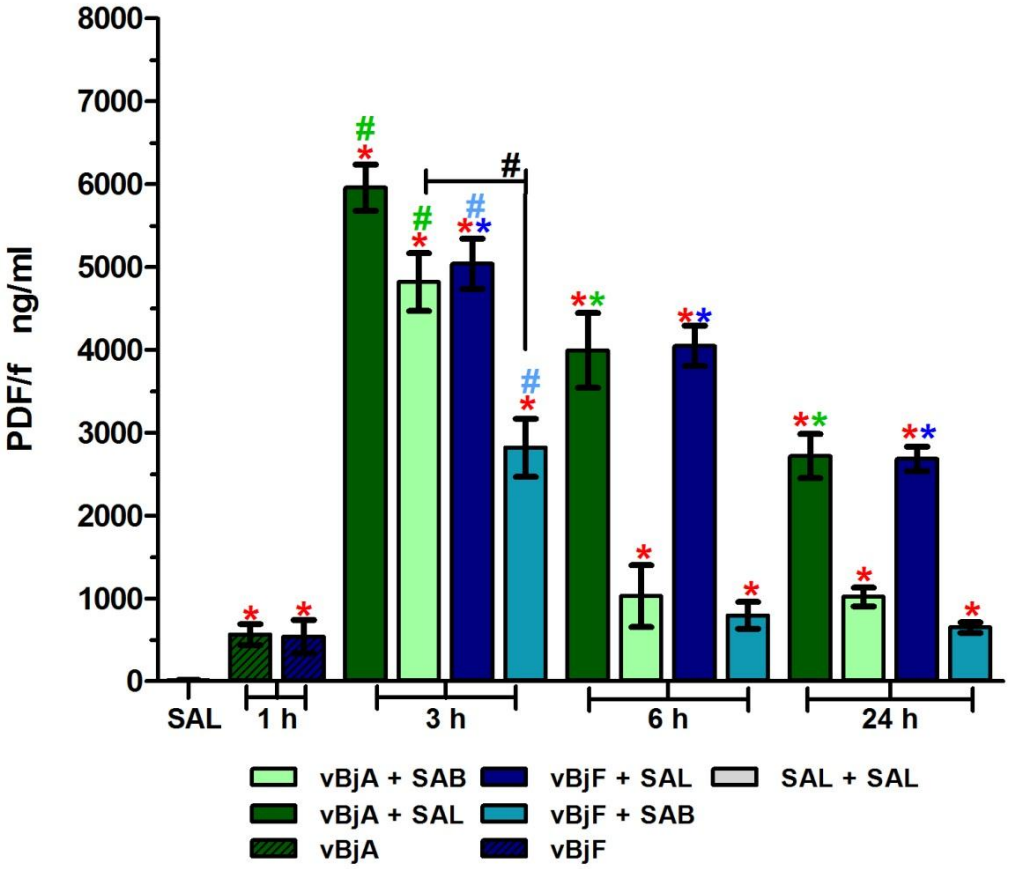

Figura 29 – Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f) de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v*. Diferença estatística significante para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); * entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB, * e vBjF + SAL e vBjF + SAB; # vBjA + SAB e vBjF + SAB em 3 horas; # # grupos tratados com salina ou SAB em 3 h em relação aos mesmos grupos em 6 e 24 horas.

4.4.3. Dosagem de fator de von Willebrand (vWF):

Podemos observar na figura 30 que, já em 1 hora, houve uma diminuição significativa do vWF em relação ao controle. Nos animais inoculados com ambos os venenos, a quantidade do vWF diminuiu em cerca de 50% (vBjA: 55% ; vBjF: 48%) em relação aos níveis do controle (0,19 ± 0,01 µg/mL). Em 3 horas a queda foi mais acentuada, e os níveis de vWF diminuem em mais de 70% (vBjA + SAL: 76% ; vBjF + SAL: 72%). Em 6 horas após a inoculação dos venenos, inicia-se um aumento gradual nos grupos tratados com salina, notadamente no grupo vBjF + SAL, que atinge cerca do 60% do valor do grupo controle, e praticamente normaliza em 24 horas. Já no grupo vBjA + SAL, o vWF aumenta em 6 horas até atingir níveis próximos aos de 1 hora, chegando ao máximo de 48% em 24 horas. Assim, neste horário, o grupo inoculado com veneno *B. jararaca* adultas ainda apresenta diferença significativa em relação ao controle, diferenciando-se também do grupo vBjF + SAL.

Nos animais tratados com SAB, podemos observar que no tempo de 3 horas a quantidade de vWF permanece relativamente baixa nos dois grupos tratados com SAB (vBjA + SAB: 48%; vBjF + SAB: 55%). Contudo, esta é significantemente mais alta que os valores dos grupos tratados com salina no mesmo horário, e similar ao observado para os dois venenos em 1 hora. Assim, pode-se afirmar que o tratamento foi efetivo em interromper a queda do vWF ainda em 3 horas, normalizando os níveis do fator já em 6 horas.

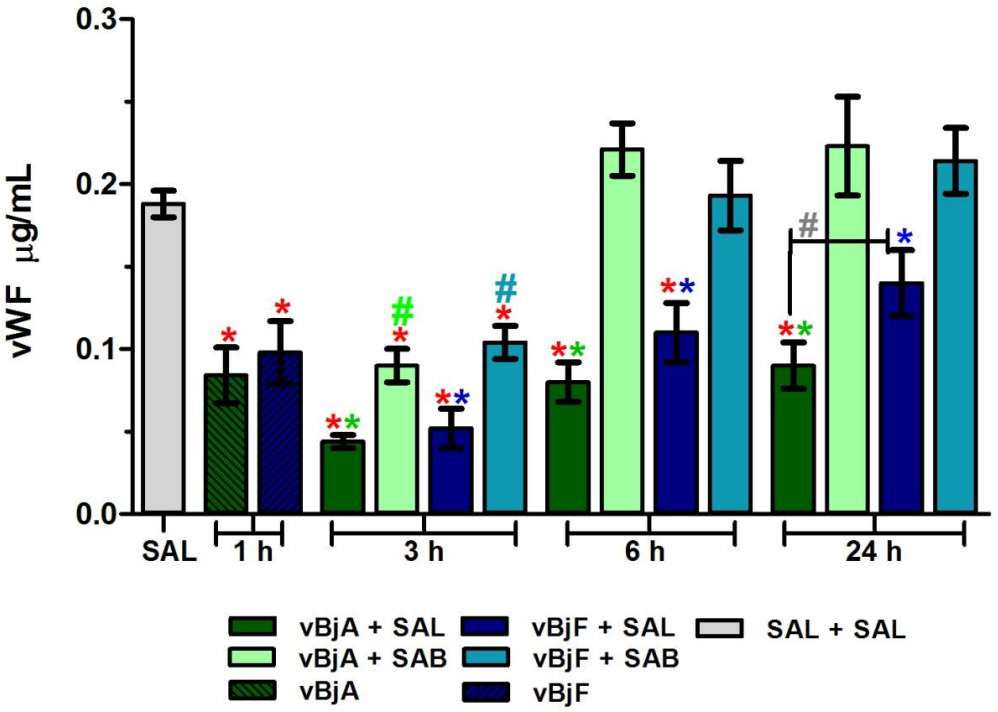

Figura 30 – Dosagem de fator de von Willebrand (vWF) de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v*. Diferença estatística significativa para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL); *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB, *e vBjF + SAL e vBjF + SAB; #vBjA + SAB e #vBjF + SAB em 3 h em relação a 6 e 24 h; # vBjA+SAL em relação a vBjF + SAL em 24 h (p=0,015).

4.4.4. Fator II e Fator X da coagulação:

Pela figura 31 (A), podemos observar que após 1 hora da inoculação dos venenos, ambos os grupos apresentam tendência de queda na quantidade de fator II (FII), especialmente o grupo vBjA, cujo valor de mediana chega a 77%, enquanto para vBjF esta se mantém em 91%, bem próxima ao valor observado no grupo controle (média: 92%; mediana: 94%).

Em 3 horas (Fig. 31 B) o consumo do FII continua nos grupos tratados com salina, mas ainda sem apresentar diferença estatística entre os tratamentos ou em relação ao controle. Já em 6 horas após a inoculação dos venenos (Fig. 31 C) a quantidade média de FII nos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL chega a respectivamente 47% (mediana: 46%) e 41% (mediana: 44%), indicando um consumo ao redor de 50% deste fator no plasma dos animais inoculados com ambos os venenos. Neste horário pode-se notar que o tratamento interrompeu o consumo de FII. Porém, os grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB ainda apresentaram diferença em relação ao controle. Assim, podemos dizer que o tratamento com SAB evitou parcialmente o consumo de FII decorrente da inoculação de ambos os venenos após seis horas.

Em 24 horas (Fig. 31 D), observou-se que o consumo do FII foi totalmente revertido em todos os grupos experimentais, que inclusive apresentaram médias de quantidade de FII acima das do controle, notadamente nos grupos inoculados com veneno de serpentes adultas (vBjA + SAL: 110%; vBjA + SAB: 104%), similarmente ao que foi observado para o fibrinogênio plasmático nesse mesmo horário (Fig. 28).

Com relação ao fator X (FX) (Fig. 32 A-D), nota-se que ocorreu um consumo considerável já em 1 hora após a inoculação de ambos os venenos, sendo este mais acentuado no grupo vBjA, que apresentou uma quantidade média de FX de apenas 28%, enquanto para vBjF esta foi de 45%, sendo ambas apresentam diferença em relação ao controle (média: 99%) (Fig. 32 A).

Em 3 horas (Fig. 32 B) todos os grupos experimentais atingem níveis de FX semelhantes, ao redor da metade da quantidade do grupo controle. Nos grupos tratados com salina, a quantidade média de FX para vBjF + SAL ficou bem próxima da observada anteriormente (46%), enquanto para vBjA + SAL houve um aumento de cerca de 14% em relação ao observado em 1 hora, atingindo níveis médios ao redor de

42%. Ainda assim, a média do consumo de FX foi de quase 60% para vBjA + SAL, e 53% para vBjF +SAL, sendo observada diferença estatística significante em relação ao controle, apesar de ambos os grupos apresentarem limites superiores do 3º quartil ao redor de 70%. Nos grupos inoculados com SAB, o grupo vBjA + SAB apresentou uma quantidade média de cerca de 50% e o limite superior de 3º quartil atingindo 76%, enquanto no vBjF + SAB a média foi de 52%, mas com o limite superior do 3º quartil ao redor de 85%, mas sem diferença significante em relação ao controle (Fig. 32 B).

Em 6 horas (Fig. 32 C), tanto o grupo vBjA + SAL quanto vBjF + SAL mantém quantidades médias de FX similares as observadas para 3 horas (42% e 45%, respectivamente). Contudo, os valores observados para o grupo inoculado com venenos de serpentes filhotes se distribuíram de forma mais homogênea, enquanto no grupo inoculado com veneno de adultas, houve uma concentração de valores no 1º quartil. Nos grupos tratados com SAB houve um aumento da quantidade de FX (vBjA + SAB: 60%; vBjF + SAB: 69%), mas ainda assim estes ainda se mostraram diferentes do grupo controle, e somente alcançaram quantidades normais do FX no tempo de 24 horas (Fig. 32 D). Nos animais tratados com salina, a quantidade de FX permaneceu alterada ainda em 24 horas, especialmente para vBjF + SAL (Fig. 32 D). No grupo vBjA + SAL houve um aumento na quantidade média de FX, que atingiu cerca de 60% (mediana: 63%). Já no vBjF + SAL, a média permaneceu em cerca de 47% (mediana: 43%).

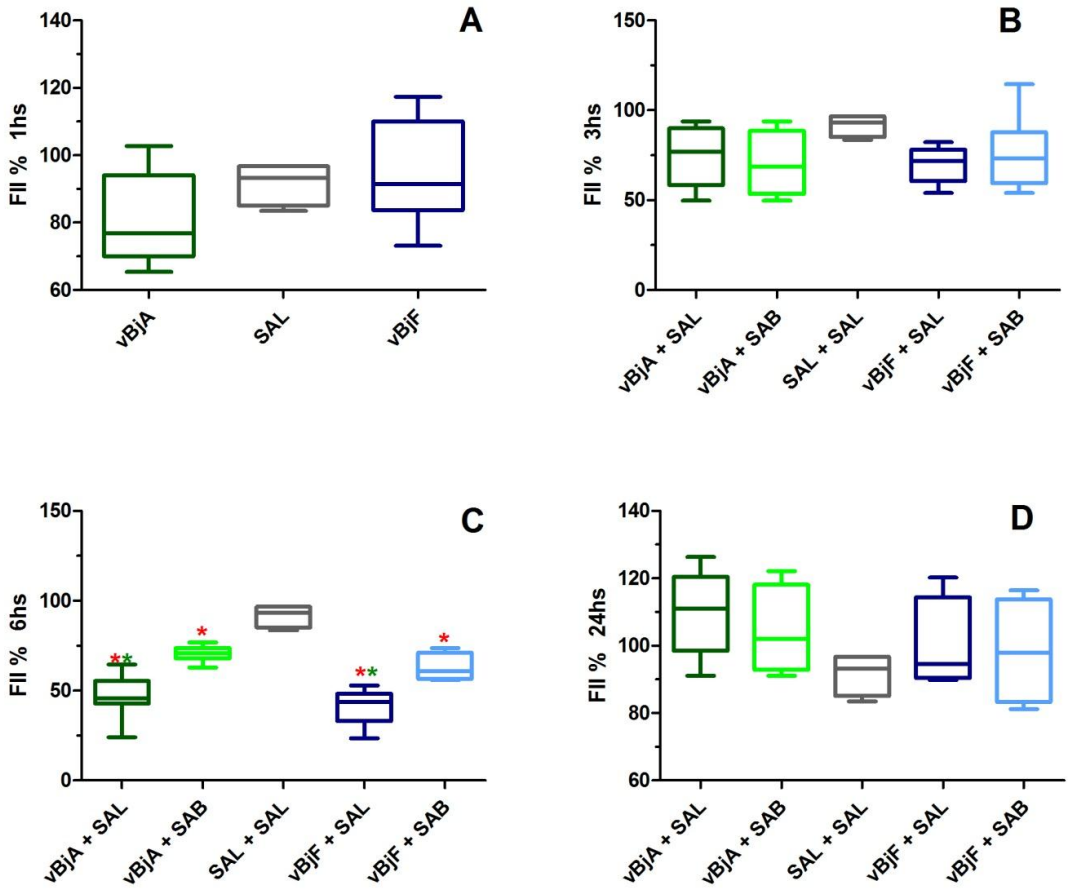

Figura 31 (A-D) - Dosagem de fator II da coagulação no plasma de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v*. Diferença estatística significativa para $p<0,05$, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL), *e entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB, e *vBjF + SAL e vBjF + SAB.

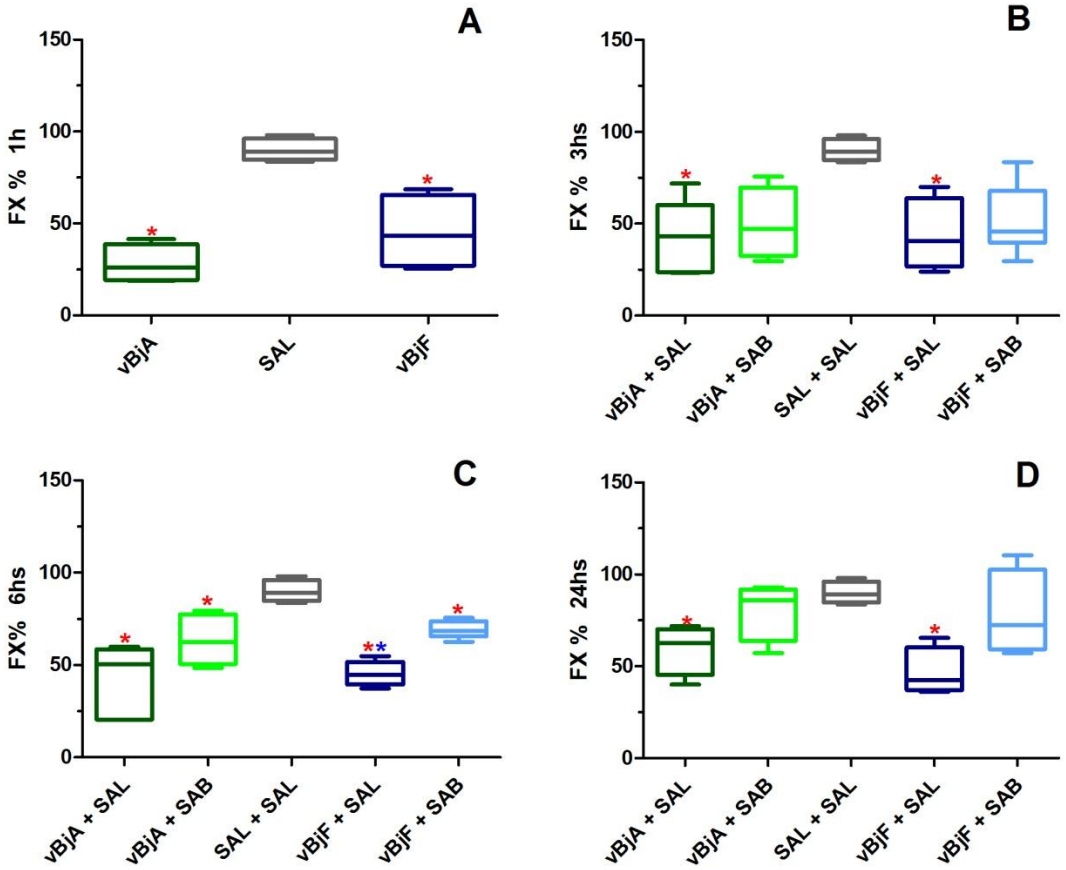

Figura 32 (A-D) - Dosagem de fator X da coagulação no plasma de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significativa para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL), *e entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB, *e vBjF + SAL e vBjF + SAB.

4.4.5. Dosagem do complexo trombina-antitrombina III (TAT):

Na figura 33, observamos que já em 1 hora após a inoculação dos venenos (Fig. 33 A), ocorre um aumento significativo do TAT para ambos os venenos. Em 3 horas (Fig. 33 B), a quantidade do complexo TAT aumentou consideravelmente no grupo vBjF + SAL, sendo observada diferença tanto em relação ao grupo controle, quanto ao grupo tratado com SAB. Além disso, é interessante ressaltar a diferença encontrada entre vBjF + SAL e vBjA + SAL para este horário. Pela figura podemos notar que parte dos valores de TAT para o grupo vBjF + SAL estão acima de 3 mg/mL (média: 3,9 mg/mL ; mediana: 3,6 mg/mL), localizados no terceiro quartil e com um limite superior acima de 7 mg/mL. Estes valores estão muito acima do que foi observado para o grupo vBjA + SAL, que apresentou uma média de TAT ao redor de 1,4 mg/mL (mediana: 1,5 mg/mL) e o valor do limite superior ao redor de 2,2 mg/mL. Assim, uma vez que o TAT é uma medida indireta da formação de trombina intravascular, este resultado é uma indicação do maior potencial para geração de trombina após a inoculação do veneno de serpentes filhotes em ratos, em comparação o potencial observado para o veneno de serpentes adultas. Ainda em 3 horas houve um leve aumento do TAT no grupo vBjA + SAB (média: 0,35 mg/mL; mediana: 0,27 mg/mL), sendo este bem mais discreto no grupo vBjF + SAB (média: 0,15 mg/mL; mediana: 0,10 mg/mL), ambos não significantes em relação ao controle (média: 0,009 mg/mL; mediana: 0,007 mg/mL).

Em 6 horas (Fig. 33 C), houve uma queda na quantidade do complexo em todos os grupos experimentais. Os valores dos tratados com SAB se aproximaram ainda mais do observado para os controles, enquanto nos tratados com salina estes permaneceram um pouco mais elevados, e atingiram valores próximos para média e limites inferior (LI) e superior (LS) (vBjA + SAL: média 0,11mg/mL LI 0,05 LS 0,19; vBjF + SAL média: 0,13 mg/mL LI 0,07 LS 0,21).

Em 24 horas (Fig. 33 D), os níveis do complexo TAT dos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL continuaram em queda, se aproximando dos valores do grupo controle, porém, ainda apresentando diferença estatística. Além disso, foi observado um aumento no grupo vBjA + SAB, significativo tanto em relação ao controle quanto ao grupo vBjF + SAB, e também ao mesmo grupo no tempo de 3 e 6 horas.

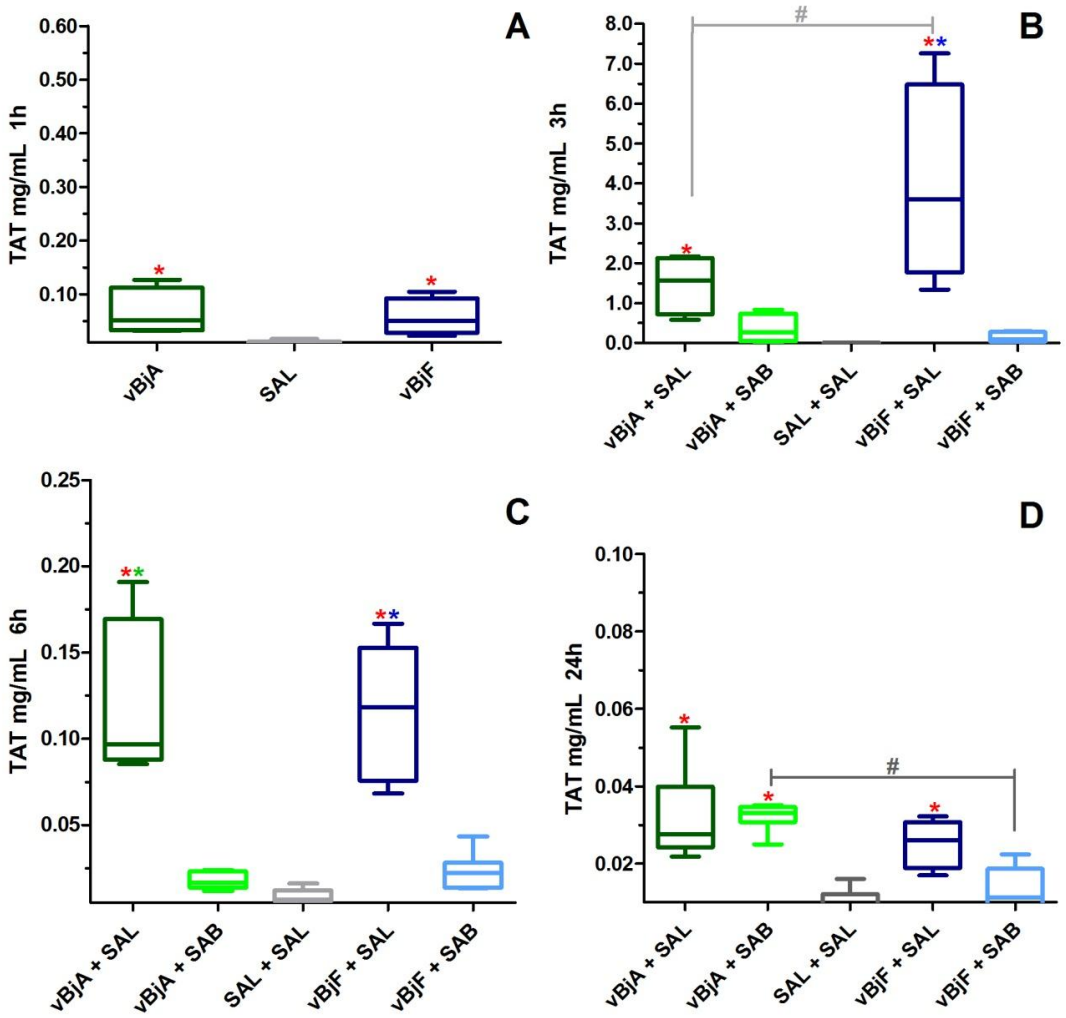

Figura 33 (A-D) - Dosagem do complexo trombina-antitrombina III (TAT) de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v*. Diferença estatística significativa para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL), *entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB, * e vBjF + SAL e vBjF + SAB, # entre os grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL em 3 h (p<0,001), e entre os grupos tratados com SAB em 24 horas (p<0,001).

4.5. HEMÓLISE INTRAVASCULAR

Para acessar dados relativos à ocorrência de hemólise intravascular decorrente do processo de envenenamento, foram feitas dosagens de hemoglobina e haptoglobina plasmáticas (Fig. 34 e Fig. 35). Adicionalmente foram analisadas lâminas de esfregaços sanguíneos dos grupos experimentais para verificar a existência de hemácias anormais (Fig. 36).

4.5.1. Dosagem de hemoglobina plasmática

Com relação à dosagem de hemoglobina plasmática (Fig. 34), foi observado que já em 1 hora ocorreu um aumento de mais de três vezes em relação ao grupo controle (média: 0,02 ±0,002 mg/mL) na quantidade desta proteína no plasma dos animais inoculados com ambos os venenos. Em 3 horas, a quantidade de hemoglobina aumentou em cerca de 40 vezes no grupo vBjA + SAL, e em mais de 30 vezes no grupo vBjF + SAL. Em 6 horas há uma redução nos níveis circulantes para ambos os grupos, sendo inclusive observada diferença significante em relação ao tempo de 3 horas. Mesmo assim, a quantidade média de hemoglobina nas amostras ainda encontra-se muito acima dos valores normais, tanto no grupo vBjA + SAL (média: 0,20 ±0,04 mg/mL) quanto no grupo vBjF + SAL (média: 0,18 ±0,04 mg/mL).

Nos grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB observa-se que, apesar do tratamento, os níveis de hemoglobina em 3 horas também aumentaram consideravelmente em relação ao controle, mas menos do que foi observado para os grupos tratados com salina. O aumento foi um pouco maior no grupo vBjA + SAB (média: 0,37 ±0,10 mg/mL) em relação ao grupo vBjF + SAB (média: 0,20 ±0,07 mg/mL), porém, não foi observada diferença significante entre ambos. Um retorno significativo para próximo do nível do grupo controle ocorreu somente após 6 horas da inoculação dos venenos.

Em 24 horas, tanto os grupos tratados com salina quanto os tratados com SAB atingiram níveis basais de circulação desta proteína.

4.5.2. Dosagem de haptoglobina plasmática

Na figura 35 podemos observar os dados referentes à dosagem de haptoglobina. Em 1 hora houve uma pequena redução na quantidade média desta proteína nas amostras dos grupos inoculados com veneno de serpentes adultas e filhotes, em comparação com o controle (média: 0,39 ±0,02 mg/mL). Já em 3 horas, pode-se observar o consumo acentuado desta proteína em todos os grupos experimentais, inclusive nos tratados com SAB. Em 6 horas, a quantidade de haptoglobina nos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL chegou a praticamente zero, enquanto nos animais tratados com SAB houve uma reversão significativa do consumo, com os grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB atingindo quantidades normais em relação ao controle. Em 24 horas, observou-se um aumento significativo nos grupos tratados com SAB e no grupo vBjA + SAL para níveis acima do grupo controle. Neste tempo foi observada diferença significativa entre os dois venenos.

4.5.3. Hemólise intravascular

Pela Figura 36 podemos analisar a morfologia das hemácias dos grupos experimentais. No grupo controle (SAL + SAL, Fig. 36 A) observa-se o formato e aparência destas células. Em 1 hora inicia-se leve um aumento da presença de células com morfologia anormal, como esquizócitos (hemácias fragmentadas), células em formato de gota e acantócitos (125) (Fig. 36 B,C), que em 3 horas já são facilmente notadas em todos os grupos inoculados com os venenos (Fig. 36 D1-G1), inclusive nos tratados com SAB, mas principalmente nos grupos tratados com salina (Fig. E1, G1), configurando quadro de poiquilocitose. Estas células anormais continuam a ser observadas até o tempo de 24 horas. É interessante ressaltar que nesse horário foi observada uma diminuição do número de hemácias e do hematócrito dos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL (Fig. 18 A-B).

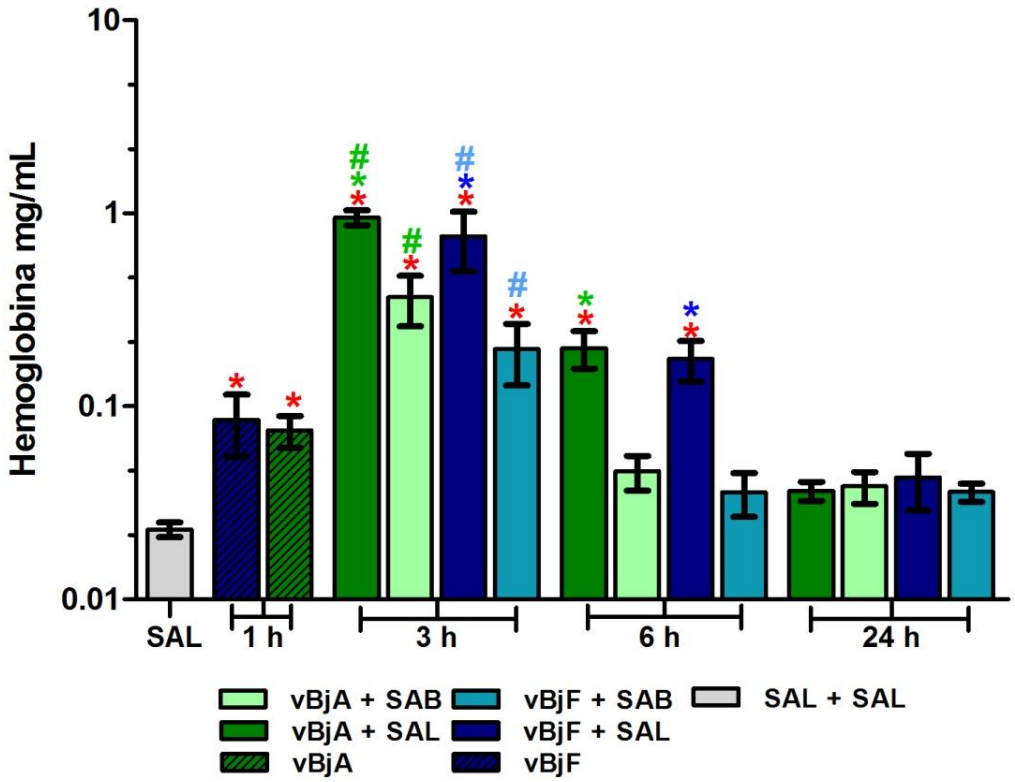

Figura 34 – Dosagem de hemoglobina plasmática de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significante para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL)**;** * entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * vBjF + SAL e vBjF + SAB; e entre os grupos # vBjA + SAB / vBjA + SAL, e # vBjF + SAB / vBjF + SAL em 3 h em relação a 6 e 24hs.

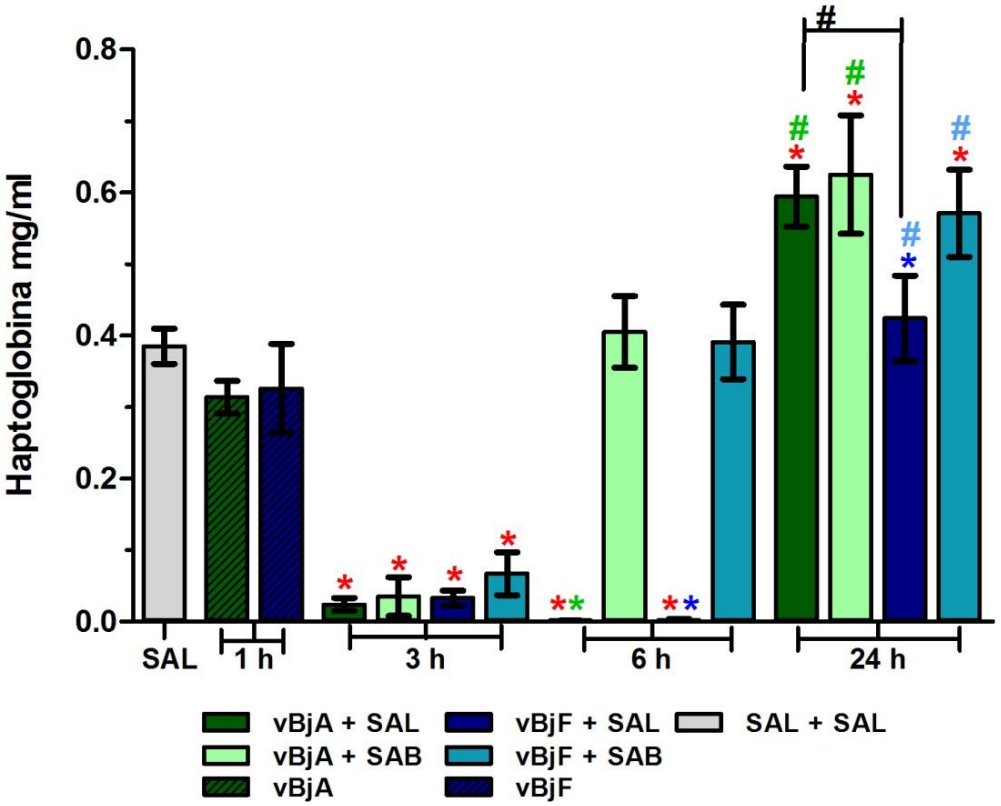

Figura 35 – Dosagem de haptoglobina plasmática de ratos em 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* Diferença estatística significante para p<0,05, *em relação ao grupo controle (SAL + SAL)**;** * entre os grupos vBjA + SAL e vBjA + SAB; * vBjF + SAL e vBjF + SAB; entre # vBjA + SAL / vBjA + SAB e # vBjF + SAL / vBjF + SAB em 24 h em relação a 3 e 6 h; e # entre vBjA+ SAL e vBjF + SAL em 24 hs (p<0,001).

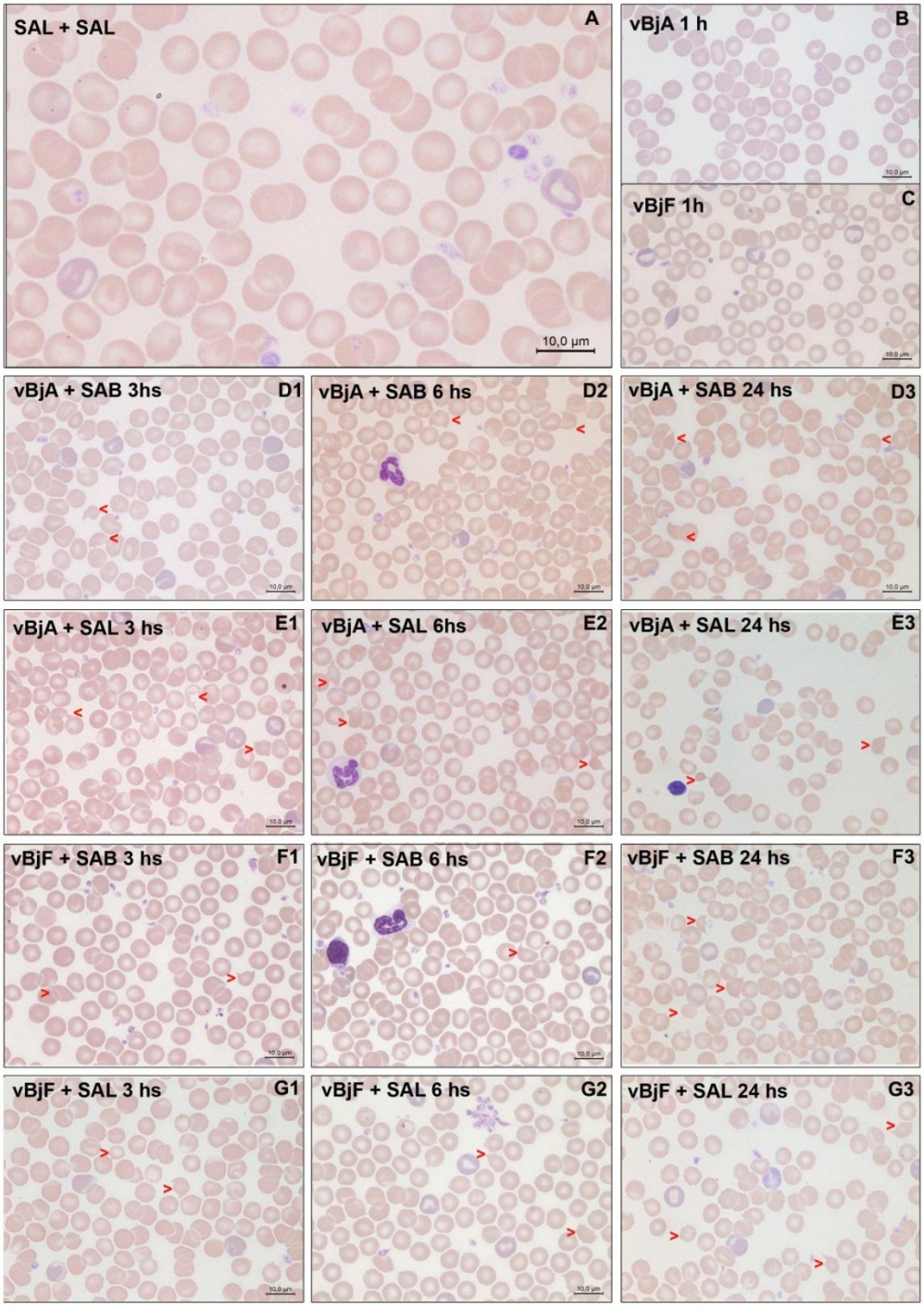

Figura 36 – Esfregaços sanguíneos representando a morfologia das hemácias do sangue de ratos dos grupos experimentais SAL + SAL (A), vBjA (B), vBjF (C), vBjA + SAB (D1-D3), vBjA + SAL (E1-E3), vBjF + SAB (F1-F3) e vBjF + SAL (G1-G3) em 1h (B,C), 3 h (D1-G1), 6 h (D2-G2) e 24 h (D3-G3) após a inoculação *s.c.* do veneno de *B. jararaca* adultas e filhotes (1,6 mg/kg), e tratamento com solução salina ou soro antibotrópico *i.v.* As setas indicam a presença de esquizócitos em todos os grupos inoculados com os venenos, mas predominantemente em vBjA + SAL e vBjF + SAL em 3h (E1, G1).

4.6. FIBRINA

4.6.1. Análise das alterações morfológicas da fibrina por microscopia eletrônica de varredura:

Os dados a seguir ilustrados (Fig. 37) referem-se a coágulos formados a partir de amostras de plasma dos grupos soroterapia (vBjA + SAB; vBjF + SAB), controle de soroterapia (vBjA + SAL; vBjF + SAL) e controle (SAL + SAL) coletadas no tempo de 6 horas após a inoculação dos venenos de serpentes jararaca filhotes e adultas. As amostras de cada veneno com diferente tratamento (SAB ou SAL) tem quantidade de fibrinogênio plasmático similares (vBjA + SAL: 70 mg/dl; vBjF + SAL: 61 mg/dl ; vBjA + SAB: 150 mg/dl; vBjF + SAB: 142 mg/dl) enquanto o grupo controle apresenta níveis normais desta proteína (SAL + SAL: 230 mg/dl). Foram feitas imagens em aumentos de 5.000 e 10.000 vezes. Os resultados indicam diferenças na formação da rede de fibrina decorrentes da variação na quantidade de fibrinogênio de cada amostra, mas também podem ser observadas possíveis modificações na estrutura e conformação da rede nos animais envenenados (Fig. 37: C1 - C2; E1 - E2) em relação ao controle (Fig. 37: A1-A2), que são revertidas com o tratamento com SAB (Fig. 37: B1-B2; D1-D2). Mesmo assim, as amostras de animais envenenado e tratados ainda apresentam alterações na estrutura da fibrina, quando comparamos com a imagem do controle em aumento de 5000 x (setas Fig. 37: A1), onde fica evidenciado a presença de pequenos poros que se encontram praticamente ausentes nas amostras de SAB (Fig. 37: B1; D1). Além disso, podem-se notar diferenças na estrutura da fibrina dos animais inoculados com veneno de adultos em relação àqueles inoculados com veneno de filhote, que ficam mais evidentes nas amostras não tratadas com SAB (Fig. 37: C1 - C2; E1 - E2), apesar da quantidade de fibrinogênio de ambas ser similar. Na amostra inoculada com veneno de filhote, as fibras são mais grossas, porém mais escassas (Fig. 37: E1 - E2), enquanto na de veneno de adultos, o coágulo é um pouco mais denso, mas as fibras tem estrutura mais fina. Por se tratar de resultados preliminares, são necessários mais experimentos para uma análise mais completa deste processo.

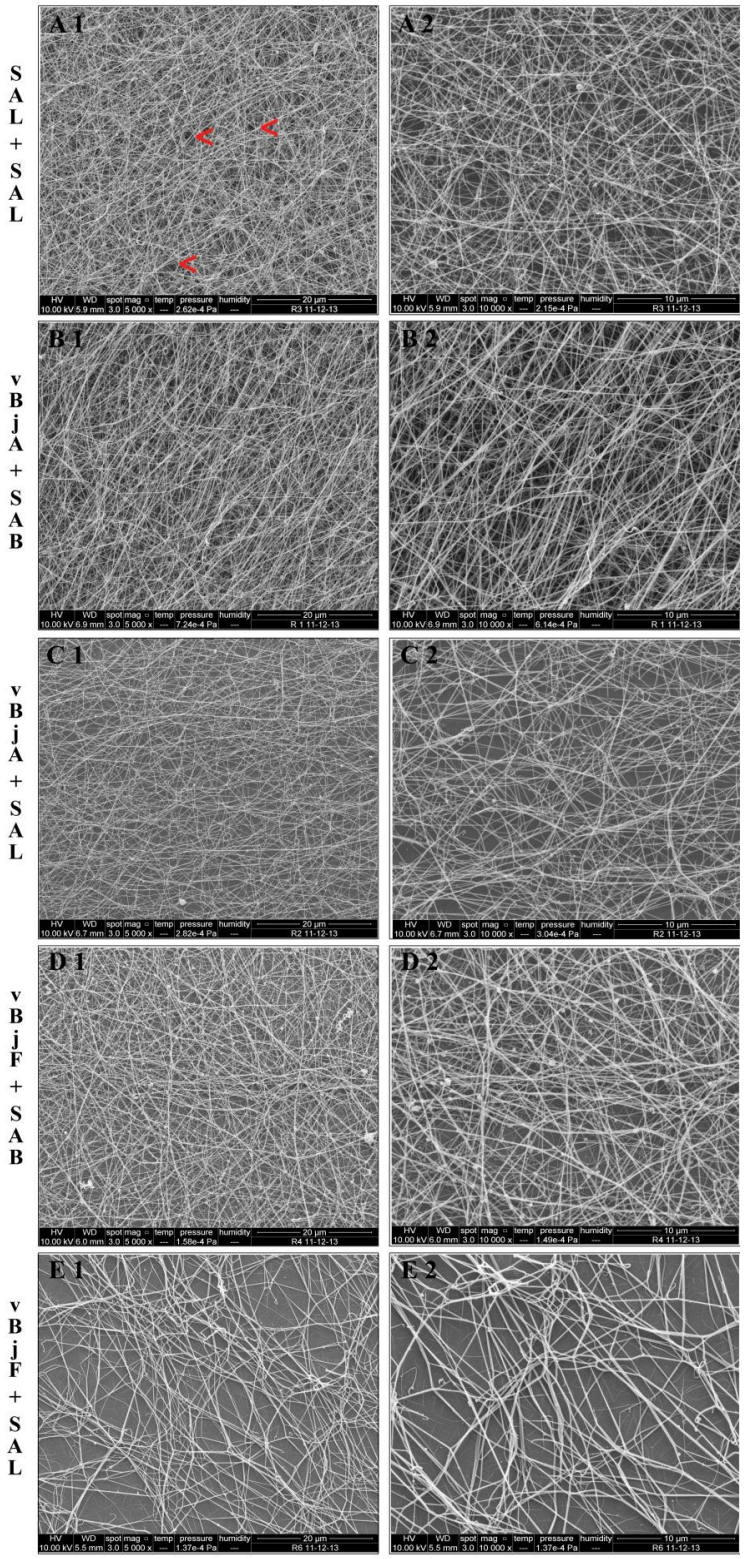

Figura 37 (A1-E2) - Rede de fibrina de amostras de PPP analisadas ao MEV de ratos inoculados com veneno de *B. jararaca* filhotes (D1-D2; E1-E2) e adultas (B1-B2; C1-C2) e tratados com SAB (B1-B2; D1-D2) ou SAL (C1-C2; E1-E2), e ratos controle (SAL + SAL), em aumentos de 5.000 e 10.000x.

5. Discussão

Os nossos resultados demonstraram que apesar das variações ontogenéticas presentes no veneno de serpentes *B.jararaca* filhotes, não foram observadas grandes diferenças no mecanismo do envenenamento, bem como na resposta ao tratamento em relação ao veneno de serpentes adultas.

Assim, pelos experimentos de tromboelastometria, observou-se que a inoculação *s.c.* em ratos, tanto do *pool* de serpentes adultas quando de filhotes, causou grande alteração no processo de coagulação. No ensaio de NATEM, o CT encontra-se normalmente mais prolongado do que nos outros ensaios, já que não foi adicionado nenhum tipo de ativador e a coagulação foi iniciada pelo sistema de contato. Deste modo, a progressão de formação do coágulo foi mais lenta, mesmo nos animais controle. Nos ensaios de NATEM e INTEM, foi observado um prolongamento significativo do CT do grupo inoculado com veneno de serpentes adultas em 6 horas, mas não no dos animais inoculados com veneno de filhotes (Fig. 14 A, E). Além disso, o efeito no grupo vBjF + SAL foi tardio, só aparecendo no tempo de 24 horas (Fig. 14 B, F), quando os animais do grupo vBjA + SAL já apresentavam CT praticamente normal. O CT é indicativo da velocidade de formação da fibrina, e um CT prolongado indica deficiência de fatores ou presença de inibidores da coagulação (anticoagulantes)(112). Com a geração de trombina, são acionados mecanismos de anticoagulação que incluem, por exemplo, a inibição da trombina pela antitrombina III (complexo trombina-antitrombina III), e a inativação proteolítica dos fatores Va e VIIIa pela proteína C ativada, via formação do complexo trombina-trombomodulina-proteína C (93, 126). Porém, apenas a ativação do processo de anticoagulação não é suficiente para explicar porque o prolongamento do CT ocorreu apenas no grupo vBjA + SAL em 6 horas. Assim, este resultado poderia indicar que houve um consumo dos fatores VIII e V da via intrínseca, por ativadores de proteína C, FV e/ou FVIII, presentes no veneno de *B. jararaca* adultas. Já foram descritos alguns ativadores da proteína C para venenos de *B. moojeni* e *B. pradoi* (127), de ativadores de fator V e fator VIII para *B. atrox* (128, 129), e de fator VIII para *B. jararacussu* (130). No entanto, ainda não foram descritos ativadores de FV e FVIII para *B. jararaca*, e também vale lembrar que em trabalho de Antunes e colaboradores (58) foi observado que a ativação *in vitro* da proteína C humana pelo veneno de *B. jararaca* filhotes foi 40 vezes maior que pelo veneno de serpentes adultas. No veneno de *B. jararaca*, é bem descrita a inibição competitiva da

trombina pela botrojaracina, uma lectina do tipo C, que influencia na ativação do fator V (47, 49). Na análise do transcriptoma da glândula de veneno de serpentes *B. jararaca* adultas e filhotes, Zelanis e colaboradores observaram diferenças quantitativas e um maior grau de complexidade no veneno de serpentes adultas com relação a peptídeos potenciadores de bradicinina, serinoproteases, e também lectinas do tipo C (131). Assim, é provável que a botrojaracina exista em menor quantidade no veneno de filhotes de *B. jararaca*, ou mesmo, que ainda não tenha sido transcrita nesse estágio de desenvolvimento. Portanto, nas amostras de vBjF + SAL, a via intrínseca foi ativada, mas o consumo de fatores de coagulação se deu de maneira mais lenta, com os efeitos aparecendo tardiamente. Adicionalmente, vale ressaltar que o ensaio de INTEM é bastante sensível para alterações por inibidores de trombina (112).

Já em relação ao ensaio de EXTEM, os dois venenos se comportaram de maneira similar em relação ao CT. O prolongamento observado se deve ao consumo dos fatores II e X, após a ativação com reagente específico para análise da via extrínseca (fator tissular). Após uma lesão vascular, o fator X se transforma em X ativado (FXa) pela ação do complexo enzimático formado pelo fator tissular e fator VII ativado (FVIIa), que também ativa o fator IX na via intrínseca, formando um complexo com o fator VIIIa, que potencializa a ativação do fator X (Fig. 5). O FXa então forma um complexo com o fator V ativado (FVa), que catalisa a conversão da protrombina (FII) em trombina (20). Os ativadores de Fatores II e X do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* são metaloproteinases com atividade proteolítica, que agem diretamente sobre os respectivos fatores, catalisando a formação de trombina (FIIa) e FXa. Este efeito é letal para as presas destas serpentes, uma vez que a quantidade do veneno inoculado é normalmente suficiente para ocasionar um quadro de coagulação intravascular maciça (CIM). Já nos humanos, a quantidade de veneno inoculado acaba sendo pequena em relação ao tamanho do corpo, e casos de CIM são raros, ocorrendo em condições muito específicas de quantidade de veneno inoculado e local da picada (52). A inoculação do veneno de serpentes *Bothrops* em humanos acarreta então em um consumo progressivo dos fatores de coagulação II, X, e fibrinogênio, pelo efeito combinado da ativação de fatores, presença de inibidores do veneno, e da ativação da fibrinólise (31, 132)

Além das alterações no CT, observou-se também um prolongamento no tempo do CFT em 6 horas, em todos os ensaios (Fig. 15, Tab. 1), no grupo vBjF + SAL, e especialmente no grupo vBjA + SAL, o qual não foi possível a definição e análise

estatística deste parâmetro pois parte das amostras foram consideradas como incoaguláveis pelo software de análise. O CFT é um parâmetro influenciado pelo número de plaquetas, pela interação destas com o fibrinogênio, e pela quantidade e capacidade de polimerização do fibrinogênio (112). Como foi descrito anteriormente, o CT do grupo vBjA + SAL encontrava-se bastante alterado nos ensaios de NATEM, EXTEM e INTEM. Esta alteração, juntamente com a quantidade de plaquetas e de fibrinogênio e (Fig. 21, 28), influenciaram diretamente a velocidade de formação do coágulo deste grupo em 6 horas. No grupo vBjF + SAL, o CFT também estava bastante alterado, mas não tanto quanto no grupo vBjA + SAL, apesar da quantidade de fibrinogênio de ambos os grupos em 6 horas ser praticamente a mesma (Fig. 28). O ensaio que melhor elucida a contribuição do fibrinogênio para a formação do coágulo e a qualidade da fibrina formada é o FIBTEM, já que a ação das plaquetas se encontra totalmente inibida (112) (Tab. 1). Neste ensaio é notável que em 6 horas, não só o CFT, mas também o CT e ângulo alfa dos dois grupos tratados com salina foram considerados incoaguláveis pelo software de análise. Assim, o CFT nos ensaios de NATEM, EXTEM e INTEM no grupo vBjF + SAL, deve ter sido influenciado positivamente pelas plaquetas, levando-se em consideração que estas estão em maior quantidade nesse grupo que em vBjA + SAL (Fig. 21 A).

Adicionalmente, é sabido que a ativação do fator X pelo fator IXa da via intrínseca acaba por formar muito mais FXa e, consequentemente, mais trombina, que a ativação deste pela via extrínseca (93). Assim, é interessante ressaltar que a ativação tardia da via intrínseca, observada pelo CT do ensaio de INTEM (Fig. 14), não parece ter influenciado na geração de trombina e consequentemente no consumo de fibrinogênio plasmático do grupo vBjF + SAL (Fig. 28), pois aparentemente houve uma compensação pela ativação da via extrínseca, cujos ativadores são justamente os de fator II e FX, que se encontram em maior quantidade no veneno de filhotes.

As alterações no CT e CFT dos grupos vBjA + SAL e vBjF + SAL influenciaram a abertura do ângulo alfa. Em 6 horas, o tamanho do ângulo foi similar para ambos os grupos, porém foi observada uma maior variação no grupo vBjA + SAL, principalmente no ensaio de EXTEM. Esta variação é decorrente da maior alteração no CT e principalmente do CFT, uma vez que parte das amostras foi considerada incoagulável, e não foram gerados dados precisos sobre a abertura do ângulo. Este fato também ocorreu nos ensaios de NATEM e INTEM, porém, em um menor número de amostras, e nas

amostras restantes não houve tanta variação no valor do ângulo, implicando em dados mais homogêneos. Assim como ocorreu para o ângulo alfa, foram observados valores de amplitude semelhantes no MCF para vBjA + SAL e vBjF + SAL. Em 6 horas, os valores de amplitude de ambos os grupos ficaram abaixo de 40 mm, em todos os ensaios, e no FIBTEM todas as amostras de vBjA + SAL e a maior parte das amostras de vBjF + SAL ficaram incoaguláveis. Como o CFT, o MCF é um parâmetro influenciado pelo número de plaquetas, pela interação destas com o fibrinogênio, mas principalmente pela quantidade e capacidade de polimerização do fibrinogênio (112). Assim, a quantidade de fibrinogênio de ambos os grupos em 6 horas (Fig. 28) influenciou diretamente esse parâmetro. Adicionalmente, em 24 horas foi observado processo de fibrinólise precoce no ensaio de EXTEM, tanto para vBjA + SAL, quanto vBjF + SAL (Fig. 13), que pode ter influenciado na amplitude do MCF, cujos valores permaneceram próximos a 40 mm (Fig. 17).

Com relação ao tratamento com SAB, foi observado o retorno para valores normais em praticamente todos os parâmetros dos ensaios realizados, de forma bastante similar para ambos os venenos. Como exceção, foi observado no tempo de 24 horas, um prolongamento no parâmetro CT dos grupos vBjA + SAB e vBjF + SAB, nos ensaios de NATEM e INTEM (Fig. 14 B, F). Esta alteração também foi notada no tamanho do ângulo alfa (Fig. 16A), e em uma tendência ao prolongamento do CFT (Fig. 15B), mas apenas no ensaio de NATEM do grupo vBjA + SAB. Nesse tempo, os níveis de fibrinogênio, fator II e Fator X encontravam-se normalizados, para ambos os grupos, porém foi observado um aumento no TAT (Fig. 33 D), além de queda na contagem de plaquetas (Fig. 21 A-B), e tendência a hipofunção nas plaquetas restantes (Fig. 23), predominantemente no grupo inoculado com veneno de serpentes adultas.

Com relação aos fatores da coagulação, os resultados evidenciam a ocorrência de incoagulabilidade sanguínea por consumo de fatores da coagulação, principalmente do fibrinogênio, fator II, fator X e fator de von Willebrand, além de um aumento dos níveis plasmáticos do complexo trombina-antitrombina III (TAT), e dos produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f), tanto no grupo vBjA + SAL, quanto em vBjF + SAL.

O consumo máximo do fator II se deu no tempo 6 horas em todos os grupos inoculados com os venenos, mesmo nos tratados com SAB. Em 24 horas, foi observada

uma tendência de aumento desta proteína em todos os grupos, em resposta ao consumo (Fig. 31). Por outro lado, o fator X já se encontrava significantemente reduzido em 1 hora, sendo que o pico máximo de consumo foi atingido logo neste horário, predominantemente no grupo inoculado com veneno de serpentes adultas (Fig. 32 A). Ao longo do tempo, o fator X continuou a ser consumido, mesmo em 24 horas. A reversão do consumo pelo tratamento com SAB pode ser visualizada a partir de 3 horas para o fator X, e a partir de 6 horas para o fator II. É esperado que um consumo significativo do fator II só seja percebido após certo tempo da inoculação dos venenos, por ser tratar de uma proteína que circula em quantidade muito maior no plasma que o fator X (100 mg/L e 10 mg/L, respectivamente) (133). Assim, em comparação com os experimentos de tromboelastometria, pode-se dizer que estes resultados corroboram o que foi observado para os parâmetros CT e CFT, em 6 e 24 horas.

Dentro do gênero *Bothrops*, já foram descritos ativadores de fator II para as espécies *B. atrox B. neuweid* (134), *B. erythromelas* (135), *B. asper* (136), *B. insularis* (137) e *B. cotiara* (138). Para *B. jararaca*, foi descrito em 2008 a bothrojaractivase (139). Com relação ao fator X, foi descrito um ativador para a espécie *B. atrox* (140), e descrições parciais para *B. erythromelas* (141) e *B. jararaca* (142).

Em estudo de Zelanis e colaboradores (60), foi observado que os fatores II e X da coagulação foram ativados de forma mais rápida pelo veneno de filhotes de *B. jararaca*, que pelo veneno de adultas. Além disso, as metaloproteinases da classe P-III também são mais abundantes no veneno de filhotes que de adultos. Esta classe de metaloproteinases inclui a maioria dos ativadores de fatores II e X da coagulação (131).

Em experimentos *in vitro* realizados por Antunes e colaboradores (58), foi constatado que o veneno de *B. jararaca* (adultas e filhotes) possui uma maior atividade coagulante sobre o plasma humano que sobre o plasma de ratos, e que para ambos os plasmas, o veneno de filhotes é mais coagulante que o de adultas. Além disso, em experimento de neutralização da ação dos dois venenos, observou-se que o SAB reconheceu de maneira menos efetiva as proteínas do veneno de filhotes, uma vez que este veneno não é incorporado ao *pool* de venenos utilizados para produzir anticorpos neutralizantes em cavalos. Mesmo assim, este soro foi capaz de reconhecer praticamente todos os spots referentes ao veneno de *B. jararaca* filhotes, por *western blotting*.

O fator II circula como um zimógeno inativo, até ser ativado pelo complexo FXa/FVa. Esta ativação acarreta na formação de trombina, uma serinoprotease responsável pela clivagem do fibrinogênio plasmático. A trombina também age como um potente agonista plaquetário, ativando os receptores ativadores de proteólise (PAR-1, PAR-4), e também se ligando a glicoproteína de membrana GPIb (143). Neste trabalho, a quantidade de trombina foi dosada indiretamente, através da formação do complexo trombina-antitrombina III (TAT). Nossos achados apontaram um aumento significativo da quantidade do complexo TAT circulante já em 1 hora, de forma similar para ambos os venenos. Em 3 horas ocorrem os picos máximos da quantidade de TAT para ambos s grupos, sendo que o aumento no grupo vBjF + SAL é muito maior que no grupo vBjA + SAL ($p<0,01$) (Fig. 33 B), o que indica que a indução da geração de trombina pelo veneno de serpentes filhotes foi maior que pelo veneno de adultas. Em 6 horas há uma queda, e ambos os grupos se equiparam. Porém, em 24 horas, os níveis do complexo ainda não abaixaram completamente. O tratamento com SAB manteve os níveis de TAT baixos até o tempo de 6 horas, mas, assim como observado para outros resultados, a quantidade do complexo voltou a aumentar em 24 horas, principalmente no grupo inoculado com veneno de adultos (vBjA + SAB) (Fig. 33 D), indicando que houve ativação da coagulação com geração da trombina intravascular.

Os produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f) resultam da degradação da fibrina pela plasmina, após ativação do processo de fibrinólise. No processo de envenenamento por serpentes *Bothrops*, observa-se que o fibrinogênio plasmático também é clivado por metaloproteases do veneno, como a jararagina (42, 144, 145). Deste modo, os resultados da dosagem de PDF/f (Fig. 29) estão de acordo com o observado para dosagem de fibrinogênio plasmático (Fig. 28), nos quais há um aumento exacerbado dos PDF/f em 3 e 6 horas, em ambos os grupos tratados apenas com salina, ao mesmo tempo em que ocorre o consumo significativo do fibrinogênio. Foi observado também um aumento, mas em menor escala, dos PDF/f dos grupos tratados com SAB, principalmente no grupo vBjA + SAL. Em 24 horas os níveis de PDF/f permanecem relativamente altos nos animais envenenado e tratados com salina, enquanto os de fibrinogênio plasmático permanecem baixos em relação ao controle. Aumentos acentuados nos níveis de PDF/f já eram esperados por conta da ativação da coagulação e consequente ativação secundária da fibrinólise. Ainda não há um ativador de plasminogênio descrito para o veneno de *B. jararaca* que induziria a ativação

primária de fibrinólise. Esses resultados mostram similaridade com o envenenamento humano por serpentes *B. jararaca* adultas, onde Cardoso e colaboradores observaram aumento nos níveis desses fragmentos da ordem de 600 µg/ml, em pacientes tratados com SAB (50).

Com relação ao vWF circulante, foi constatado um consumo significativo desta proteína já em 1 hora, sendo que em 3 horas foram atingidos os níveis mais baixos, tanto no grupo vBjA + SAL, quanto vBjF + SAL. O tratamento com SAB só se mostrou efetivo em reverter o consumo a partir de 6 horas, de forma similar para ambos os grupos. Em 24 horas foi observada diferença na quantidade de vWF entre os grupos vBjF + SAL e vBjA + SAL, sendo que no segundo, houve pouca diferença em relação a quantidade observada no tempo de 6 horas. O consumo de vWF se deve normalmente a sua ligação com as plaquetas ativadas na formação do tampão plaquetário a fim de conter extravasamentos vasculares (93). Com o processo de envenenamento, o vWF se liga as plaquetas ativadas e ao colágeno exposto no local da picada. Além disso, o vWF recém liberado pelas células endoteliais, e o vWF circulante, são processados pela ADMTS 13, e também podem passar por processamento similar por ação de metaloproteinases do veneno, o que resulta em um aumento na quantidade de multímeros de baixo peso molecular (21). O veneno bruto de *B. jararaca* possui diversas metaloproteases em sua composição, como a botropasina, a HF3, a BJ-PI, e a jararagina (146), sendo que esta última tem potencial para clivar tanto o vWF quanto o fibrinogênio plasmático (42, 144).

A ocorrência de hemólise intravascular foi observada em todos os grupos experimentais, principalmente no tempo de 3 horas. O aumento acentuado da hemoglobina plasmática e consumo exacerbado da haptoglobina neste tempo evidenciaram este achado (Fig. 34, 35). A análise dessas duas proteínas em conjunto é interessante uma vez que a haptoglobina tem como função controlar os efeitos tóxicos, e consequentemente evitar danos renais associados à circulação da hemoglobina livre e seus produtos oxidativos (87).

A ocorrência de hemólise nos grupos inoculados com ambos os venenos é evidenciada também pela presença de hemácias anormais circulantes, observadas em esfregaços de sangue (Fig. 36). Sano-Martins e colaboradores observaram a ocorrência de hemólise subclínica em pacientes picados por *B. jararaca* (71), e que este efeito

poderia estar associado à geração de trombina intravascular e fibrina estável. Em estudo de Senise e colaboradores (66, 67), ratos *Wistar* receberam tratamento prévio com varfarina *i.v.*, um cumarínico que causa depleção dos fatores da coagulação dependentes de vitamina K, entre eles os fatores II e X. Após o tratamento, os animais foram inoculados com veneno de *B. jararaca* adultas, na mesma concentração (1,6mg/kg) utilizada nesse trabalho. Como resultados, observou-se um menor consumo de fibrinogênio e ausência de sinais de hemólise intravascular. Assim, a hemólise intravascular decorrente do envenenamento seria decorrente da formação de fibrina estável na circulação, uma vez que as hemácias sofrem um rompimento mecânico ao se chocarem contra as fibras de fibrina (125). Este fato é corroborado pelo aumento da quantidade do complexo TAT e pelo consumo de fibrinogênio circulante, uma vez que estas são medidas indiretas da geração de trombina e da formação de fibrina, respectivamente.

O tratamento com SAB se mostrou efetivo em reverter a hemólise a partir de 6 horas, uma vez que nesse horário se observa uma diminuição significativa da hemoglobina no plasma, tanto do grupo vBjA + SAB quanto vBjF + SAB, bem como um aumento considerável da haptoglobina, enquanto os tratados com salina permaneceram níveis mais baixos. Em 24hs podemos observar que independente do tratamento houve uma recuperação dos níveis de hemoglobina plasmática e haptoglobina. As imagens de esfregaços sanguíneos (Fig. 36) mostram a existência de hemácias anormais no tempo de 3 horas, principalmente nos grupos tratados com salina, mas também nos tratados com SAB. A hemólise decorrente da lise das hemácias é um fenômeno que ocorre no início do processo de envenenamento, logo após a formação dos primeiros filamentos de fibrina estável. Assim, no momento da administração do tratamento com o SAB (1 hora), a ativação da coagulação já havia iniciado e consequentemente a formação da fibrina. Adicionalmente, os níveis quase normalizados de hemoglobina e haptoglobina em 24 horas também sugerem que a hemólise é um evento precoce do envenenamento. Em 24 horas é notável a alteração nos esfregaços dos animais tratados com salina. Neste tempo, as hemácias rompidas ainda permanecem na circulação e há uma diminuição visível no número de hemácias circulantes, já relatado pela análise do hemograma.

Com relação às plaquetas, houve uma queda significativa já em 1 hora de envenenamento, sendo que o pico da trombocitopenia se deu em 3 horas, para ambos os

grupos tratados com salina, mas predominantemente no grupo vBjA + SAL. Em 6 horas, a quantidade de plaquetas circulantes foi similar ao observado em 3 horas, sempre com o grupo vBjF + SAL apresentando valores mais altos que vBjA + SAL. Em 24 horas, foi observado um aumento progressivo na contagem para ambos os grupos, não havendo mais diferença significativa entre eles, o que mostra que os animais estão se recuperando sem tratamento específico. Mesmo assim, a contagem permaneceu ainda abaixo da observada para o grupo controle. O tratamento com SAB recuperou a trombocitopenia já em 3 horas, tanto no grupo vBjA + SAB, quanto vBjF + SAB. Porém, em 6 horas foi iniciada uma queda na quantidade de plaquetas dos grupos tratados com SAB. Em 24 horas, a contagem reduziu tanto que ficou próxima a dos grupos tratados apenas com salina e a dos envenenados por 1 hora.

A função plaquetária foi bastante afetada pelos dois venenos, como demonstraram os experimentos de agregação e adesão (Fig. 23-27). A agregação plaquetária induzida pelo colágeno em PRP foi quase que totalmente inibida, tanto no grupo vBjA + SAL, quanto vBjF + SAL, e em todos os tempos. O mesmo efeito foi observado nos experimentos de adesão (Fig. 24-27). O tratamento com SAB evitou tanto a hipoagregação quanto a inibição da adesão plaquetária já em 3 horas, de forma similar para ambos os grupos tratados. Porém, assim como observado para os experimentos de tromboelastografia, e dosagens de TAT, houve uma reversão do quadro de recuperação 24 horas.

A ocorrência de uma maior quantidade de plaquetas no envenenamento por serpentes *B. jararaca* filhotes em relação ao envenenamento por adultas já foi relatada anteriormente (19, 147). Porém, os motivos desta diferença ainda não foram devidamente esclarecidos. A ativação das plaquetas e recrutamento para o local da lesão acarreta em consumo das plaquetas circulantes. O intenso consumo plaquetário ocasionado pelo envenenamento por *B. jararaca* já foi observado tanto em humanos (19, 50), quanto em modelo animal (29, 56). Até o momento, sabe-se que a ocorrência de trombocitopenia decorrente do envenenamento por serpentes *B. jararaca* envolve não somente a ativação plaquetária pela trombina (56, 143), mas também por metaloproteinases do veneno botrópico (45, 148). Além disso, há a participação da PA-BJ, uma serinoprotease com ação enzimática que atua na agregação plaquetária, hidrolisando os receptores PAR-1 e PAR-4 das plaquetas (20, 33), e da botrocetina como aglutinante plaquetária (20, 144, 149, 150). Os efeitos de hipoagregação e de

inibição da adesão, podem estar relacionados à presença de um inibidor plaquetário, conforme relatado por Santoro e colaboradores (56). Neste trabalho, os pesquisadores incubaram o plasma de pacientes envenenados por *B. jararaca* com plaquetas humanas lavadas e observaram uma inibição da agregação plaquetária. Já a adesão plaquetária pode estar sendo inibida também, pela ação de metaloproteases, como a jararagina, que cliva os multímeros de vWF (45).

Pelo modelo de envenenamento experimental em ratos utilizado neste trabalho, observamos que as diferenças na fisiopatologia do envenenamento por serpentes adultas e filhotes não se mostraram tão evidentes quanto se esperava, com relação ao potencial do veneno de filhotes de *B. jararaca* em ocasionar distúrbios de coagulação mais severos.

Além disso, o tratamento com soro antibotrópico foi igualmente eficiente em normalizar os distúrbios causados pela inoculação dos venenos de serpentes adultas e filhotes, entre 3 e 6 horas após o tratamento. O grupo envenenado e tratado com salina evoluiu progressivamente com um quadro fisiopatológico de envenenamento sistêmico ao longo de 24 horas e alguns parâmetros começaram a mostrar uma recuperação espontânea e lenta, como os níveis de fibrinogênio plasmático, o número de plaquetas, de fatores II e X, entre outros. Contudo, não era esperado que os grupos tratados com SAB voltassem a apresentar alterações em alguns parâmetros no tempo em 24 horas, muito menos que essas alterações ocorressem predominantemente no grupo vBjA + SAB, já que a neutralização da atividade coagulante *in vitro* do veneno de serpentes filhotes requer maior volume de antiveneno que a de adultas (58).

Foi observado nesses grupos que a contagem de plaquetas, bem como as funções de agregação e adesão, sofreram uma redução em 24 horas, após terem normalizado entre 3 e 6 horas de tratamento com SAB. O complexo TAT também apresentou um quadro semelhante, notadamente no grupo vBjA + SAB. No entanto, não houve consumo de fibrinogênio, de fatores II, X e von Willebrand, nem aumento nos níveis de PDF/f .

Em estudo de envenenamento por serpentes *B. jararaca* adultas, não tratados com SAB, Yamashita (92) observou um aumento dos níveis de veneno circulante em 3 horas, tanto em inoculação *i.v.*, quanto s.c. Em 6 horas foi observada uma queda significativa dos níveis, porém, apenas nos animais que foram inoculados pela via *i.v.*.

Assim, os fenômenos que observamos em 24 horas para os animais tratados com SAB indicam que pequenas quantidades do veneno ainda podem estar circulando. A reversão da recuperação parece estar associada à ocorrência de lesão local. É possível que o veneno fique retido na região da lesão, e com o tratamento pelo SAB a vascularização seja retomada, favorecendo o retorno do veneno para a circulação. Esta hipótese é baseada no fato desse fenômeno ocorrer principalmente em envenenamento induzido pelo veneno de serpentes adultas de *B. jararaca*, que como relatado anteriormente, ocasiona uma lesão local mais importante que o envenenamento por serpentes de filhotes. Como a venenemia não foi feita nesse estudo, e não temos a evolução do envenenamento e tratamento por mais de 24 horas, é difícil explicar esses resultados. Esse tipo de quadro normalmente não é observado em envenenamento acidental humano no Brasil, quando o tratamento com antiveneno é adequado. Por outro lado, quando a dose é insuficiente, as manifestações do envenenamento são expressas por alterações da coagulação, como o retorno da incoagulabilidade sanguínea após 6 a 12 horas. Nesse caso, doses adicionais de antiveneno normalmente revertem o processo (50). Por outro lado, também existe a possibilidade da dose do SAB utilizada neste trabalho não ter sido a mais adequada, além das limitações impostas pelo modelo animal, uma vez que existem diferenças fisiológicas com relação à hemostasia de ratos e humanos.

6. Conclusões

Com relação às semelhanças e diferenças do processo de envenenamento experimental, em modelo de rato, por serpentes filhotes e adultas de *Bothrops jararaca*, podemos concluir que a evolução do envenenamento para os dois grupos foi muito semelhante, com ambos apresentando hemólise e coagulopatia de consumo (fibrinogênio e fatores II, X, e vWF).

A formação do complexo TAT decorrente da geração de trombina intravascular foi maior em envenenamento por filhotes, porém, o consumo de plaquetas foi menor do que nos adultos.

O tratamento por SAB recuperou igualmente os dois grupos. Assim, a variação na composição dos venenos, decorrente do estágio ontogenético de desenvolvimento, não reflete em uma diferença acentuada no processo de envenenamento em ratos, de tal forma que para esse modelo o tratamento pode ser igual para os dois grupos.

7. Considerações Finais

O quadro de envenenamento e a recuperação dos distúrbios hemostáticos foram semelhantes no modelo animal utilizado, porém com base nos dados observados neste trabalho, como a geração maior de trombina intravascular no envenenamento por filhotes, recomendamos que as manifestações sistêmicas, e não somente as manifestações locais, sejam levadas em consideração na classificação de casos de envenenamento humano por serpentes do gênero *Bothrops*.

8. Resumo

SENISE, L.V. Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por venenos de serpentes *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antibotrópico. 2014. 140 folhas. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, São Paulo, 2014.

Variações ontogenéticas nas enzimas pró-coagulantes do veneno de *B. jararaca* filhotes (vBjF) tornam este veneno mais coagulante que o de serpentes adultas (vBjA). Além disso, o vBjF não é tão eficientemente neutralizado pelo soro antibotrópico *in vitro*, como o vBjA. Neste trabalho comparamos as alterações hemostáticas induzidas pelos venenos vBjA e vBjF em ratos e avaliamos sua recuperação após o tratamento com soro antibotrópico (SAB), por meio de análises de tromboelastometria, dosagens de fatores de coagulação, e análise de plaquetas. Ratos *Wistar* machos foram inoculados com vBjA e vBjF (1,6 mg/kg , *s.c.)* ou solução salina (controle), e tratados com SAB ou solução salina (100 mL *i.v.*) 1 hora (h), após a inoculação dos venenos. Amostras de sangue de ratos tratados foram coletadas em 1, 3, 6 e 24 h após a injeção para avaliar os níveis de fibrinogênio plasmático, haptoglobina plasmática, hemoglobina plasmática, produtos de degradação de fibrinogênio e fibrina (PDF/f), complexo trombina-antitrombina III (TAT), fator de von Willebrand (vWF), fatores de coagulação II e X , e também para contagem e análise funcional das plaquetas. Para as análises de tromboelastometria, foram coletadas amostras de sangue citratado (recalcificado) e de sangue nativo (sem anticoagulante) em 6 e 24 h após a inoculação e tratamento com solução salina ou SAB. Às amostras de sangue citratado foram adicionados reagentes específicos para analise das vias intrínseca e extrínseca da coagulação. Parâmetros como o tempo de coagulação (CT), o tempo de formação do coágulo (CFT) e ângulo alfa foram adquiridos durante 1 h. Em 3 h a contagem de plaquetas de ratos inoculados com vBjA e vBjF, e também o níveis de fibrinogênio, haptoglobina, FII, FX e vWF caíram abruptamente em relação aos controles, enquanto os de TAT e PDF/f aumentaram. Em 6 h os níveis de fibrinogênio ainda encontravam-se bastante baixos para ambos os venenos. Pela análise de tromboelastometria, notou-se que em 6 h os parâmetros CT, CFT, ângulo alfa permanecem muito alterados em ratos não tratados. Com o tratamento com SAB, todos os parâmetros foram significativamente restaurados, para ambos os grupos envenenados, principalmente em 3 e 6 horas após a inoculação venenos . Assim, apesar das diferenças entre vBjA e vBjF com relação a composição e potencial de neutralização *in vitro*, o tratamento com SAB foi igualmente eficiente na reversão dos distúrbios hemostáticos decorrentes do envenenamento por ambos os venenos.

9. Abstract

SENISE, L.V. Evaluation of the hemostatic disturbances evoked by young and adult *Bothrops jararaca* (Squamata: Viperidae) snake venoms and effectiveness of the treatment with botropic antivenin. 2014. 140 pages. Thesis (Ph.D.). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, São Paulo, 2014.

Ontogenetic variations in the pro-coagulant enzymes of the young *B. jararaca* venom (YBjv) makes it more coagulant than that from adult snakes (ABjv). Moreover, YBjv is not so efficiently neutralized by specific antivenin *in vitro* as ABjv. Herein we compared hemostatic disturbances induced by ABjv and YBjv in rats and assessed their recovery after treatment with botropic antivenin by thromboelastometry, dosages of coagulation factors, and platelet analysis. Male *Wistar* rats were inoculated with ABjv and YBjv (1.6 mg/kg, *s.c*), or saline (control), and treated with botropic antivenin (SAB) or saline (100 µL *i.v.*) 1 hour (h) after venom inoculation. Blood samples of treated rats were collected 1, 3, 6 and 24 h after injection to evaluate plasmatic fibrinogen, plasmatic haptoglobina, plasmatic hemoglobin, fibrin and fibrinogen degradation products (FfDP), thrombin-antithrombin III complex (TAT), von Willebrand factor (vWF), coagulation factors II and X, and also to count and functional analysis on platelets. Thromboelastometry was carried out on citrated (recalcified) and native (without anticoagulant) blood samples, collected 6 and 24 h after injection and treatment with SAB or saline. Citrated samples were mixed with specific reagents to analyze the intrinsic and extrinsic pathways. Parameters as clotting time (CT), clot formation time (CFT) and alpha angle were acquired for 1 h. At 3 h, platelet count of ABjv and YBjv rats and also fibrinogen, haptoglobin, FII, FX and vWF levels fell abruptly in regard to controls, while TAT and FfDP increased. At 6 h the fibrinogen levels still pretty low for both venoms. By thromboelastometry analysis, at 6 h, it was noticed that the CT, CFT, alpha angle remain greatly altered on non-treated rats. With the SAB treatment, all the parameters were significantly restored, for both envenomed groups, especially at 3 and 6 h after the venoms inoculation. Thus, despite differences in composition and *in vitro* neutralization potential among ABjv and YBjv, the treatment with SAB was equally efficient in reversing the hemostatic disturbances caused by both venoms.

10. Referências

1. Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas no Brasil. In: Cardoso J.L.C. FFODS, Wen F.H., Málaque C.M.S., Haddad V. Jr. , editor. Animais Peçonhentos no Brasil. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 33 - 61.

2. Cubas ZS, Silva JCR, L. C-DJ. Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária. São Paulo: Roca; 2007.

3. Franco FL. Origem e Diversidade das Serpentes. In: Cardoso J.L.C. FFODS, Wen F.H., Málaque C.M.S., Haddad V. Jr., editor. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 13-32.

4. Marques OAV, Sazima I. História Natural das serpentes. In: Cardoso J.L.C. FFODS, Wen F.H., Málaque C.M.S., Haddad V. Jr. , editor. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 62-71.

5. Gans C. The feeding mechanism of snakes and its possible evolution American Zoologist. 1961;1:217-27.

6. Pough FH, Heiser JB, Mc Farland WN. A vida dos vertebrados. 2th edition ed. São Paulo: Atheneu Editora; 1999.

7. Markland FS, Jr. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost. 1998;79(3):668-74.

8. Kochva E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. Toxicon. 1987;25(1):65-106.

9. Hutton RA, Warrell DA. Action of snake venom components on the haemostatic system. Blood Rev. 1993;7(3):176-89.

10. Marsh N, Williams V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. Toxicon. 2005;45(8):1171-81.

11. Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo. Rev Ass Med Brasil. 2001;47(1):24-9.

12. Pardal PP, Souza SM, Monteiro MR, Fan HW, Cardoso JL, Franca FO, et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004 Jan;98(1):28-42.

13. Jorge MT, Ribeiro LA. Envenoming by the South American pit viper *Bothrops neuwiedi* Wagler. Ann Trop Med Parasitol. 2000 Oct;94(7):731-4.

14. Pinho FM, Burdmann EA. Fatal cerebral hemorrhage and acute renal failure after young *Bothrops jararacussu* snake bite. Ren Fail. 2001;23(2):269-77.

15. Kouyoumdjian JA, Polizelli C. [Snake bites by *Bothrops moojeni*: correlation of the clinical picture with the snake size]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1989 Mar-Apr;31(2):84-90.

16. Boechat AL, Paiva CS, Franca FO, Dos-Santos MC. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001 Jan-Feb;43(1):7-14.

17. Ribeiro LA, Jorge MT. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1990;32(6):436-42.

18. Ribeiro LA, Jorge MT, Lebrão ML. Prognostic factors for local necrosis in *Bothrops jararaca* (Brazilian pit viper) bites. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95(6):630-4.

19. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrell DA. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. Toxicon. 2008;51(8):1440-8.

20. Sano-Martins IS, Santoro ML. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso J.L.C. FFODS, Wen F.H., Málaque C.M.S., Haddad V. Jr. , editor. Animais Peçonhentos no Brasil. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 289-309.

21. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. Toxicon. 1991;29(8):961-72.

22. Zelanis A, Ventura JdS, Chudzinski-Tavassi AM, Furtado MdFD. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: an ontogenetic approach. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2007 May;145(4):601-9.

23. Furtado MF. Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, an endemic species of pitviper from Brazil. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2005 Jun;141(2):117-23.

24. FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional da Saúde - Ministério da Saúde; 2001. p. 120.

25. Fenwick AM, Gutberlet RL, Jr., Evans JA, Parkinson CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). Zoological Journal of the Linnean Society. 2009;156(3):617-40.

26. Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud GC, Scrocchi GJ. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). Zoologica Scripta. 2012;41(2):109-24.

27. SINAN. Acidente por animais peçonhentos. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - Ministério da Saúde - Brasil; 2013 [20 de março 2014]; Available from: http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def.

28. Ribeiro LA, Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(6):475-80.

29. Yamashita KM, Nogueira TO, Senise LV, Cirillo MC, Goncalves LR, Sano-Martins IS, et al. Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and *Bothrops jararaca* snake venom. J Thromb Haemost. 2011 Oct;9(10):2057-66.

30. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. J Thromb Haemost. 2005 Aug;3(8):1791-9.

31. White J. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):951-67.

32. Nahas L, Kamiguti AS, Barros MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. Thromb Haemost. 1979;41(2):314-28.

33. Serrano SM, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):1115-32.

34. Kini RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):1133-45.

35. Tans G, Rosing J. Snake venom activators of factor X: an overview. Haemostasis. 2001 May-Dec;31(3-6):225-33.

36. Nunes DC, Rodrigues RS, Lucena MN, Cologna CT, Oliveira AC, Hamaguchi A, et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2011 Sep;154(3):226-33.

37. Rucavado A, Soto M, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW, Escalante T, et al. Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. Thromb Haemost. 2001 Apr;85(4):710-5.

38. Markland FS, Jr., Swenson S. Snake venom metalloproteinases. Toxicon. 2013 Feb;62:3-18.

39. Anai K, Sugiki M, Yoshida E, Maruyama M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. Toxicon. 2002 Jan;40(1):63-8.

40. Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. FEBS J. 2008 Jun;275(12):3016-30.

41. Moura-da-Silva AM, Baldo C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. Toxicon. 2012 Sep 1;60(3):280-9.

42. Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. Toxicon. 1996 Jun;34(6):627-42.

43. Gutierrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon. 2009 Dec 1;54(7):976-87.

44. Sano-Martins IS, Santoro ML, Castro SC, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. Thromb Res. 1997 Jul 15;87(2):183-95.

45. Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):1041-9.

46. Santos BF, Serrano SM, Kuliopulos A, Niewiarowski S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. FEBS Lett. 2000 Jul 21;477(3):199-202.

47. Lu Q, Navdaev A, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):1089-98.

48. França FODS, Málaque CMS. Acidente botrópico In: Cardoso J.L.C. FFODS, Wen F.H., Málaque C.M.S., Haddad V. Jr. , editor. Animais Peçonhentos no Brasil. 1ª ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 72-90.

49. Zingali RB, Ferreira MS, Assafim M, Frattani FS, Monteiro RQ. Bothrojaracin, a *Bothrops jararaca* snake venom-derived (pro)thrombin inhibitor, as an anti-thrombotic molecule. Pathophysiol Haemost Thromb. 2005;34(4-5):160-3.

50. Cardoso JL, Fan HW, França FOdS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. Q J Med. 1993;86(5):315-25.

51. Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML, et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). Thromb Haemost. 1990;63(3):449-53.

52. Benvenuti LA, França FOdS, Barbaro KC, Nunes JR, Cardoso JL. Pulmonary haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snakebite: a case report. Toxicon. 2003;42(3):331-4.

53. Amaral CFS, Rezende NAd, Silva OAd, Ribeiro M, Magalhães RA, Reis RJd, et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico Rev Inst Med Trop São Paulo. 1986;28(4):220-7.

54. Mosquera A, Idrovo LA, Tafur A, Del Brutto OH. Stroke following *Bothrops* spp. snakebite. Neurology. 2003;60(10):1577-80.

55. 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. 1986;19(2):199-204.

56. Santoro ML, Sano-Martins IS. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. Thromb Haemost. 2004;92(2):369-83.

57. Ribeiro LA, Albuquerque MJ, de Campos VA, Katz G, Takaoka NY, Lebrão ML, et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. Rev Assoc Med Bras. 1998;44(4):312-8.

58. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult Bothrops jararaca snake venoms. Toxicon. 2010 Dec;56(8):1443-58.

59. Furtado MF, Maruyama M, Kamiguti AS, Antônio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon. 1991;29(2):219-26.

60. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MMT, Furtado MF, Camargo ACM, Ho PL, et al. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome / Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. J Proteome Res. 2010;9:2278-91.

61. Saldarriaga MM, Otero R, Nunez V, Toro MF, Diaz A, Gutierrez JM. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. Toxicon. 2003;42(4):405-11.

62. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon. 1991;29(11):1279-303.

63. Ribeiro LA, Jorge MT. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 1989;44(4):143-5.

64. Málaque CMS, Crespo FG, Novaes CTG, Fan HW, Medeiros CR, França FODS, et al. Intravascular hemolysis in human *Bothrops* envenomation: More than we supposed. VIII Reunião Anual do Instituto Butantan2006. p. 13.

65. Novaes CTG, Málaque CMS, Fan HW, Crespo FG, Medeiros CR, Franca FO, et al., editors. Risk factors associated with acute renal failure in patients bitten by *Bothrops* snake. VIII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan; 2006; São Paulo.

66. Senise LV, Yamashita KM, Santoro ML, editors. Effect of snake venoms on plasma depletet of vitamin K-dependent coagulation factors. XVI World Congress of the international Society onToxinology; 2009; Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil.

67. Senise LV, Yamashita KM, Santoro ML. Involvemet of vitamin K-dependent factors in the pathogenisis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis during *Bothrops jararaca* envenomation. Enviado para publicação em julho 2014. 2014.

68. Jorge MT, Ribeiro LA. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. Rev Assoc Med Bras. 1997;43(1):74-6.

69. Jorge MT, Cardoso JL, Castro SC, Ribeiro L, França FODS, de Almeida ME, et al. A randomized 'blinded' comparison of two doses of antivenom in the treatment of *Bothrops* envenoming in São Paulo, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89(1):111-4.

70. de Morais-Zani K, Grego KF, Tanaka AS, Tanaka-Azevedo AM. Proteomic Analysis of the Ontogenetic Variability in Plasma Composition of Juvenile and Adult *Bothrops jararaca* Snakes. Int J Proteomics. 2013;2013:135709.

71. Sano-Martins IS, Santoro ML, Málaque CMS, Fan HW, Gonçalves LRC, Sousa-e-Silva MCC, et al., editors. Hemostatic disturbances in patients bitten by young and adult *Bothrops jararaca* snakes. XVI World Congress of the international Society onToxinology; 2009; Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil.

72. Janeiro-Cinquini TRF. Variação anual do sistema reprodutor de fêmeas de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). Iheringia sér Zool. 2004;94(3):325-8.

73. Sazima I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: Campbell JA, Brodie ED, editors. Biology of the pitvipers. Texas: Selva; 1992. p. 199-216.

74. Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Rocha MM. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Toxicon. 2006;48(4):401-10.

75. Tambourgi DV, Bizerra AF, Queiroz GP, Ibañez OCM, Santoro ML. Manual prático sobre usos e cuidados éticos de animais de laboratório. 1ª ed. São Paulo: Editora - Secretaria de Saúde São Paulo; 2010.

76. Rosenfed G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudos de diversos fatores. Memórias do Instituto Butantan. 1947;20:315-28.

77. Ratnoff OD, Menzie C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. J Lab Clin Med. 1951;37(2):316-20.

78. Lewis SM, Roper D. Laboratory methods used in the investigation of haemolytic anaemias. In: Lewis SM, Bain BJ, Bates I, editors. Dacie and Lewis - Practical Haematology. 10th ed. New Delhi: Churchill Livingstone; 2006. p. 187-203.

79. Crosby WH, Furth FW. A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine. Blood. 1956 Apr;11(4):380-3.

80. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. J Pharmacol Methods. 1980;3(2):135-58.

81. Jennings LK, White, M.C. Platelet Aggregation. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. San Diego: Elsevier Inc.; 2011. p. 1376.

82. Savion N, Varon D. Impact - R the cone and plate(let) analyzer: testing platelet function and anti-platelet drug response. Pathophysiol Haemost Thromb. 2006;35(1-2):83-8.

83. Varon D, Savion, N. Impact Cone and Plate(let) Analyser In: Michelson AD, editor. Platelets. 2 nd ed. San Diego: Elsevier Inc.; 2011. p. 1376.

84. Di Stasio E, De Cristofaro R. The effect of shear stress on protein conformation: Physical forces operating on biochemical systems: The case of von Willebrand factor. Biophys Chem. 2010 Dec;153(1):1-8.

85. Kordich LC, Avalos JCS, Vidal HO, Guerra CC. Manual de Hemostasia y Trombosis. 2ª ed. Kordich LC, Avalos JCS, Vidal HO, Guerra CC, editors. Buenos Aires: Grupo CLAHT; 1990.

86. Denson KW, Borrett R, Biggs R. The specific Assay of prothrombin using the Taipan snake venom. Br J Haematol. 1971;21(2):219-26.

87. Alayash AI. Haptoglobin: old protein with new functions. Clin Chim Acta. 2011 Mar 18;412(7-8):493-8.

88. Lenting PJ, Pegon JN, Groot E, de Groot PG. Regulation of von Willebrand factor-platelet interactions. Thromb Haemost. 2010 Sep;104(3):449-55.

89. Williams WJ, Beutler, E., Erslev, A.J., Rundles, R.W. . Hematology. New York: McGraw Hill Book Company; 1972.

90. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. Blood Rev. 2007 May;21(3):131-42.

91. Moresco RN, Vargas LC, Voegeli CF, Santos RC. D-dimer and its relationship to fibrinogen/fibrin degradation products (FDPs) in disorders associated with activation of coagulation or fibrinolytic systems. J Clin Lab Anal. 2003;17(3):77-9.

92. Yamashita KM. Patogênse dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

93. Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5º ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006.

94. Raber MN. Coagulation tests. In: Walter HK, Hall HD, Hurst JW, editors. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3º ed. Boston: Butterworths; 1990.

95. Bates SM, Weitz JI. Coagulation assays. Circulation. 2005 Jul 26;112(4):e53-60.

96. Tripodi A. Prothrombin time international normalized ratio monitoring by self-testing. Curr Opin Hematol. 2004 May;11(3):141-5.

97. Morrissey J, Mutch NJ. Tissue Factor Structure and Function. In: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, editors. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5º ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006. p. 91-106.

98. Dambisya YM, Lee TL, Gopalakrishnakone P. Action of Calloselasma rhodostoma (Malayan pit viper) venom on human blood coagulation and fibrinolysis using computerized thromboelastography (CTEG). Toxicon. 1994 Dec;32(12):1619-26.

99. Martini WZ, Cortez DS, Dubick MA, Park MS, Holcomb JB. Thrombelastography is better than PT, aPTT, and activated clotting time in detecting clinically relevant clotting abnormalities after hypothermia, hemorrhagic shock and resuscitation in pigs. J Trauma. 2008 Sep;65(3):535-43.

100. Pongpit J, Limpawittayakul P, Juntiang J, Akkawat B, Rojnuckarin P. The role of prothrombin time (PT) in evaluating green pit viper (Cryptelytrops sp) bitten patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012 Jul;106(7):415-8.

101. Lee RI, White PD. A clinical study of the coagulation time of blood. The American Journal of the Medical Sciences. 1913;145:495.

102. Rugeri L, Levrat A, David JS, Delecroix E, Floccard B, Gros A, et al. Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography. J Thromb Haemost. 2007 Feb;5(2):289-95.

103. McCrath DJ, Cerboni E, Frumento RJ, Hirsh AL, Bennett-Guerrero E. Thromboelastography maximum amplitude predicts postoperative thrombotic complications including myocardial infarction. Anesth Analg. 2005 Jun;100(6):1576-83.

104. Abrahams JM, Torchia MB, McGarvey M, Putt M, Baranov D, Sinson GP. Perioperative assessment of coagulability in neurosurgical patients using thromboelastography. Surg Neurol. 2002 Jul;58(1):5-11; discussion -2.

105. Theusinger OM, Schroder CM, Eismon J, Emmert MY, Seifert B, Spahn DR, et al. The influence of laboratory coagulation tests and clotting factor levels on Rotation Thromboelastometry (ROTEM(R)) during major surgery with hemorrhage. Anesth Analg. 2013 Aug;117(2):314-21.

106. Lang T, Bauters A, Braun SL, Potzsch B, von Pape KW, Kolde HJ, et al. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. Blood Coagul Fibrinolysis. 2005 Jun;16(4):301-10.

107. Sillesen M, Johansson PI, Rasmussen LS, Jin G, Jepsen CH, Imam A, et al. Fresh frozen plasma resuscitation attenuates platelet dysfunction compared with normal saline in a large animal model of multisystem trauma. J Trauma Acute Care Surg. 2014 Apr;76(4):998-1007.

108. McMichael MA, Smith SA, Galligan A, Swanson KS. In vitro hypercoagulability on whole blood thromboelastometry associated with in vivo reduction of circulating red cell mass in dogs. Vet Clin Pathol. 2014 Mar 3.

109. Dambisya YM, Lee TL, Gopalakrishnakone P. Anticoagulant effects of Pseudechis australis (Australian king brown snake) venom on human blood: a computerized thromboelastography study. Toxicon. 1995 Oct;33(10):1378-82.

110. Vasconcelos CML. Estudo da peçonha de *Bothrops erythromelas*: caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 1996.

111. Mallett SV, Cox DJ. Thrombelastography. Br J Anaesth. 1992 Sep;69(3):307-13.

112. Pentapharm. ROTEM System: Whole blood Haemostasis System using Thromboelastometry - User Manual. In: GmbH P, editor. Munique: Pentapharm GmbH; 2006.

113. Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. Clin Lab Haematol. 2005 Apr;27(2):81-90.

114. Hartert H. Blutgerninnungstudien mit der Thrombelastographic, Einen Neven Untersuchingsver Fahren. Klin Wochenschr. 1948 Oct 1;26(37-38):577-83.

115. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost. 2001 Jun;85(6):958-65.

116. Muller F, Renne T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. Curr Opin Hematol. 2008 Sep;15(5):516-21.

117. Brainard BM, Abed JM, Koenig A. The effects of cytochalasin D and abciximab on hemostasis in canine whole blood assessed by thromboelastography and the PFA-100(R) platelet function analyzer system. J Vet Diagn Invest. 2011;23(4):698-703.

118. Pretorius E, Humphries P, Ekpo OE, Smit E, van der Merwe CF. Comparative ultrastructural analyses of mouse, rabbit, and human platelets and fibrin networks. Microsc Res Tech. 2007 Sep;70(9):823-7.

119. Pretorius E, Vieira WA, Oberholzer HM, Auer REJ. Comparative Scanning Electron Microscopy of Platelets and Fibrin Networks of Human and Differents Animals. Int J Morphol 2009;27(1):69-76.

120. Jendrassik L, Grof P. Vereinfachte photometrische methoden zur bestimmung des blutbilirubins. Biochem Z. 1938;297:81-9.

121. Vinholt PJ, Hvas AM, Nybo M. An overview of platelet indices and methods for evaluating platelet function in thrombocytopenic patients. Eur J Haematol. 2014 Jan 9.

122. Cetin M, Bakirci EM, Baysal E, Tasolar H, Balli M, Cakici M, et al. Increased Platelet Distribution Width Is Associated With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Thrombolysis Failure. Angiology. 2014 Feb 12.

123. Vagdatli E, Gounari E, Lazaridou E, Katsibourlia E, Tsikopoulou F, Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. Hippokratia. 2010 Jan;14(1):28-32.

124. Reinhart WH. Fibrinogen--marker or mediator of vascular disease? Vasc Med. 2003;8(3):211-6.

125. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Wintrobe´s Clinical Hematology. 10ª ed. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999.

126. Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO. Control of coagulation reactions. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. Williams Hematology. 7º ed. New York: McGraw-Hill; 2007.

127. Stocker K, Fischer H, Meier J, Brogli M, Svendsen L. Protein C activators in snake venoms. Behring Inst Mitt. 1986 Feb(79):37-47.

128. Kirby EP, Niewiarowski S, Stocker K, Kettner C, Shaw E, Brudzynski TM. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 1. Purification and characterization of the enzyme. Biochemistry. 1979 Aug 7;18(16):3564-70.

129. Niewiarowski S, Kirby EP, Brudzynski TM, Stocker K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. Biochemistry. 1979 Aug 7;18(16):3570-7.

130. Hill-Eubanks DC, Parker CG, Lollar P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Sep;86(17):6508-12.

131. Zelanis A, Andrade-Silva D, Rocha MM, Furtado MF, Serrano SM, Junqueira-de-Azevedo IL, et al. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(3):e1554.

132. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon. 1998;36(12):1749-800.

133. Hoffbrand V, Moss P. Platelets, Blood coagulation and Haemostasis. Essencial hematology. 6º ed: Wiley-Blackwell; 2011. p. 314-29.

134. Govers-Riemslag JW, Knapen MJ, Tans G, Zwaal RF, Rosing J. Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwiedi*. Biochim Biophys Acta. 1987 Dec 18;916(3):388-401.

135. Silva MB, Schattner M, Ramos CR, Junqueira-de-Azevedo IL, Guarnieri MC, Lazzari MA, et al. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. Biochem J. 2003 Jan 1;369(Pt 1):129-39.

136. Loria GD, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW, Alape A, et al. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. Arch Biochem Biophys. 2003 Oct 1;418(1):13-24.

137. Modesto JC, Junqueira-de-Azevedo IL, Neves-Ferreira AG, Fritzen M, Oliva ML, Ho PL, et al. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. Biol Chem. 2005 Jun;386(6):589-600.

138. Senis YA, Kim PY, Fuller GL, Garcia A, Prabhakar S, Wilkinson MC, et al. Isolation and characterization of cotiaractivase, a novel low molecular weight prothrombin activator from the venom of *Bothrops cotiara*. Biochim Biophys Acta. 2006 May;1764(5):863-71.

139. Berger M, Pinto AF, Guimaraes JA. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon. 2008 Mar 15;51(4):488-501.

140. Hofmann H, Bon C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox.* 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. Biochemistry. 1987 Feb 10;26(3):772-80.

141. Maruyama M, Kamiguti AS, Tomy SC, Antonio LC, Sugiki M, Mihara H. Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. Ann Trop Med Parasitol. 1992 Oct;86(5):549-56.

142. Furukawa Y, Hayashi K. Factor X converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon. 1977;15(2):97-105.

143. Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO. Platelet Morphology, Biochemistry, and Function: Overview. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. Williams Hematology. 7º ed. New york: McGraw-Hill; 2007.

144. Matsui T, Hamako J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):1075-87.

145. Kamiguti AS, Slupsky JR, Zuzel M, Hay CR. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of Bothrops jararaca. Thromb Haemost. 1994 Aug;72(2):244-9.

146. Oliveira AK, Paes Leme AF, Asega AF, Camargo AC, Fox JW, Serrano SM. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. Thromb Haemost. 2010 Sep;104(3):485-97.

147. Kamiguti AS. Atividades Coagulante, Inflamatória e Proteolíticas dos venenos de *Bothrops jararaca* Recém-Nascida e Adulta. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1988.

148. Cidade DA, Simao TA, Davila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, et al. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. Toxicon. 2006 Sep 15;48(4):437-61.

149. Andrews RK, Booth WJ, Gorman JJ, Castaldi PA, Berndt MC. Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. Biochemistry. 1989 Oct 17;28(21):8317-26.

150. Sanders WE, Read MS, Reddick RL, Garris JB, Brinkhous KM. Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin. An animal model. Lab Invest. 1988 Oct;59(4):443-52.