

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**OFIDISMO NO ESTADO DE PERNAMBUCO: UMA ABORDAGEM
EPIDEMIOLÓGICA HISTÓRICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA
METALOPROTEASE DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE VIPERÍDEOS SUL
AMERICANOS**

Juliana Mendes Correia

Recife – PE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**OFIDISMO NO ESTADO DE PERNAMBUCO: UMA ABORDAGEM
EPIDEMIOLÓGICA HISTÓRICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA
METALOPROTEASE DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE VIPERÍDEOS SUL
AMERICANOS**

Tese de doutoramento apresentada em
qualificação como parte dos requisitos necessários
para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Biológicas.

Juliana Mendes Correia

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Gandhi Rádis Baptista

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Recife – PE
2011

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Correia, Juliana Mendes

Ofidismo no Estado de Pernambuco: uma abordagem epidemiológica histórica e caracterização molecular de uma metaloprotease da glândula de peçonha de viperídeos sul americanos / Juliana Mendes Correia. – Recife: O Autor, 2011.

164 folhas: il.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadores: Gandhi Rádis Baptista; Luiz Carlos Alves

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Serpentes 2. Cobra venenosa - Veneno I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Baptista, Gandhi Rádis (coorient.) III. Alves, Luiz Carlos (Coorient.) IV. Título.

597.96

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-092

Juliana Mendes Correia

**OFIDISMO NO ESTADO DE PERNAMBUCO: UMA ABORDAGEM
EPIDEMIOLÓGICA HISTÓRICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA
METALOPROTEASE DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE VIPERÍDEOS SUL
AMERICANOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título
de Doutor, pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

APROVADO:03/03/2011

Banca Examinadora:

1. Dr. José Luiz de Filho (Universidade Federal de Pernambuco)

2. Dra. Maria Elizabeth Cavalcanti Chaves (Universidade Federal de Pernambuco)

3. Dra. Danyelly Brunaska (Universidade Federal de Pernambuco)

1. Dr. Paulo Eleutério (Universidade Federal Rural Pernambuco)

4. Dra. Rosângela Frade (Universidade Federal de Pernambuco)

À Deus,

À minha mãe, Marlene e tia, Maria José

Aos meus filhos Vitor, Fábio e Vitória

À Diego

As minhas irmãs e sobrinhos, Pollyana, Tatiana, Mirella, Miguel e embrião

À Roberto “in memoriam”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

“Senhor a ti toda Honra e toda Glória!”

À minha família por todos os momentos, amo vocês!

Mãe (Marlene) obrigada por tudo, minha grande guerreira!

Tia (Maria José) por todo apoio e estrutura, meu exemplo!

Meus filhos amados e queridos (Vitor, Fábio e Vitória) é por vocês e pra vocês todo o meu esforço, amados da minh’Alma! Obrigada meu Deus!

Minhas queridas irmãs, como é maravilhoso saber que vocês existem e estão ao meu lado!

Ao meu esposo, Diego, pelo amor que temos um ao outro!

Meus sobrinhos, Mirella, Miguel e você bebezinho em fase de formação, como amo vocês!!! Meus tesourinhos!!

Queridos cunhados e padastro (Ulisses, Jorge e Roberto), pelos momentos de descontração. Vocês são Mara... rrsrs

Aos meus amigos de trabalho!

Muito obrigada José Luiz pelo apoio e confiança!!!

A você Gandhi que mesmo distante foi e será essencial!

Meus queridos Fábio e Luiz obrigada por segurarem essa bomba! Sei que foi e está sendo difícil, mas seremos vitoriosos, pois Deus nunca nos desamparou! E nada como o tempo para que o sentimento fale mais do que palavras!!! Amo vocês!!!

Marília, Rafael, Guilherme, Diana, Ana Paula, Adriana, Esmeralda, Yara, Alessandra, Fernando, Lânia, Thiaguinho, Elverson e Gladston... Gente obrigada por tudo pois sei que o melhor de Deus ainda está por vir!!! E que prevaleçam as melhores lembranças!!

Amigos do Lika e Aggeu, obrigada pelo apoio, companheirismo, orientação, disponibilidade!!!

Galera do BioMol... Cinthia, Nathália, Klecia, Nath Nemo, Conceição, Chirleane, Erick, Monique, Elaine, Eliane, Júlia, Máira, Michel, Nathaly, Milena, Laís, Máira, Lizandra, Carlos, Liane, Dalila, Enfim a todos meu muito obrigada!

Aos meus colegas de turma...

Obrigada pelos momentos!

Em especial a você, Lidy que não é só amiga é também irmã em Cristo!!! Ei eu quero um sobrinho, visse!

Aos meus pesquisadores...

Ô gente como vocês me ajudaram a desarnar... Como é bom trabalhar com vocês...
Pedro, não tenho dúvidas que você chegará a lugares altos, mas ande reto perante ao Senhor.
Escobar, quem te viu e quem te vê, né! Baseada nisso posso até imaginar como te verei!
Me lembro bem como te conheci e hoje vejo o quanto Deus é bom contigo.
Milena, agora mamãe! Estás completa né! rrsrr

Junto a vocês tenho hoje mais uma lição de vida...

“Medo porque pois as horas em que mais errei foram as que mais me ensinaram”

Moraes Moreira

Amigos do LAPTx..

Gente não poderia deixar de agradecer a vocês... Pois são minha história científica. Sei que ainda estou distante de onde quero chegar, mas o que vocês me ensinaram certamente deixou-me mais próxima dos meus objetivos!!!

Miriam que Deus continue te iluminando, pois você nasceu para irradiar o amor de Deus!
Pois eu sei os planos que tenho para vós, diz o Senhor, planos de paz, e não de mal, para vos dar uma esperança e um futuro (Jr 29:11)

Renata, Marliete, Claíne, Milena, Lidiany, Ilca, Escobar, Márcia, Júnior, Thayza, Carla, Eneida, Clara, Chirlane, Lucas... Enfim a todos que fizeram e fazem o LAPTx.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Tereza, obrigada por confiar em mim e em meu trabalho! Pode ter certeza que sempre antes de pensar em mim pensei no programa e em meus orientadores!!!

Adê maravilhosa, o que seria desse programa sem sua competência e dedicação, obrigada por tudo!!!

Aos meus professores que fazem a diferença em nossa formação...

A todos do CEATOX...

Américo, Lucineide, Vilma... Enfim a todos que se doam em prol da vida humana.

Ao CNPq, LIKA e Aggeu por dar suporte a realização desse trabalho.

Obrigada!
Juliana Mendes Correia

*“Eu me deitei e dormi; acordei,
porque o SENHOR me sustentou.”*

Salmos 3

Este projeto foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco e no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com auxílio financeiro do CNPq.

RESUMO

As peçonhas ofídicas são constituídas de enzimas (fosfolipases, fosfodiesterases, fosfomonoesterases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, enzimas proteolíticas das classes serinoproteases e metaloproteases, arginina esterases, 5'-nucleosidases, hialuronidasas e NAD nucleosidasas), de peptídeos (miotoxinas, cardiotoxinas, potenciadores de bradicina e desintegrinas), também cátions metálicos (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn), carboidratos (frequentemente na forma de glicoproteínas), nucleosídeos, aminas biogênicas, lipídeos e aminoácidos livres. Estas enzimas têm despertado interesse devido ao seu potencial biomédico e por serem responsáveis pela maioria dos efeitos tóxicos nos envenenamentos ofídicos, que constituem um problema de saúde pública em todo o Brasil, devido a ocorrência de 20.000 acidentes por ano. O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos na região metropolitana do Recife (RMR) e verificar a ocorrência de genes codificantes de uma metaloprotease indutora de apoptose vascular (VLAIPs) da glândula de peçonha de Viperídeos sul americanos. Para a caracterização do perfil epidemiológico da RMR foram analisados todos os prontuários de atendimento ao acidente ofídico do Centro de Atendimento Toxicológico do Hospital da Restauração (CEATOX-HR), Recife-Pe. Os dados foram analisados com o auxílio do *software Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 14.0. No período de 1992-2009 foram atendidos 821 casos de importância médica, média de 45,6 casos/ano. Os acidentes crotálicos predominaram nas cidades abrangidas pela I Gerência Regional de Saúde (GERES), enquanto os acidentes botrópicos aumentam em frequência nas cidades distantes da Zona da Mata, em regiões áridas. Mais da metade dos casos atendidos no CEATOX-HR foram oriundos de cidades abrangidas por outras GERES. Os casos de óbito se deveram principalmente a fatores como o tempo levado desde o acidente ao atendimento, à distância de deslocamento e a faixa etária, do que pelo gênero de serpente envolvida no acidente. Para a verificação da ocorrência e expressão da(s) VLAIPs foram realizadas as técnicas de clonagem molecular e reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa. Utilizamos um gene calibrador de *Crotalus durissus terrificus* homólogo a VAP1, nomeado crotastatin, e demais genes homólogos VAP1/crotastatin-like da glândula de veneno de *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus cascavella* e *Lachesis muta* foram expressos em diferentes níveis. O batroxstatin, o precursor crotastatin-like de *B. atrox*, é expresso 87 vezes mais que crotastatin-1, de *C. d. cascavella*, e 7.5 vezes mais que lachestatins, de *L. muta*. Além do mais, análises estruturais *in silico* das sequências de aminoácidos indicam que batroxstatin-2, crotastatin and lachestatin-1 and -2 apresentam domínios estruturais e sítio de ligação ao metal iguais aos de VAP1, sendo dessa forma incluídos em um ramo filogenético que compreende as toxinas indutoras de apoptose. Diante o exposto podemos concluir que o gênero *Crotalus* sempre foi responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na RMR e que em seu genoma há expressão de um gene indutor de apoptose vascular como também nos genomas de *Bothrops atrox* e *Lachesis muta* sendo todos expressos em níveis diferentes.

Palavras-Chave: Acidente ofídico; Epidemiologia; Viperídeos da América do Sul; Metaloproteases; Clonagem molecular; PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR).

ABSTRACT

The snake venoms are composed of enzymes (phospholipases, phosphodiesterases, fosfomonoesterases, L-amino acid oxidase, acetylcholinesterase, proteolytic enzymes of serine and metalloprotease classes, arginine esterase, 5'-nucleosidases, hyaluronidases and nucleosidases NAD), peptides (myotoxins, Cardiotoxins, bradykinin-potentiating and disintegrins), also metallic cations (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co and Zn), carbohydrates (often in the form of glycoproteins), nucleosides, biogenic amines, lipids and amino acids . These enzymes have attracted attention because of its potential for biomedical and be responsible for most snakebite poisonings toxic effects, which constitute a public health problem in Brazil, due to the occurrence of 20,000 accidents per year. This study aimed to characterize the epidemiology of snakebites in the metropolitan area of Recife (RMR) and verify the occurrence of genes encoding a vascular apoptosis-inducing metalloprotease (VLAIPs) of the gland of viperid South Americans. To characterize the epidemiological profile of RMR were all analyzed patient records to snakebite Call Center Toxicology, Hospital of the Restoration (CEATOX-HR), Recife-Pe. Data were analyzed using the software Package for the Social Sciences (SPSS) version 14.0. In the period 1992-2009 were treated 821 cases of medical importance, averaging 45.6 cases per year. *Crotalus* accidents predominated in the cities covered by the Regional Health Management I (GERES), while the Bothrops increase in frequency in cities far from the Zona da Mata, in arid regions. More than half the cases treated in CEATOX-HR were from cities covered by other GERES. The death cases were due mainly to factors such as the time taken to care since the accident, the offset distance and age, than by the sort of snake involved in the accident. To verify the occurrence and expression (s) VLAIPs were the techniques of molecular cloning and polymerase chain reaction in real time quantitative. We use a calibrator gene of *Crotalus durissus terrificus* homologous to VAP1 appointed crostastatin, VAP1/crostastatin-like and other homologues of the venom gland of *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus* and *Lachesis muta cascavella* were expressed at different levels. The batroxstatin, the precursor-like crostastatin *B. atrox*, is expressed 87 times more than crostastatin-1, *C. d. cascavella*, and 7.5 times more than lachestatins, *L. muta*. Furthermore, in silico structural analysis of amino acid sequences indicate that batroxstatin-2, and crostastatin lachestatin-1 and -2 domains have structural and metal binding site to the equal of VAP1, thereby being included in a phylogenetic branch that includes toxins induce apoptosis. Given the above we can conclude that the genus *Crotalus* always accounted for the majority of snakebites in the RMR and that its genome is a gene expression induces apoptosis in vascular as well as genomes of *Bothrops atrox* and *Lachesis muta* are all expressed at different levels.

Keywords: Snakebite; Epidemiology; South American pit viper; Metalloprotease; Venom apoptosis-inducing protein; Molecular cloning, Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Corpo alongado das serpentes.....	21
Figura 2: Categorias que distinguem as serpentes quanto ao tipo de dentição.....	22
Figura 3: Fosseta loreal.....	23
Figura 4: <i>Micrurus ibiboboca</i>	27
Figura 5: <i>Micrurus lemniscatus</i>	28
Figura 6: <i>Micrurus coralinus</i>	29
Figura 7: <i>Bothriopsis bilineata</i>	32
Figura 8: <i>Bothrops leucurus</i>	33
Figura 9: <i>Bothropoides lutzii</i>	34
Figura 10: <i>Bothropoides erythromelas</i>	35
Figura 11: <i>Crotalus durissus cascavella</i>	37
Figura 12: <i>Lachesis muta</i>	38
Figura 13: Distribuição dos acidentes ofídicos nos estados da região Nordeste no período de 1999 a 2003. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação.....	41
Figura 14: Percentual de acidentes ofídicos distribuídos por gênero ocorridos no período de 1995 a 1997 nas regiões semi-áridas do agreste e sertão do estado de Pernambuco. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação.	43
Figura 15: Casos de acidente ofídico por gênero ocorridos no estado da Paraíba durante o período de 1995 a 2000.....	44
Figura 16: Percentual de publicações sobre epidemiologia do acidente ofídico, nos últimos 100 anos, distribuídas por regiões brasileiras. Fonte: Bochner & Struchiner (2003).....	46
Figura 17: Classificação estrutural das SVMPs. P: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio Proteinase; domínio metaloproteinase; S: espaçador; Dis: domínio disintegrina; Dis-Like: domínio tipo disintegrina; Cys-Rich: domínio rico em cisteína, Lec: domínio ligante de lectina. Fonte: Fox e Serrano, 2008.....	62
Figura 18: Estrutura tridimensional da VAP1 revela a presença dos domínios Metaloprotease, Disintegrina e Rico em cisteína característico de uma Metaloprotease da Classe PIII (TAKEDA et al. 2006).....	65
Figura 19: Efeito da VAP2 sobre a viabilidade celular. Células tratadas com 1,5 µg/ml de VAP2. Após 48h as células foram observadas ao microscópio, aumento x100. (A) VEC; (B) RSMC-3 células musculares de camundongo; (C) TIG-7 fibroblastos humano. Apoptose em (A) mas não em (B) e (C). fonte (MASUDA et al. 1998).....	66

Figura 20: PCR em tempo real com sonda TaqMan®, (F) Fluoróforo, (Q) Quencher. Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).....71

Figura 21: Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. C_T – Cycle de Threshold. A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detector a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos. Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).....72

APÊNDICE 1

Figura 1: Distribuição dos municípios do estado de Pernambuco quanto às Gerências Regionais de Saúde (GERES).....97

Figura 2: **A)** Subdivisão estadual em regiões climáticas e Região Metropolitana. ► Região Metropolitana, ► Zona da Mata, ► Agreste, ► Sertão e ► São Francisco; **B)** Distribuição dos acidentes elapídicos e laquéticos nos municípios pernambucanos. ► Acidentes elapídicos, ► Acidentes laquéticos e ► Ambos; **C)** Distribuição dos acidentes botrópicos nos municípios pernambucanos. Legenda de acordo com o número de casos por cidade, ► 1-5, ► 6-10 e ► 11-15. **D)** Distribuição dos acidentes crotálicos nos municípios pernambucanos. Legenda de acordo com o número de casos por cidade, ► 1-5, ► 6-10, ► 11-15, ► 16-20, ► 21-30, ► 31-40 e ► 41-50.....103

Figura 3: Sazonalidade de acidentes crotálicos (n= 524) e botrópicos (n= 234) no estado de Pernambuco registrados no CEATOX-HR, no período de 1992 a 2009.....105

APÊNDICE 2

Figure 1: (A) *Lachesis muta* e (B) Points of inoculation of the fangs of *Lachesis* patient's left leg.....129

APÊNDICE 4

Figure 1: Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Crotalus durissus terrificus* VAP like toxin (Crotastatin, Sta) mRNA, partial cds (Gen Bank DQ224420). The gene sequence, corresponding to the mature crotastatin (1266 bp, numbered in the left side of the sequence), codes for a protein of 421 residues with a metalloprotease domain (dark gray box), a disintegrin domain (unlabeled) and the conserved cysteine rich domain (light gray box). The spacer connecting the disintegrin and the CRD is indicated by an underline. The doubled underlined DECD peptide shows the replacement of the typical RGD motif found in most snake venom disintegrins.....98

Figure 2: Schematic strategy for the study of Crotastatin-like polymorphism using real-time PCR. Specific primers, pairs P1/P1' (SVAT-SE1/SVAT-ASRT1) and P2/P2' (SVAT-RTSE2/SVAT-AS2) were synthesized based on the 5'- and 3'-coding region of the Crotastatin gene (Gen Bank DQ224420), which correspond to part of conserved metalloprotease and cysteine rich domains. These primer pairs were used to generate standard melting curves (A). The melting curves for three different pool of Viperidae single-stranded cDNAs were compared: *Bothrops atrox* (Bat), *Crotalus durissus cascavella* (Cdc), and *Lachesis muta* (Lam) (B); The real time-PCR products (RT1 and RT2) corresponding to the amplification products of our strategy were separated in 1.8% agarose gel and visualized with ethidium bromide. The β -actin amplified fragment (AC1 and AC2) was used for gene normalization and comparison (C).....99

Figure 3: Representative amplification (Ct) curves for absolute quantification of crotoastatin-like metalloprotease transcripts in the venom gland of South American pit vipers. Single-stranded cDNAs of venom glands of *B. atrox*, *C.d. cascavella*, and *L. m. rhombeata*, equivalent to 0.08 ng of mRNA, were utilized for qRT-PCR analysis (see methods). In this figure, representative curves of each sample are shown in duplicate. The fluorescence was collected at 494 to 521 nm during the extension phase. The inset represents the amplification curve for the fragment RT1, utilized to calculate the copy number of crotoastatin-like transcripts in each venom gland of the three snake species investigated here.....100

Figure 4: Sequence alignment of VAP1/Crotoastatin-like metalloproteases and their principal structural characteristics. Batroxstatin-1, -2, and -3 (EU733639, EU733640, and EU733641), crotoastatin (ABB42830), crotoastatin-1 (EU733638), and Lachestatin-1 and -2 (EU733631, and EU733642) were aligned with VAP1 (BAB18307) by using the ClustalW2 and Muscle 3.2 algorithms. Cysteine residues are labeled with black boxes, and whenever possible the S-S bonds are indicated by connecting continuous lines. Conserved amino acids are boxed in dark gray, and nonsynonymous mutations are in white boxes. The principal conserved motifs (e.g., the dimerization motif – QDHSK-, and the hADAM HVR), and metal-binding sites (the Ca²⁺-binding sites I, II and III; and the Zn²⁺-binding site) were annotated for comparison, based on the works by Takeda et al. (2006) and Igarashi et al. (2007).....101

Figure 5: Dendrogram of the South American pit viper VAP1/Crotoastatin-like homologues and the best scored Snake Venom Metalloproteases Type-III Mature Toxins (SVMP-III). The dendrogram was inferred as detailed described in methods. The aligned toxins are listed by toxin name, GenBank accession number, and the scientific name of each snake specimen, as follows: ACLD (O42138) *Agkistrodon contortrix laticinctus*; Agkihagin (ABB79955) *Deinagkistrodon acutus*; Asrin (ABH10621) *Austrelaps superbus*; Atrolysin (Q92043) *Crotalus atrox*; Batroxstatin-1 (EU733639) *Bothrops atrox*; Batroxstatin-2 (EU733640) *Bothrops atrox*; Batroxstatin-3 (EU733641) *Bothrops atrox*; Berythraactivase (AAL47169) *Bothrops erythromelas*; Botropasin (AAC61986) *Bothrops jararaca*; Catrocollastatin (AAC59672) *Crotalus atrox*; Cobrin (AAF00693) *Naja naja*; Crotoastatin (ABB42830) *Crotalus durissus terrificus*; Crotoastatin-1 (EU733638) *Crotalus durissus cascavella*; Halysase (AAN39540) *Gloydus halys*; HR1A (BAB92013) *Trimeresurus flavoviridis*; Hv1 (BAB60682) *Trimeresurus flavoviridis*; Jararafibrase (CAA48323) *Bothrops jararaca*; Lachestatin-1 (EU733642) *Lachesis muta rhombeata*; Lachestatin-2 (EU733631) *Lachesis muta rhombeata*; MP-2 (AAX86634) *Bitis arietans*; SVMP-III-1 (CAJ01679) *Echis ocellatus*; SVMP-III-1 (Q8QG88) *Bothrops insularis*; SVMP-III-2 (ABG26979) *Sistrurus catenatus edwardsi*; SVMP-III-3 (ABG26980) *Sistrurus catenatus edwardsi*; SVMP-III-7 (ABG26984) *Sistrurus catenatus edwardsi*; TSV-DM (Q2LD49) *Viridovipera stejnegeri*; VAP-1 (BAB18307) *Crotalus atrox*; VLAIP A (AAX38181) *Macrovipera lebetina*; VLAIP B (AAX38182) *Macrovipera lebetina*. The numbers next to the branches represent the percentage of replicate trees in which the associated toxins clustered together in the bootstrap test.....102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1:** Família e Gêneros de serpentes do Brasil (SBH, 2010).....24
- Tabela 2:** Proteínas de venenos de serpentes ativadoras do sistema hemostático.....48

APÊNDICE 1

- Tabela 1:** Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR no período de 1992 a 2009, de acordo com o tipo de acidente e as GERES de origem dos acidentes. (*NI= não informado).....99
- Tabela 2:** Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR no período de 1992 a 2009, de acordo com o tipo de acidente e as cidades de origem dos acidentes. * NI= não informado. ** C= crotálico, B= botrópico, L= laquético, E= elapídico, n= total de casos/cidade.....100
- Tabela 3:** Frequência e porcentagens anuais de acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR no período de 1992 a 2009, de acordo com o gênero da serpente.....155

APÊNDICE 4

- Table 1:** Values of T_m, C_t, and numbers of copy of crotastatin-like transcripts in the venom glands of *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus cascavella* e *Lachesis muta rhombeata*.....100

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descrição
ADAMs	A Disintegrin and Metalloproteases
Arg-Gli-Asp	Arginina – glicina –ácido aspártico
Bat	<i>Bothrops atrox</i>
Bju	<i>Bothrops jararacussu</i>
Blu	<i>Bothrops Lutz</i>
<i>C.atrox</i>	<i>Crotalus atrox</i>
Cdc	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
cDNA	DNA complementar
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Ct	Threshold cycle
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i> ORI(DE3)	<i>Escherichia coli</i> ORIGAMI (DE3)
EXO I	Exonuclease I
HV1	pProteína indutora de apoptose vascular de <i>Trimeresurus flavoridis</i>
Kb	Kilobases
kDa	kiloDaltons
Lam	<i>Lachesis muta</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
µL	Microlitro
mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteases de matriz extracelular em mamíferos
NCBI	Centro Nacional para Informações Biotecnológicas (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RGD	Arginina-Glicina-Asparagina
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SVAT	Toxinas apoptóticas de veneno de serpentes
SVMPs	Metaloproteases de venenos de serpentes
SVMPs	<i>Snake Venom Metalloprotease</i>
VAP-1 e VAP-2	Proteínas indutoras de apoptose vascular 1 e 2 de <i>Crotalus atrox</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	20
2.1 As Serpentes	20
2.2 Serpentes de Importância Médica de Pernambuco	24
2.2.1 Família Elapidae	26
2.2.1.1 <i>Micrurus ibiboboca</i>	26
2.2.1.2 <i>Micrurus leminiscatus</i>	27
2.2.1.2 <i>Micrurus corallinus</i>	28
2.2.2 Família Viperidae	30
2.2.2.1 Gêneros <i>Bothrops</i> , <i>Bothriopsis</i> e <i>Bothropoides</i>	30
2.2.2.1.1 <i>Bothriopsis bilineata</i>	31
2.2.2.1.2 <i>Bothrops leucurus</i>	33
2.2.2.1.3 <i>Bothropoides lutzii</i>	34
2.2.2.1.4 <i>Bothropoides erythromelas</i>	35
2.2.2.2 Gênero <i>Crotalus</i>	36
2.2.2.2.1 <i>Crotalus durissus cascavella</i>	37
2.2.2.3 Gênero <i>Lachesis</i>	37
2.2.2.3.1 <i>Lachesis muta</i>	38
2.3 Acidentes ofídicos	39
2.4 Peçonhas ofídicas	47
2.4.1 Toxinas Gênero-Específicas	49
2.4.1.1 Família Elapidae	49
2.4.1.1.1 <i>Micrurus ibiboboca</i>	49
2.4.1.1.2 <i>Micrurus leminiscatus</i>	49
2.4.1.2 Família Viperidae	50
2.4.1.2.1 Gêneros <i>Bothrops</i> , <i>Bothriopsis</i> e <i>Bothropoides</i>	50
2.4.1.2.1.1 <i>Bothriopsis bilineata</i>	51
2.4.1.2.1.2 <i>Bothropoides erythromelas</i>	51
2.4.1.2.1.3 <i>Bothrops leucurus</i>	54
2.4.1.2.2 Gênero <i>Lachesis</i>	55
2.4.1.2.2.1 <i>Lachesis muta</i>	55
2.4.1.2.3 Gênero <i>Crotalus</i>	56
2.4.1.2.3 <i>Crotalus durissus cascavella</i>	57
2.4.2 Metalloproteases de peçonhas ofídicas	58
2.4.3 Proteínas indutoras de apoptose vascular (VLAIPs)	64
2.5 A Biologia Molecular	68
2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR)	68
2.6 Referências bibliográficas	73
3. Objetivos	89
Apêndice 1 – Correia, et al., 2011	90
Normas para publicação Toxicon	111
Apêndice 2 – Correia, et al., 2011	123
Normas para publicação J Venom Anim Toxins incl Trop Dis	130
Apêndice 3 – Correia, et al., 2011	132
Normas para publicação J Venom Anim Toxins incl Trop Dis	152
Apêndice 4 – Tavares, N.A; Correia, et al., 2008	154
4. Conclusões	166
5. Anexos	168
6. Atividades complementares	171

1. INTRODUÇÃO

Existe no Brasil uma diversidade de >371 espécies de serpentes distribuídas em 93 gêneros, sendo apenas nove desses gêneros de elevada importância médica: Família Elapidae, gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais-verdadeiras) e Família Viperidae, gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rinocerophis* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus). Estes gêneros reunidos apresentam 55 espécies peçonhentas ($\pm 15\%$ das espécies catalogadas no país) ocorrentes em diferentes regiões do território nacional e que podem provocar envenenamentos sérios com necessidade de intervenções médicas apropriadas de acordo com cada gênero (HERPETOLOGIA, 2009; LIRA-DA-SILVA, 2009).

De acordo com o levantamento nacional dos acidentes ofídicos realizados durante o período de 1993 a 1995, acontecem anualmente em média cerca de 20.000 acidentes no Brasil, sendo 12,7% ocorrentes na Região Nordeste. Os coeficientes de incidência nacional foram em média de 13,5 acidentes/100000 habitantes, sendo a região Nordeste com a menor taxa de incidência em comparação com as demais regiões (6,84/100000 habitantes). Porém, no Nordeste as taxas de mortalidade são elevadas (0,81%), sendo a taxa de letalidade nacional naquele período de 0,45%. Os acidentes botrópicos são os mais evidentes, constituindo 73,1% da totalidade de todos os acidentes ofídicos no Brasil, ou 90,5% dos acidentes ofídicos, considerando apenas os acidentes de importância médica. O período do ano que ocorrem maior número de

acidentes no Nordeste foi de janeiro a maio. As pessoas do sexo masculino são mais acometidas (70%), e o local da picada foi preponderantemente nos membros inferiores (70,8%). A letalidade nacional por gênero de serpentes foi de 1,87% para *Crotalus*, seguido de *Bothrops* (0,31%), *Lachesis* (0,95%) e *Micrurus* (0,36%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

Os efeitos tóxicos nos envenenamentos ofídicos são provenientes das atividades biológicas das enzimas que compõem as peçonhas ofídicas, como fosfolipases, fosfodiesterases, fosfomonoesterases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, enzimas proteolíticas das classes serinoproteases e metaloproteases, arginina esterases, 5'nucleosidases, hialuronidases e NAD nucleosidases. Além das enzimas, estão presentes também peptídeos dos quais merecem destaque as neurotoxinas pré e pós-sinápticas, miotoxinas, cardiotoxinas, potenciadores de bradicina (BPP) e inibidores de agregação plaquetária (desintegrinas). Entretanto, é importante ressaltar que nem todas as peçonhas apresentam esta variedade de componentes (RUSSELL et al. 1997; OUYANG et al. 1992).

As Metaloproteases as peçonhas ofídicas (SVMPs) consistem de uma série de enzimas dependente de zinco que apresentam diferentes massas moleculares. As Proteínas deste grupo estão presentes em grande quantidade em venenos de serpentes da família Viperidae. Porém, trabalhos demonstram a purificação de SVMPs provenientes de venenos de algumas espécies de serpentes da família Elapidae e Colubridae (ASSAKURA et al. 1994, KAMIGUTI et al. 2000; MATSUI et al. 2000). Os precursores das SVMPs são latentes, compostos por multidomínios, que são processados, resultando em moléculas enzimaticamente ativas ou em um grupo de produtos, denominado desintegrinas, desprovido de atividade catalítica. A análise do cDNA (Complementary Deoxyribonucleic acid) e das seqüências das SVMPs

demonstram que este grupo de proteínas está relacionado com as MMPs (Metaloproteases de Matriz) e as ADAMs (Disintegrinas e Metaloproteases), a partir de um gene ancestral comum (MOURA-DA-SILVA et al. 1996b).

Diante do exposto fica claro que o acidente ofídico representa um problema grave de saúde pública nas quais medidas que venham minimizar a morbidade e mortalidade ocasionada pelo envenenamento devem ser tomadas. Assim o presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil epidemiológico do acidente ofídico no estado de Pernambuco e aprofundar os estudos moleculares a cerca da serpente responsável pelo maior número de acidentes e óbitos nesta mesma região.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS SERPENTES

Ao longo do curso da história da civilização, as serpentes (do latim *serpens*, *serpentis*) despertaram uma única e particular fascinação para os humanos, estando impregnadas no imaginário popular através de mitos, crenças e símbolos. Na simbologia, toda serpente é um animal ctônico* e misterioso, pode ser rival ou instruir os homens nos mistérios divinos...

Acredita-se que as serpentes possam ter surgido há mais de 135 milhões de anos atrás, talvez no final do período Jurássico (Rage, 1994). O fóssil de serpente mais antigo data de cerca de 100 milhões de anos, do Cretáceo Médio (Era Mesozóica) (CARDOSO et al. 2003).

As serpentes apresentam corpo alongado, revestido por escamas e vários de seus órgãos internos tais como pulmão, fígado, coração, rins, testículos e ovários acompanham esse alongamento. Esses animais não possuem membros, porém algumas apresentam vestígios de cintura pélvica sob a forma de esporões. Os ofídios apresentam pálpebras transparentes e imóveis, dentição característica e ausência de cavidade do ouvido médio e tímpano (HOGE E ROMANO-HOGE, 1978/79; ALVES, 1996; BORGES, 1999) (Figura 1).

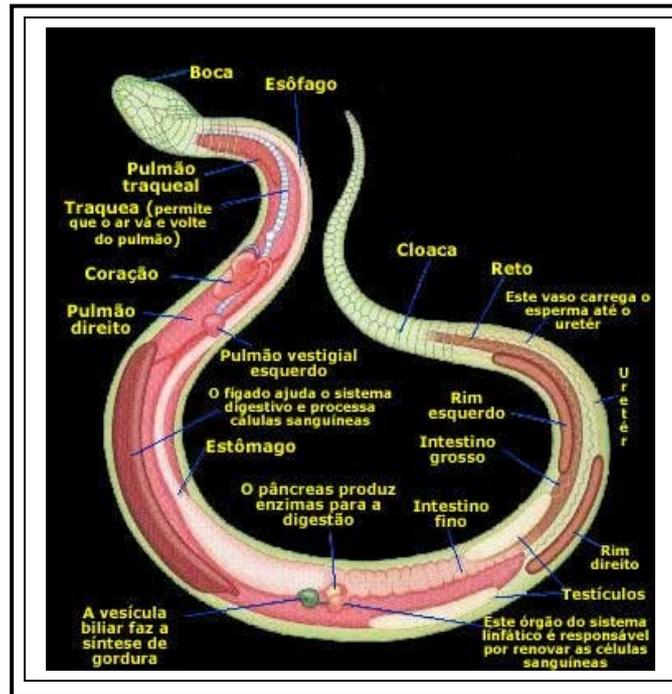


Figura 1: Corpo alongado das serpentes.

A dentição é importante para o reconhecimento das espécies causadoras de acidentes, bastando considerar os dentes do osso maxilar, que podem ser aproximadamente do mesmo tamanho, ou apresentar um par nitidamente aumentado, denominados presas (VANZOLINI et al. 1980). De acordo com o tipo de dentição, as serpentes podem ser agrupadas em quatro categorias (Figura 2):

- 1) Áglifas: dentes com aproximadamente o mesmo tamanho, que não apresentam especializações para inoculação da peçonha;
- 2) Opistóglifas: possuem os últimos dentes do maxilar aumentados, com sulco por onde escorre a peçonha;
- 3) Proteróglifas: presas permanentemente eretas, pequenas, contendo canal formado pelo fechamento de um sulco, e localizadas anteriormente no maxilar, seguidas de dentes menores (VANZOLINI et al. 1980);

4) Solenóglifas: presas longas, móveis e anteriores, que constituem os únicos dentes do maxilar e contêm canal para injeção da peçonha (POUGH, 1999; MARQUES et al. 2001).

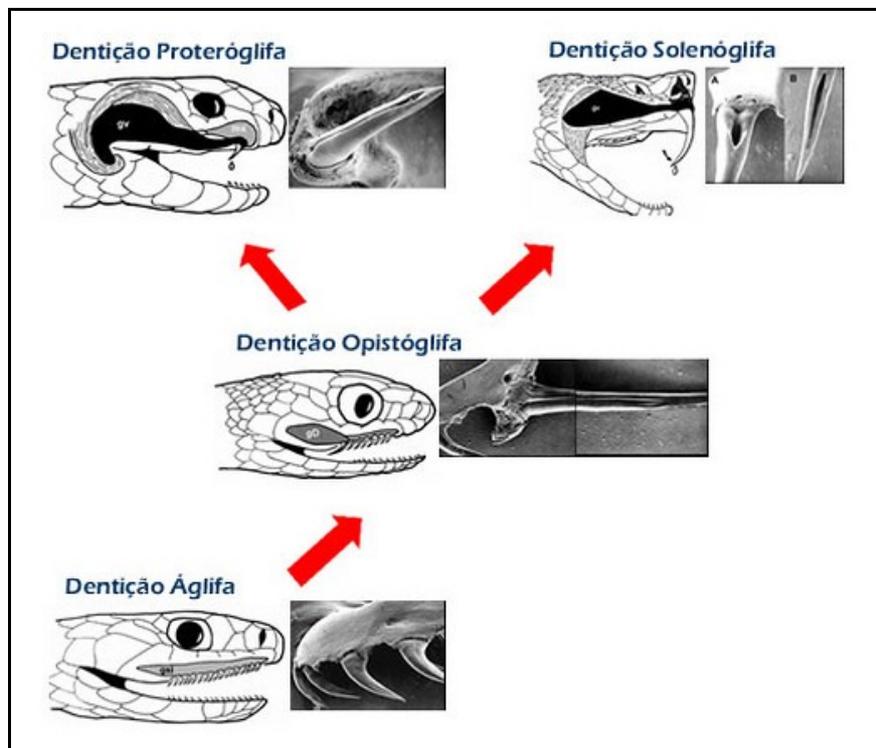


Figura 02: Categorias que distinguem as serpentes quanto ao tipo de dentição.
Fonte: <http://www.flickr.com/photos/30860996@N04/page2/>

Com exceção de poucos gêneros, as serpentes têm dificuldade em perceber objetos imóveis. A percepção de detalhes e a habilidade de foco são reduzidas (BORGES, 1999). O olfato bem desenvolvido, percebido pelas narinas e pelo órgão de Jacobson (órgão vômero-nasal) situado no palato, é o principal sentido usado na exploração do ambiente, permitindo a localização de presas, predadores e parceiros para acasalamento (BORGES, 1999; POUGH, 1999; MARQUES et al. 2001).

As serpentes podem alimentar-se de pequenos invertebrados até mamíferos. Muitas espécies de serpentes ingerem suas presas ainda vivas, geralmente, anuros, ao passo que outras usam a constrição para matá-las. A maioria

das serpentes caça ativamente, isto é, locomove-se em busca de suas presas. Outras caçam por espreita, aguardando que a presa se aproxime para capturá-la. Essas serpentes inoculam sua peçonha durante um bote rápido e largam-na em seguida, evitando o contato prolongado com a presa viva. Momentos depois, usando o olfato, rastreiam o animal já morto e ingerem-no. O envenenamento é um modo eficiente de subjugar presas perigosas (roedores, outras serpentes), sendo empregado por viperídeos, elapídeos e colubrídeos opistóglifos (MARQUES et al. 2001; BORGES, 1999).

Outro sentido muito importante é a termorrecepção percebido por meio das fossetas loreais e labiais, orifícios presentes em algumas serpentes que permitem a percepção de variações mínimas de temperaturas, da ordem de 0,003°C. A fosseta loreal é uma importante característica para identificação da principal família de serpentes peçonhentas do Brasil: família Viperidae (MARQUES et al. 2001) (Figura 3).



Figura 3: Fosseta loreal (). Fonte: <http://ecoblogando.wordpress.com/page>

2.2 SERPENTES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DE PERNAMBUCO

Existe no Brasil uma diversidade de >371 espécies de serpentes distribuídas em 93 gêneros, sendo apenas nove desses gêneros de elevada importância médica: Família Elapidae, gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais-verdadeiras) e Família Viperidae, gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rinocerophis* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus). Estes gêneros reunidos apresentam 55 espécies peçonhentas ($\pm 15\%$ das espécies catalogadas no país) ocorrentes em diferentes regiões do território nacional e que podem provocar envenenamentos sérios com necessidade de intervenções médicas apropriadas de acordo com cada gênero (HERPETOLOGIA, 2009; LIRA-DA-SILVA, 2009) (Tabela 01).

Tabela 1: Famílias e Gêneros de serpentes do Brasil (SBH, 2010).

Famílias	Gêneros	Espécies
Anomalepididae	02	07
Leptotyphlopidae	04	14
Typhlopidae	01	06
Aniliidae	01	01
Tropidophiidae	01	01
Boidae	03	12
Colubridae	26	34
Dipsadidae	46	241
Elapidae	02	27
Viperidae	07	28
Total	93	371

Em recente publicação sobre os levantamentos de serpentes de interesse médico na Região Nordeste é citado a ocorrência de cinco espécies de jararacas no

estado de Pernambuco: *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923), *Bothropoides lutzi* (MIRANDA-RIBEIRO, 1915), *Bothrops leucurus* (WAGLER, 1824), *Bothrops moojeni* (HOGE, 1966) e *Bothriopsis bilineata* (WIED, 1825), uma espécie de cascavel: *Caudisona durissa* (LINNAEUS, 1758) e uma espécie de surucucu: *Lachesis muta* (LINNAEUS, 1766), além de três espécies de corais-verdadeiras: *Micrurus coralinus* (MERREM, 1820), *Micrurus ibiboboca* (MERREM, 1820) e *Micrurus lemniscatus* (LINNAEUS, 1758), representando 18% das espécies peçonhentas do país (LIRA-DA-SILVA ET AL., 2009; SBH, 2010).

Cabe notar também que *Caudisona durissa*, *Bothropoides erythromelas* e *Bothrops leucurus* são espécies cosmopolitas nos estados nordestinos (LIRA-DA-SILVA, 2009). Há ainda registro de ocorrência da espécie *Bothropoides neuwiedi piauhyensis* na região do São Francisco (HOGE, 1978-79), entretanto esta espécie foi sinonimizada com *Bothropoides lutzi* consideradas assim como uma única espécie (LIRA-DA-SILVA, 2009).

2.2.1 FAMÍLIA ELAPIDAE (BOIE, 1827)

A família Elapidae possui apenas dois gêneros no Brasil, *Leptomicrurus* com apenas 3 espécies e *Micrurus* que apresenta maior abundância e diversidade, compreendendo 24 espécies no país, das quais apenas três são registradas em Pernambuco: *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. coralinus* (SBH, 2010; LIRA-DA-SILVA et al. 2009).

2.2.1.1 *Micrurus ibiboboca* (MERREM, 1820)

Conhecida como cobra coral ou ibiboboca, esta espécie distribui-se nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Goiás até o norte de Minas Gerais, Rio de Janeiro e, aparentemente, também ocorre no Suriname e Guiana Francesa (MOSMANN, 2001; MARQUES et al. 2001). *M. ibiboboca* é um animal característico das Caatingas do Nordeste brasileiro mas também pode ser encontrado em floresta de transição (CAMPBELL E LAMAR, 1989; MELGAREJO, 2003) e Mata Atlântica (MARQUES et al. 2001).

A serpente *M. ibiboboca* possui colorido padrão em tríades de anéis pretos, intercalados de branco e vermelho, com focinho quase totalmente branco, levemente manchado por pequenas marcas escuras (Figura 04). Serpente de pequeno porte, dificilmente ultrapassa 60 cm (MELGAREJO, 2003), possui hábito fossorial e noturno.

Esta espécie é ofiofaga, ou seja, alimenta-se de outras serpentes, além de anfisbenídeos e lagartos (VANZOLINI et al., 1980; RODRIGUES, 2003). Quanto a sua reprodução, esta espécie é ovípara.



Figura 4: *Micrurus ibiboboca*. Foto Cristiano Nogueira.
Fonte: <http://www.ib.usp.br/~crinog/pages/Micrurus%20ibiboboca>

2.2.1.2 *Micrurus lemniscatus* (LINNAEUS, 1758)

M. lemniscatus, também conhecida por coral ou coral verdadeira, habita os declives da Amazônia Andina na Bolívia, Peru e Equador, Amazônia colombiana, Venezuela Trinidad, Guianas e Bacia Amazônica do Brasil, tendo sido encontrada no Pará, parte de Goiás, parte do Norte do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Rio de Janeiro e Paraná (MOSMANN, 2001; MELGAREJO, 2003). Esta espécie habita, preferencialmente, Florestas tropicais e equatoriais, sendo encontrada raramente em área de Caatinga (CAMPBELL E LAMAR, 1989; RODRIGUES, 2003). *M. lemniscatus* divide-se em quatro subespécies dependendo da distribuição geográfica e somente a subespécie *Micrurus lemniscatus carvalhoi* encontra-se em Pernambuco, bem como no Nordeste e região central do Brasil, Mato Grosso, Paraná e talvez até o Paraguai (MOSMANN, 2001).

Semelhante a *M. ibiboboca* em muitos aspectos, inclusive na coloração de advertência em tríades, *M. lemniscatus* diferencia-se pelo seu focinho rombudo e preto, com uma faixa internasal branca, além de ser uma espécie de grande porte em

relação a outras serpentes do mesmo gênero, podendo ultrapassar 1,5 m de comprimento (MELGAREJO, 2003). Esta espécie possui atividade noturna e diurna, hábito fossorial e comportamento pouco agressivo (Figura 5).

A principal tática de defesa consiste em esconder a cabeça e exibir a cauda enrolada para confundir o predador, comportamento denominado “engodo caudal”. Da mesma maneira que a espécie *M. ibiboboca*, normalmente alimenta-se de outras serpentes de menor porte e anfisbênios, e também é ovípara.



Figura 5: *Micrurus lemniscatus*.

Fonte: http://www.ivb.rj.gov.br/galeria_micrurus/micrurus_4.html

2.2.1.3 *Micrurus corallinus* (MERREM, 1820)

A *Micrurus corallinus* possui anéis pretos simples, entre dois brancos bem delineados e delimitados, esta espécie habita preferencialmente a região próxima ao litoral e difere das demais corais brasileiras, que apresentam tríades de anéis pretos entre os vermelhos e habitam o planalto. Como todas as corais, a *M. corallinus* tem hábitos noturnos, vivem sob o solo, folhas, troncos em decomposição, raízes e pedras. Não é agressiva, oferecendo risco somente quando manuseada ou acuada. Suas presas

de veneno são fixas (dentição proteróglifa) e pequenas, localizadas na parte anterior da boca, por isso morde invés de picar, mesmo assim é uma das corais de veneno mais ativo no homem. Seu veneno pode causar a morte em pouco tempo (Figura 6).

As corais a exemplo de outros répteis apresentam maior atividade externa nos meses quentes e chuvosos que nos frios e secos. Após as chuvas elas saem atrás de alimentos preferencialmente sapos e rãs, mas, também, insetos, outros répteis, etc.

Seu comprimento é em torno de 60 cm nos machos e 70 nas fêmeas. Os acasalamentos ocorrem na primavera e com a maior atividade externa há, também, um incremento nos acidentes e picadas. Além da diferença de tamanho, há um dimorfismo sexual evidente: a cauda dos machos é maior e mais grossa, apresentando 6 a 7 anéis pretos, enquanto a das fêmeas tem 4 a 5 (SERAPICOS e MERUSSE, 2002).



Figura 6: *Micrurus corallinus*.

Fonte: http://www.ivb.rj.gov.br/galeria_micrurus/micrurus_4.html

2.2.2 FAMÍLIA VIPERIDAE (LAURENTI, 1768)

A família Viperidae se subdivide em duas subfamílias: Viperinae, constituída pelas víboras verdadeiras encontradas na Europa, Ásia e África; e

Crotalinae, cujas representantes apresentam um par de órgãos termo-sensíveis (fosseta loreal) e são encontradas nas Américas e no Sul da Ásia (STOCKER, 1990). No Brasil, a família Viperidae (subfamília Crotalinae) compreende 28 espécies, divididas entre os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Rhinocerophis* (jararacas), *Caudisona* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus) (SBH, 2010). Em Pernambuco, todos os gêneros, exceto *Bothrocophias* e *Rhinocerophis*, possuem representantes (LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

2.2.2.1 Gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothropoides*

No Brasil, o grande grupo das jararacas (gênero *Bothrops latu sensu*) possui 26 espécies, das quais 8 pertencem ao gênero *Bothrops*, 2 ao gênero *Bothriopsis*, apenas 1 espécie ao gênero *Bothrocophias*, 11 do gênero *Bothropoides* e 4 do gênero *Rhinocerophis* (SBH, 2010; FENWICK et al., 2009). Esse novo arranjo taxonômico foi proposto por Fenwick e colaboradores (2009) que através de 85 caracteres morfológicos e análise de 2.343 pb de 4 regiões do gene mitocondrial conseguiram apresentar um estudo com maior abrangência taxonômica.

Em Pernambuco, as jararacas são representadas por três espécies de distribuição restrita denominadas *Bothriopsis bilineata* (WIED, 1825), *Bothrops leucurus* (WAGLER, 1824), *Bothropoides lutzi* (MIRANDA-RIBEIRO, 1915), e bem como pela espécie *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923) de ampla distribuição no estado.

2.2.2.1.1 *Bothriopsis bilineata* (WIED-NEUWIED, 1821)

Conhecida vulgarmente como cobra-papagaio, jararaca de patioba, jararaca pinta de ouro, patioba, ouricana, surucucu pinta de ouro ou jararaca-verde devido a sua coloração, esta espécie está amplamente distribuída nas florestas úmidas da América do Sul (CAMPBELL E LAMAR, 1989) e no Brasil restringe-se às florestas tropicais da Amazônia oriental (*B. bilineata smaragdina*) e Mata Atlântica (*B. bilineata bilineata*) (MELGAREJO, 2003). Em Pernambuco, portanto, encontra-se apenas a subespécie *B. bilineata bilineata*, restrita às áreas preservadas de Mata Atlântica (SOARES, 2001). Esta serpente pode ser observada enrodilhada em bromélias, palmas, arbustos, árvores, normalmente, em florestas primárias, porém pode ser encontrada também em florestas secundárias (CAMPBELL; LAMAR, 2004) (Figura 7).

Trata-se de uma serpente de médio porte, apresentando tamanho entre 50 a 100 cm, com padrão de coloração esverdeado no dorso salpicado de pontos pretos, marrons ou avermelhados com escamas ventrais amareladas. Estes animais de hábito arborícola possuem atividade noturna. A dieta de *B. bilineata* é composta por anfíbios, répteis e pequenos mamíferos (MARQUES et al. 2001; MELGAREJO, 2003; SILVA et al. 2005). Como estratégias de defesa, essa espécie vibra a cauda e desfere botes (SILVA et al. 2005). Segundo Campbell e Lamar (2004), esses animais reproduzem-se por ovoviviparidade, mas Silva e colaboradores (2005) as consideram vivíparas, que produzem ninhadas de 6 a 12 filhotes.



Figura 7: *Bothriopsis bilineata*. Foto: Thais Figueiredos.
Fonte: <http://www.flickr.com/photos/thaisfigueiredos/4695792325/in/photostream/>

2.2.2.1.2 *Bothrops leucurus* (WAGLER 1824)

Bothrops leucurus, conhecida como malha-de-sapo ou jaracuçu, possui distribuição que se estende desde o Estado da Alagoas até o Espírito Santo, ocorrendo em ampla porção de sua distribuição no corredor Central da Mata Atlântica (Rocha, 2003). Segundo Melgarejo (2003), esta espécie é considerada o viperídeo mais comum na zona da mata do Nordeste brasileiro. Mariz (2004) registrou dois exemplares coletados em Pernambuco, um em Brejo dos Cavalos, mata úmida isolada no semi-árido e outro em Timbaúba, na zona da mata onde a vegetação predominante é Floresta Caducifólia. Esses dados corroboram os achados de Lira-da-Silva (1996) que relatou a ocorrência dessa espécie em climas úmido, úmido a sub-úmido e seco a sub-úmido, no domínio morfo-climático da Floresta tropical Atlântica, Floresta tropical Caducifólia e Subcaducifólia, desde o nível do mar até cerca de 472m. Esta espécie habita regiões densamente povoadas pelo homem, tanto nas áreas urbanas e periurbanas quanto rurais, aumentando a probabilidade de encontro e acidente (MELGAREJO, 2003).

B. leucurus é uma serpente de porte avantajado, podendo chegar a 1,8 m de comprimento. Esses animais apresentam uma faixa pós-ocular marrom (às vezes só evidente em jovens), 17 desenhos dorsais em forma de trapézio, fundo cinza e entre

os desenhos dorsais existem pequenas manchas marrons (SILVA et al. 2005). Os filhotes podem ter a ponta da cauda branca ou amarelada (Figura 8). Esta espécie apresenta hábito terrícola e atividade crepuscular e noturna (SILVA et al. 2005). Quando jovem, *B. leucurus* alimenta-se preferencialmente de lagartos e anfíbios, enquanto na fase adulta sua dieta é composta na maior parte por roedores (LIRA-DASILVA, 1996; MELGAREJO, 2003). Quando ameaçadas utilizam a camuflagem, fuga ou vibram a cauda contra o substrato e desferem botes. As serpentes *B. leucurus* são vivíparas, com nascimento de 5 a 20 filhotes por ninhada (SILVA et al. 2005).



Figura 8: *Bothrops leucurus*. Foto: Ivan Sazima
Fonte: <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias>

2.2.2.1.3 *Bothropoides lutzi* (MIRANDA-RIBEIRO, 1915)

Considerando a recente modificação da classificação do complexo *neuwiedi* (SILVA, 2000), esta espécie distribui-se pela Bacia do rio São Francisco nos estados da Bahia e Pernambuco, bem como Piauí, Ceará e Maranhão. Estes animais podem ser encontrados em zonas secas e quentes (MOSMANN, 2001) e nas savanas (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

A coloração desses animais pode variar entre cinza esverdeado e pardo avermelhado no dorso, com uma série de manchas irregulares vertebrais em marrom escuro ou pretas com margens brancas, e branco amarelado com manchas irregulares marrom escuro ou marrom amarelado com pigmentos marrons ou pretos no ventre (MOSMANN, 2001). A literatura não dispõe de outras informações sobre biologia desses animais (Figura 9).



Figura 9: *Bothropoides lutzi*. Foto: Ivan Sazima
Fonte: <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias>

2.2.2.1.4 *Bothropoides erythromelas* (AMARAL, 1923)

Bothropoides erythromelas, vulgarmente conhecida como jararaca malha de cascavel, jararaca avermelhada, jararaquinha ou jararaca-da-seca, possui distribuição restrita ao Brasil, nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Norte de Minas Gerais (MOSMANN, 2001). Esta espécie é endêmica da Caatinga (CARDOSO, 1992; RODRIGUES, 2003), porém Soares (2001) relatou a presença desta em Brejos de Altitude, ambiente úmido no domínio do semi-árido de Pernambuco, sugerindo que alguns indivíduos das áreas secas circunvizinhas teriam se deslocado para um ambiente mais úmido em busca de abrigo e alimento.

Esta espécie está entre as menores serpentes do gênero *Bothrops*, com comprimento médio de 50 cm. *B. erythromelas* caracteriza-se por uma faixa pós-ocular larga marrom, com série dorsal composta de uma mancha triangular próxima à linha mediana do dorso e duas pequenas manchas junto e abaixo de cada mancha triangular em direção ao ventre sobre fundo castanho avermelhado. Esses animais possuem hábito terrestre e atividade crepuscular e noturna (SILVA et al. 2005) (Figura 10).

B. erythromelas alimenta-se de rãs, lagartos e roedores (SILVA et al. 2005). e quando ameaçada vibra a ponta da cauda em sinal de advertência (CORDEIRO E HOGE; 1973, SOARES, 2001; MELGAREJO, 2003), usa a camuflagem e o bote como estratégia de defesa (SILVA et al. 2005).



Figura 10: *Bothropoides erythromelas*. Foto: Ivan Sazima

2.2.2.2 Gênero *Crotalus* (LINEU, 1758)

Embora o gênero *Crotalus* seja muito diversificado na América do Norte, somente uma espécie colonizou a América do Sul. No Brasil, a espécie *Crotalus durissus* apresenta sete subespécies: *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. trigonicus*, *C. d. terrificus*, *C. d. colineatus* e *C. d. cascavella*. entretanto alguns autores consideram *C. d. colineatus* e *C. d. cascavella* como espécies sinônimas de *C. d. terrificus* (WUSTER et al. 2005).

2.2.2.2.1 *Crotalus durissus cascavella* (WAGLER, 1894)

Crotalus durissus cascavella, popularmente conhecida como cascavel, maracambóia ou boicininga, é uma espécie característica das Caatingas (MELGAREJO, 2003), com ocorrência em regiões secas de Pernambuco, Maranhão, Ceará, Piauí, Alagoas, Rio Grande do Norte e extremo nordeste de Minas Gerais (HOGE; ROMANO-HOGE, 1978/79). Essas cascavéis, embora sejam associadas a vegetação aberta, estão colonizando florestas que estão sofrendo fragmentação, sendo identificadas, cada vez em maior número, em áreas de mata remanescente do litoral de Pernambuco, incluindo a região metropolitana de Recife (SOARES, 2001; PINHO, 2002; MARIZ, 2004; OBSERVAÇÃO PESSOAL).

As cascavéis caracterizam-se pela coloração de fundo castanho claro com manchas dorsais losangulares marrons escuras, marginadas de branco ou amarelo, com chocalho ou guizo na extremidade da cauda (SILVA et al. 2005). Terrestre e robusta, com padrão de atividade crepuscular e noturno, o comprimento da espécie *C.d. cascavella* pode ultrapassar 1,6 m (MELGAREJO, 2003; SILVA et al. 2005) (Figura 11).

A dieta destas cascavéis inclui, principalmente, mamíferos e aves (VANZOLINI et al. 1980) mas estes animais também podem alimentar-se de lagartos. O comportamento defensivo inclui vibração do chocalho, em advertência, produzindo ruído característico e botes (SOARES, 2001). Como a maioria das viperídeas, as cascavéis são vivíparas, produzindo ninhadas de 6 a 22 filhotes (SILVA et al. 2005).

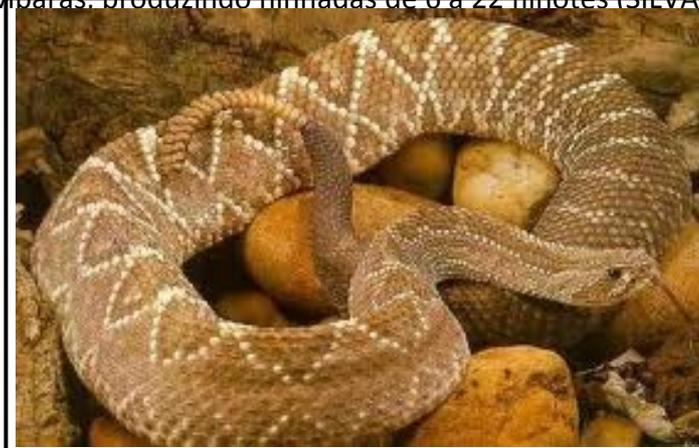


Figura 11: *Crotalus durissus cascavella*.
<http://www.g6-team.net/f967/repteis-89949/>

2.2.2.3 Gênero *Lachesis* (DANDIN, 1803)

O gênero *Lachesis* está representado apenas por uma espécie no mundo, *Lachesis muta*, conhecida como “bushmaster” pelos americanos, “bosmeester” no Suriname, “daya”, “guiama” e “manaré” na Venezuela, “verrugosa” na Colômbia, “cascavel púa” e “pucarara” na Bolívia e “diamante” e “cascavel muda” nos países de língua espanhola (MELGAREJO, 2003).

2.2.2.3.1 *Lachesis muta* (WIED, 1825)

Conhecida como surucucu, surucutinga, surucucu de fogo ou surucucu pico de jaca, *Lachesis muta* é exclusiva da fauna brasileira, habitando remanescentes da Mata Atlântica e distribuindo-se desde o norte do Estado do Rio de Janeiro até a Paraíba, com algumas populações isoladas em enclaves úmidos (MARQUES et al. 2001; MELGAREJO, 2003; SILVA et al. 2005).

Esta serpente é a maior serpente peçonhenta brasileira, chegando a 3,5 m de comprimento (SILVA et al. 2005). *L. muta* apresenta manchas escuras na cabeça com uma forte lista pós-ocular característica, padrão de coloração amarelado com figuras romboidais escuras, ventre branco ou marfim e escamas eriçadas na ponta da cauda com coloração pálida escura (MOSMANN, 2001) (Figura 12).

Essa espécie terrícola tem hábito noturno e durante o dia esconde-se em tocas de animais e ocos de árvores caídas, alimentando-se de pequenos mamíferos (MELGAREJO, 2003). Como estratégia de defesa vibram a cauda e desferem botes (SILVA et al., 2005). Esta espécie constitui uma exceção para família Viperidae por ser ovípara (MOSMANN, 2001) e possuir cuidado parental aos ovos (SILVA et al., 2005) .



Figura 12: *Lachesis muta*. <http://www.itsnature.org/ground/creepy-crawlies-land/south-american-bushmaster/>

2.3 ACIDENTES OFÍDICOS

No Brasil, os acidentes por animais peçonhentos constituem um problema de saúde pública desde os mais remotos tempos. Em 31 de maio de 1560 houve o primeiro relato de acidentes causados pelos diversos gêneros de serpentes peçonhentas existentes no Brasil, como *Bothrops*, *Crotalus* e a *Micrurus*. Esse relato foi escrito, na forma de carta, em São Vicente pelo jesuíta espanhol José de Anchieta e dirigida a seu superior Padre Diego Laynes em Roma (CARDOSO, 2003).

Apartir desta data até meados de 1900 os estudos sobre acidentes ofídicos eram escassos, porém, em 1901, Vital Brasil ao iniciar a produção de soro antiofídico

no Brasil, introduziu o "*Boletim para observação de acidente ophidico*" (Anexo A), que era enviado juntamente com as ampolas de soro, para serem preenchidos com os dados do paciente que fez uso do antiveneno, e devolvidos ao laboratório produtor. Este boletim representou a base dos atuais sistemas nacionais de informação sobre esse tipo de acidente. Por meio desse boletim, vários trabalhos foram publicados, como o do próprio VITAL BRAZIL (1911), PENTEADO (1918), AMARAL (1930), BARROSO (1944), FONSECA (1949) E MAGALHÃES (1958).

Com o passar do tempo, outros modelos surgiram de ficha para a notificação desses acidentes como os utilizados pelo Estado de São Paulo, pelos Centros de Informação e Controle de Intoxicações, pelo Estado do Rio de Janeiro, pelo Programa Nacional de Ofidismo, pelos Centros de Assistência toxicológica, Pelo Estado de Pernambuco (Anexo B), entre outros. Os estudos epidemiológicos atuais analisam as mesmas variáveis propostas por Vital Brasil, tais como sexo e idade da vítima, mês de ocorrência do acidente, local da picada, gênero da serpente, tempo decorrido entre o acidente e o atendimento e evolução (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Sendo assim, levando em consideração o levantamento nacional de acidentes ofídicos no período de 1993 a 1995, acontecem anualmente em média cerca de 20.000 acidentes no Brasil, sendo 12,7% ocorrentes na Região Nordeste. Os coeficientes de incidência nacional foram em média de 13,5 acidentes/100000 habitantes, sendo a região Nordeste com a menor taxa de incidência em comparação com as demais regiões (6,84/100000 habitantes). Porém, no Nordeste as taxas de mortalidade são elevadas (0,81%), sendo a taxa de letalidade nacional naquele período de 0,45%. Os acidentes botrópicos são os mais evidentes, constituindo 73,1% da totalidade de todos os acidentes ofídicos no Brasil, ou 90,5% dos acidentes ofídicos,

considerando apenas os acidentes de importância médica. O período do ano que ocorrem maior número de acidentes no Nordeste foi de janeiro a maio. As pessoas do sexo masculino são mais acometidas (70%), e o local da picada foi preponderantemente nos membros inferiores (70,8%). A letalidade nacional por gênero de serpentes foi de 1,87% para *Crotalus*, seguido de *Bothrops* (0,31%), *Lachesis* (0,95%) e *Micrurus* (0,36%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Segundo os dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), no período de 1999 a 2003, a região Nordeste apresentou 15.345 casos de acidentes por serpentes, em média 3069 casos/ano, com incidência de 4,57 casos/100000 habitantes. A Bahia foi o estado que apresentou maior número de casos (8.599, média de 1.719,8 casos/ano) e maior incidência média (13,16 casos/100000 hab.) no período, seguida do Maranhão (2.871 casos, média de 574,2 casos/ano e 10,16 casos/100000 hab.). Alagoas ocupou o terceiro lugar em incidência (5,74 casos/100000, 680 casos), seguido de Ceará (3,24 casos/100000, 1203 casos), Piauí (2,86 casos/100000, 406 casos), Pernambuco (2,81 casos/100000, 1113 casos), Paraíba (2,03 casos/100000, 350 casos), Sergipe (0,72 casos/100000, 65 casos) e Rio Grande do Norte (0,42 casos/100000, 58 casos) (Figura 13). Os estados com maiores taxas de letalidade foram Rio Grande do Norte, Piauí e mais uma vez Pernambuco (LIRA-DA-SILVA, 2009). É importante notar pelo conjunto de dados apresentados a subnotificação no repasse de informações dos estados para o sistema nacional, dificultando o conhecimento pleno acerca da epidemiologia de acidentes ofídicos, principalmente no Nordeste brasileiro (LIRA-DA-SILVA, 2009; ALBUQUERQUE, 2005; BOCHNER, 2002).

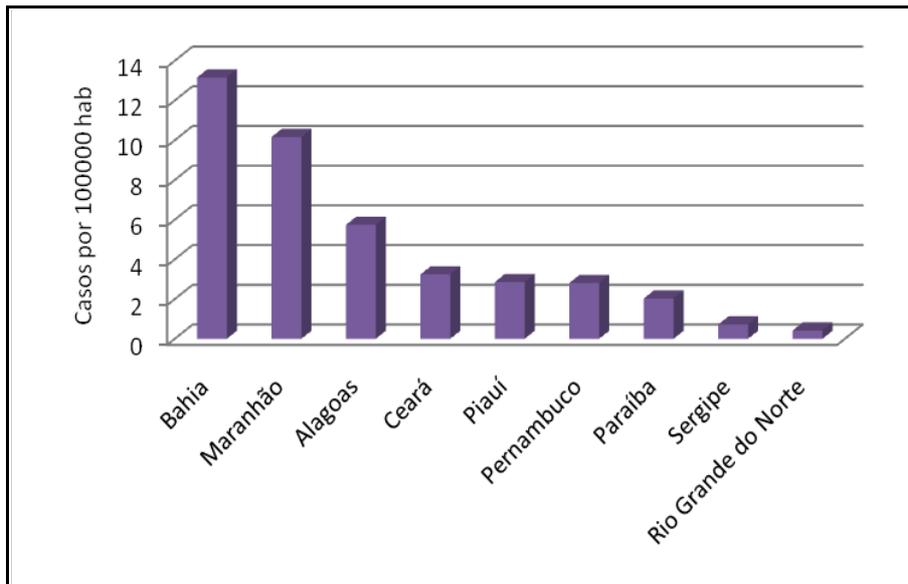


Figura 13: Distribuição dos acidentes ofídicos nos estados da região Nordeste no período de 1999 a 2003. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Estudos epidemiológicos anteriores no estado de Pernambuco no período de 1992 a 1994 indicaram uma incidência de 47% de acidentes botrópicos na Região Metropolitana do Recife, com letalidade de 0,6% (GUARNIERI, 1996).

Levantamentos epidemiológicos mais abrangentes no estado no período de 1995 a 1997, com dados do SINAN, registraram 940 casos de acidentes ofídicos, em média 313,3 acidentes/ano, sendo a maioria ocorrente na Zona Rural. A incidência estadual dos acidentes foi calculada como sendo 4,23/100000 habitantes, que ao serem observadas quanto à zona atingida, rural ou urbana, foram respectivamente de 13,11/100000 e 1,11/100000 habitantes. As regiões semi-áridas do agreste e sertão constituíram 82,7% dos casos. Foi observada uma prevalência de acidentes botrópicos no estado de 58,5% (n= 550), seguido dos acidentes crotálicos de 13,5% (n= 126), elapídicos (2%, n= 19) e laquéticos (0,4%, n= 4) (Figura 14). Em 25% dos casos não foi informado o gênero da serpente causadora do acidente (n=235) e 0,6% dos acidentes

foi provocado por serpentes não peçonhentas (n= 6). Desconsiderando os casos não informados e não peçonhentos, os acidentes botrópicos constituíram 78,7% dos acidentes e os crotálicos 18%, sendo os primeiros prevalentes em todas as antigas DIRES (Diretorias Regionais de Saúde).

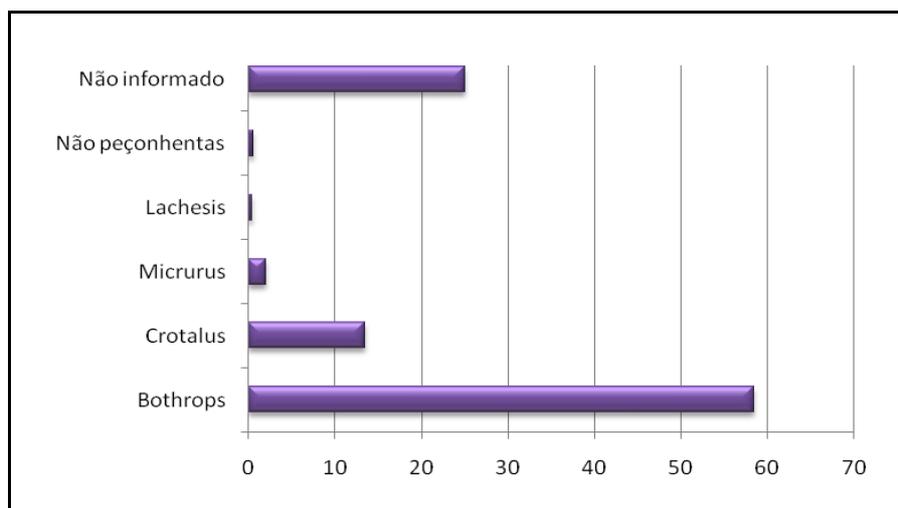


Figura 14: Percentual de acidentes ofídicos distribuídos por gênero ocorridos no período de 1995 a 1997 nas regiões semi-áridas do agreste e sertão do estado de Pernambuco. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

No estado do Ceará o levantamento epidemiológico de acidentes ofídicos peçonhentos no período de 1992 a 1995 apresentou 688 casos, 172 casos/ano em média, com sazonalidade observada de acidentes prevalentes nos meses de maio a julho. As pessoas do sexo masculino foram as mais acometidas (75,6%, 10-19 anos), a maioria trabalhadores rurais (62,7%), sendo o local da picada preponderantemente

nos membros inferiores (67,1%). A subnotificação quanto ao gênero da serpente envolvida no acidente foi extremamente elevada de 31,8% (n= 219). Dos 469 casos onde foi informado o gênero causador do acidente 88,3% foram relacionados ao gênero *Bothrops*, 10,7% a *Crotalus*, 0,9% a *Micrurus* e 0,2% a *Lachesis*. A letalidade foi de 0,7%, sendo 60% destes provocado por *Crotalus* (FEITOSA, 1997).

Levantamentos epidemiológicos na Paraíba apresentaram a incidência de 277 casos provocados por serpentes registrados no CEATOX de Campina Grande, em 2005. As pessoas do sexo masculino foram as mais acometidas (71,8%) (Gráfico 03) e a maioria dos acidentes aconteceu em trabalhadores rurais, sendo o local atingido preponderantemente os membros inferiores (73,6%). A sazonalidade observada foi nos meses de maio a novembro. Os acidentes botrópicos foram prevalentes (71,5%), seguido dos acidentes crotálicos (2,5%), elapídicos (1,1%) e em 24,9% não foi informado o gênero causador. Apenas um óbito foi registrado nesse período causado por uma serpente botrópica (LEMOS et al, 2009). Acidentes levantados no período de 1995 a 2000 no estado da Paraíba apresentaram sazonalidade importante nos meses de março a agosto, sendo as mais acometidas pessoas do sexo masculino e trabalhadores rurais, sendo a faixa etária mais atingida 10-49 anos. Em 770 casos totais, o gênero *Bothrops* provocou 46,3% dos casos, seguido de *Crotalus* (10,1%), *Micrurus* (1,7%). Casos de acidentes por serpentes não peçonhentas foi de 12,7% e em 29,2% dos casos o gênero da serpente não foi informado (ALBUQUERQUE, 2005) (Figura 15).

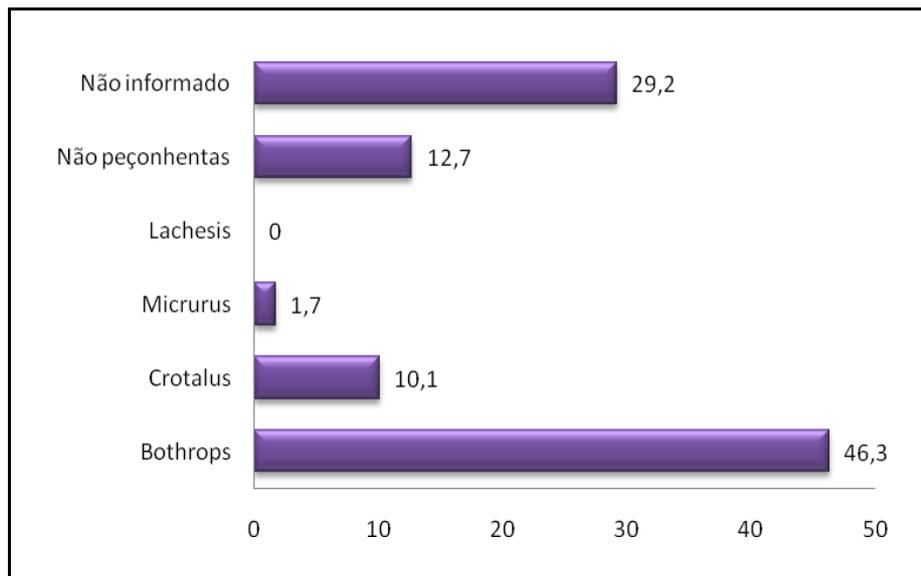


Figura 15: Casos de acidente ofídico por gênero ocorridos no estado da Paraíba durante o período de 1995 a 2000 (ALBUQUERQUE, 2005).

No período de 1995 a 2003 foram notificados 2.355 acidentes por serpentes no estado, sendo 1.098 provocados por serpentes do gênero *Bothrops* (46%), com prevalência de ocorrência sazonal nos meses de março a setembro. Dos 232 municípios do estado, a ocorrência dos acidentes botrópicos foi em 52 destes. A subnotificação foi discutida como um fator importante na evolução dos estudos epidemiológicos e como objeto grave no que condiz com a evolução da epidemiologia de acidentes ofídicos para o país

No ano de 2001 foram notificados 655 casos de acidentes botrópicos no estado da Bahia, com incidência anual de cinco casos/100000 habitantes e letalidade de 1%. A incidência foi máxima na microrregião Litoral Norte (21,9/100000 habitantes) e extremamente elevada no município de Itanagra (92,9/100000 habitantes). Os acidentes foram predominantes em homens, acometendo membros inferiores, trabalhadores rurais e durante o período chuvoso .

Figura 16: Percentual de publicações sobre epidemiologia do acidente ofídico, nos últimos 100 anos, distribuídas por regiões brasileiras. Fonte: Bochner & Struchiner (2003).

2.4 PEÇONHAS OFÍDICAS

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, os mais complexos de todos os venenos, sendo constituídas por cátions metálicos (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn), carboidratos (freqüentemente na forma de glicoproteínas), nucleosídeos, aminas biogênicas, lipídeos e aminoácidos livres. Entretanto, os principais componentes da peçonha da maioria das espécies são as proteínas e os peptídeos, podendo representar 90 a 95% do peso seco (BJARNASON E FOX, 1994; FRANÇA; MÁLAQUE, 2003).

Uma grande variedade de enzimas pode ser encontrada nas peçonhas ofídicas, como fosfolipases, fosfodiesterases, fosfomonoesterases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, enzimas proteolíticas das classes serinoproteases e metaloproteases, arginina esterases, 5'-nucleosidases, hialuronidases e NAD nucleosidases. Além das enzimas, estão presentes também peptídeos dos quais merecem destaque as neurotoxinas pré e pós-sinápticas, miotoxinas, cardiotoxinas, potenciadores de bradicina (BPP) e inibidores de agregação plaquetária (desintegrinas) (RUSSELL et al. 1997; OUYANG et al. 1992). Entretanto, é importante ressaltar que nem todas as peçonhas apresentam esta variedade de componentes. As atividades biológicas provenientes destas moléculas são responsáveis pela maioria dos efeitos tóxicos nos envenenamentos ofídicos, que constituem um problema de Saúde Pública em todo Brasil, devido a ocorrência de 20.000 acidentes por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001) (Tabela 2).

Tabela 2: Proteínas de venenos de serpentes ativadoras do sistema hemostático.

<i>Atividade funcional geral</i>	<i>Atividade biológica específica</i>
Pró-coagulantes	Ativação do fator V Ativação do fator X Ativação do fator IX Ativação de protrombina Coagulação do fibrinogênio
Anticoagulantes	Ativação de proteína C Ligação de proteína ao fator IX/X Inibição de trombina Fosfolipase A
Fibrinolíticas	Degradação de fibrinogênio

	Ativação de plasminogênio
Interação com a parede vascular	Hemorrágicas
Ativação plaquetária	Indutores da agregação plaquetária
	Inibidores da agregação plaquetária

Os estudos sobre as toxinas ofídicas têm como foco principal a purificação das mesmas, a caracterização de suas ações biológicas, a determinação da estrutura molecular e o entendimento da relação estrutura-função, visando o melhor entendimento da fisiopatologia do envenenamento e a descoberta de toxinas potenciais para o desenvolvimento de novas drogas (TAVARES et al. 2008).

2.4.1 TOXINAS GÊNERO ESPECÍFICAS

2.4.1.1 Família Elapidae – Gênero *Micrurus*

Estudos têm mostrado que as peçonhas de serpentes do gênero *Micrurus* apresentam ações neurotóxicas, miotóxicas, hemorrágicas e cardiovasculares (AIRD; DA SILVA, 1991; DA SILVA JUNIOR et al., 1991; GUTIÉRREZ et al., 1992; FRANCIS et al., 1997). Durante o envenenamento, as frações neurotóxicas destas peçonhas se manifestam clinicamente por parestesias e paralisias musculares. Essas toxinas podem agir nas regiões pré e pós-sináptica, bloqueando a comunicação neuromuscular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; OLIVEIRA et al. 2008).

2.4.1.1.1 *Micrurus ibiboboca* (coral verdadeira)

A peçonha de *M. ibiboboca* apresenta atividade hemolítica, é capaz de induzir aumento de permeabilidade e possui componentes que podem interferir com os fatores humorais associados a respostas pró-inflamatórias (TAMBOURGI et. al. 1990). Esta espécie possui peçonha capaz de induzir alta atividade acetilcolinesterase, L aminoácido oxidase, hialuronidase, fosfodiesterase, 5' nucleotidase, fosfolipásica e mionecrótica, porém ausência das atividades hemorrágica, fibrinolítica, trombina símile e proteolítica sobre calicreína, plasmina e catepsina C (CASAIS E SILVA, 1995).

2.4.1.1.2 *Micrurus lemniscatus carvalhoi* (coral verdadeira)

A peçonha de *M. lemniscatus carvalhoi* apresenta atividade acetilcolinesterase, L aminoácido oxidase, fosfolipásica, fosfodiesterase, 5' nucleotidase, e mionecrótica, porém ausência das atividades hialuronidase, hemorrágica, fibrinolítica, trombina símile e proteolítica sobre calicreína, plasmina e catepsina C (CASAIS E SILVA, 1995).

A potente atividade fosfolipásica A_2 e ação neurotóxica pós-sináptica (CECCHINI et al. 2005), provavelmente, é decorrente da ação sinérgica de quatro fosfolipases A_2 , capazes de induzir dano neuronal, alterações motoras e eletroencefalográficas, bem como convulsões (OLIVEIRA et al. 2008).

2.4.1.2 Família Viperidae

2.4.1.2.1 Gêneros *Bothrops* e *Bothriopsis* (jararacas)

Apesar da existência de variações interespecíficas e intraespecíficas na composição e atividades das diferentes peçonhas botrópicas, um quadro fisiopatológico qualitativamente similar pode ser observado, sendo caracterizado por:

a) dano tecidual local, traduzido por hemorragia, mionecrose, hiperalgesia, edema e infiltrado celular;

b) distúrbios na coagulação, incluindo a ativação da cascata seguida de depleção de fatores da coagulação e incoagulabilidade sanguínea; e

c) distúrbios renais, podendo evoluir para a insuficiência renal aguda (Gutiérrez e Lomonte, 1989). A insuficiência renal aguda pode ser causada por necrose tubular aguda ou necrose cortical decorrente da ação direta de proteases ou pela deposição de microtrombos na circulação (Amaral, 1986; Jorge e Ribeiro, 1990). Estes efeitos, atuando sinergicamente, podem desencadear o choque hipovolêmico, que constitui a principal causa de morte do envenenamento botrópico (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989).

Na literatura não existem estudos acerca da peçonha da espécie *B. lutzi*, dessa forma, trataremos aqui apenas das espécies *B. erythromelas*, *B. leucurus* e *Bothriopsis bilineata*.

2.4.1.2.1.1 *Bothriopsis bilineata* (jararaca-verde)

Ainda não existe qualquer estudo publicado sobre a peçonha da serpente *Bothriopsis bilineata*. As únicas informações disponíveis sobre a espécie referem-se a identificação da alta atividade proteolítica sobre calicreína, trombina e plasmina e a capacidade de induzir inflamação via recrutamento neutrofílico na cavidade peritoneal de animais experimentais inoculados com a peçonha de *B. bilineata smaragdina*, subespécie encontrada na Amazônia.

2.4.1.2.1.2 *Bothropoides erythromelas* (jararaca malha-de-cascavel)

A peçonha de *B. erythromelas* possui 83,7% de sua composição formada por proteínas e sua porção inorgânica é representada por altos níveis dos íons Na, Cl, K, Ca e Zn e baixas quantidades dos elementos Rb, Se, Cr, Br e Sb (Vasconcelos, 1996). Essa peçonha destaca-se das demais do gênero por apresentar uma das mais potentes atividades coagulantes do grupo devido a potentes ativadores de fator II e X (SANCHES et al. 1992; FERREIRA et al. 1992), e diferencia-se pela ausência da atividade trombina símile, (NAHAS et al. 1979; FURTADO et al. 1991; MARUYAMA et al. 1992), baixa atividade miotóxica e discreto efeito neurotóxico (ZAMUNÉR et al. 2004)

Além dessas, as atividades características do gênero são encontradas na peçonha de *B. erythromelas*, destacando-se a atividade hemorrágica (VASCONCELOS, 1996; VALENÇA, 1997), a capacidade de promover a migração de neutrófilos via liberação de mediadores quimiotáticos do ácido araquidônico (FLORES et al. 1993), a atividade potenciadora de bradicina, a potente atividade fibrinolítica (ARAÚJO, 2004) e o efeito nefrotóxico que induz o decréscimo da pressão de perfusão e da resistência vascular.

A peçonha de *B. erythromelas* induz, em cães, coagulopatia similar à observada em vítimas humanas de acidentes botrópicos: hipofibrinogenemia, trombocitopenia moderada, consumo dos fatores II, V e X da coagulação, bem como uma incoagulabilidade sanguínea logo após uma breve fase de hipercoagulação (VASCONCELOS, 1996). Essa peçonha também induz gengivorragia, petéquias hemorrágicas cutâneas, hematúria e hemorragia aguda sistêmica, levando ao comprometimento dos pulmões, rins e fígado de animais experimentais (TORRES, 1995; VALENÇA, 1997).

Estudos de biodistribuição revelaram que a peçonha de *B. erythromelas* tende a concentrar-se na local do inoculo, bem como no estômago e intestinos (VASCONCELOS et al. 1998). A curva de distribuição e eliminação dessa peçonha revelou rápida meia vida de distribuição e lenta meia vida de eliminação. A farmacocinética da peçonha de *B. erythromelas* foi alterada pela injeção de soro anti-botrópico, devido ao processo de redistribuição de 20% da peçonha do tecido para o compartimento vascular, onde ocorre a neutralização (ROCHA et al. 2008).

Três alternativas para otimização do tratamento foram testadas: o uso do soro monoespecífico anti-erythromelas, que é duas vezes mais eficiente do que o soro antibotrópico comercial em neutralizar as atividades coagulante, hemorrágica, necrozante, fosfolipásica e letalidade da peçonha de *B. erythromelas*; a associação da soroterapia convencional e da heparina, que na dose de 6 IU foi capaz de neutralizar as atividades edematogênica e fosfolipásica da peçonha e aumentar a efetividade do soro anti-botrópico (BOECHAT et al., 2001); e o tratamento com soro-anti-botrópico isolado de *Didelphis marsupialis*, que foi efetivo na neutralização dos efeitos induzidos por esta peçonha em rim isolado (MARTINS et al. 2005).

Apesar da existência de vários estudos com a peçonha total de *B. erythromelas* na última década, até o momento apenas cinco toxinas foram purificadas: 1) berytractivase, uma metaloprotease ativadora de protrombina de 78 KDa, que converte protrombina em meizotrombina, de forma independente do complexo protrombinase (SILVA et al. 2003); 2-3) berytrogina 1 e 2, metaloproteases hemorrágicas de 55 KDa (SABINO PINHO, 2005); 4) Be-X1, uma metaloprotease ativadora de Fator X de 45 kDa (ESCOBAR, 2006); e BE-I-PLA₂, uma fosfolipase A₂ ácida com potente atividade inibidora de agregação plaquetária induzida por colágeno e

ácido araquidônico (ALBUQUERQUE MODESTO et al. 2006). A grande dificuldade de purificar toxinas da peçonha de *B. erythromelas*, caracterizá-las e estudar os seus mecanismos de ação reside no baixo rendimento da peçonha por extração, devido ao pequeno tamanho dessa espécie, e ao baixo rendimento das toxinas decorrente da alta complexidade da peçonha.

Além das toxinas purificadas, três clones foram seqüenciados a partir da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha desta serpente e correspondem as toxinas já purificadas berytractivase e BE-I-PLA₂ e ao fator de crescimento do endotélio vascular (svVEGF) cuja ocorrência na peçonha ainda não foi confirmada (SILVA et al. 2003; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al. 2004; MODESTO et al. 2006;).

2.4.1.2.1.3 *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco)

A peçonha de *B. leucurus* possui atividades coagulante e hemorrágica, edematogênica e necrosante similares às demais espécies do gênero (SANCHEZ et al. 1992), bem como alta atividade fosfolipásica, miotoxicidade e capacidade de inibir a contração induzida por acetilcolina em fibras musculares, o que sugere um possível papel deletério na transmissão neuromuscular (PRIANTI et al. 2003).

Recentemente foram purificadas sete enzimas da peçonha de *B. leucurus*: 1-2) Bleu-H1 e Bleu-H2, metaloproteinases da classe PIV com alta atividade hemorrágica e ativadora de fator X, sendo Bleu-H2 consideravelmente mais ativa que Bleu-H1 (CORREIA, 2006); 3) leucurolysina-a, metaloproteinase fibrino(geno)lítica de 23 KDa, inibidora da agregação plaquetária induzida por ADP e não-hemorrágica (BELLO et al. 2006), com efeito citotóxico em células endoteliais e atividade edematogênica (GREMSKI et al. 2007); 4) leucurolysina-B, uma metaloproteinase

fibrino(geno)lítica de 55 KDa, que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno, degrada componentes da matriz extracelular e é um potente agente hemorrágico (SANCHES et. al. 2007); 5) leucurobina, uma serinoproteinase de 35 KDa, com atividade trombina símile capaz de clivar o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio humano, formando coágulos instáveis de fibrina (MAGALHÃES et al. 2007); 6-7) *b/D-PLA₂* e *b/K-PLA₂*, fosfolipases A₂ básicas de 14 KDa; *b/D-PLA₂* apresenta ação citotóxica e anticoagulante, sem interferir cm a agregação plaquetária induzida por colágeno, ácido araquidônico ou ADP, capaz de estimular o crescimento de tumores de Ehrlich, sem agir na angiogênese, com atividade fosfolipásica 20 vezes maior que *b/K-PLA₂* (HIGUCHI et al. 2007).

2.4.1.2.2 Gênero *Lachesis*

O gênero *Lachesis* é representado por serpentes de grande porte que, chegam a secretar 4 ml de peçonha líquida, o equivalente a aproximadamente um grama de peçonha seca. Os acidentes por estas serpentes apresentam características comuns ao envenenamento botrópico, sendo entretanto rotineiramente mais graves (BARRAVIEIRA, 1994).

2.4.1.2.2.1 *Lachesis muta* (surucucu)

A peçonha de *L. muta* apresenta forte atividade coagulante e desfibrinogenante que resulta em incoagulabilidade sanguínea, potente atividade proteolítica produzindo intensa lesão tecidual local; induz um quadro hemorrágico caracterizado por sangramentos local e sistêmico, além de apresentar atividade neurotóxica e ação inflamatória acompanhada de edema e intensa hiperalgesia

(KAMIGUTI; CARDOSO, 1989; ROSENFELD et al. 1959; SANCHEZ et al. 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MÁLAQUE; FRANÇA, 2003). Muitas toxinas deste gênero foram purificadas da peçonha da subespécie *L. muta muta* encontrada na região Amazônica, enquanto apenas seis foram isoladas da peçonha de *L. m. rhombeata*: 1) metaloproteinase com atividades hemorrágica e fibrinogenolítica (SANCHEZ et al. 1991); 2) desintegrina (SCARABOUGH et al. 1993); 3) LMR-47, serinoproteinase com atividade trombina símile (45 a 47 KDa), que libera preferencialmente fibrinopeptídeos A do fibrinogênio humano e apresenta 100% de homologia com uma trombina símile isolada da peçonha de *L. muta muta* (AGUIAR et al. 1996); 4) serinoproteinase calicreína símile (32 KDa), com efeito hipotensivo em ratos anestesiados (GIOVANNE-SIMONE et al. 1997) e ativadora de plasminogênio (SANCHEZ et al. 2000), 5) fosfolipase A₂ (DAMICO et al. 2005); e 6) lectina tipo-C, ligante de galactosídeos (DE-SIMONE et al. 2006).

2.4.1.2.3 Gênero *Crotalus*

A peçonha crotálica quase não induz reações no local da picada, podendo estar presente um discreto edema na região acometida e parestesia ou anestesia local possivelmente relacionadas a ação antinociceptiva da peçonha. Com relação as manifestações sistêmicas, alterações neuromusculares são evidenciadas nas primeiras horas do acidente com presença de ptose palpebral, diplopia e flacidez da musculatura da face, podendo ocorrer ainda uma insuficiência respiratória aguda decorrente de paralisia da musculatura intercostal e/ou diafragmática. Já a miotoxicidade manifesta-se por mialgia e pelo escurecimento da urina devido a mioglobinúria (BUCARETCHI, 2002). Em casos graves, a deposição de mioglobina nos túbulos renais pode evoluir

para insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003). Alterações na coagulação sanguínea acometem cerca de 50% dos acidentados, sendo caracterizada pelo aumento do tempo de sangramento ou mesmo pela incoagulabilidade sanguínea devido ao consumo de fibrinogênio, Fator V e proteína C (JORGE; RIBEIRO, 1992).

2.4.1.2.3 *Crotalus durissus* (cascavel)

A peçonha crotálica é do tipo coagulante, neurotóxica, miotóxica e nefrotóxica (SANTORO et al. 1999; MARTINS et al. 2002, AZEVEDO-MARQUES et al. 2003). De grande importância epidemiológica para a região Nordeste do país, a peçonha de *C. d. cascavella* e seus componentes ainda são pouco explorados. Até o momento apenas sete toxinas foram purificadas: 1) convulxina, glicoproteína de 60 a 78,4 KDa, com ação agregante plaquetária (MARLAS, 1982); 2-3) fosfolipase A₂ básica (15 KDa) e crotapotina ácida (9 KDa) que consistem nas subunidades da crotoxina; 4) crotoxina, com ação neurotóxica, nefrotóxica, letal e edematogênica (MARTINS et al. 2002; RANGEL-SANTOS et al. 2004; BEGHINI et al. 2004); 5) crotamina, peptídeo (4,9 KDa) capaz de induzir espasmos na musculatura esquelética (TOYAMA et al. 2005); 6) Casca LAO, L-amino oxidase (68 KDa) que induz agregação plaquetária, possui ação anti-leishmania, *in vitro*, observada em promastigotas de *Leishmania amazonenseis*, e inibe o crescimento bacteriano de cepas Gram-negativas e Gram-positivas devido ao rompimento da membrana plasmática (TOYAMA et al. 2005); 7) serinoproteinase (28 KDa) com atividade fibrinolítica e agregante plaquetária (FONSECA et al. 2006); 8) lectina tipo C, considerada isoforma da convulxina, com ação agregante plaquetária e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (RÁDIS-BAPTISTA et al. 2006).

2.4.2 *METALOPROTEASES DE PEÇONHAS OFÍDICAS (SVMPs)*

O impacto das Metaloproteases de peçonhas ofídicas (SVMPs) sobre a hemostasia tem sido altamente estudado, demonstrando que são capazes de agir sobre fatores solúveis, proteínas da Matriz extra celular (MEC) e também em componentes celulares. A ação destas toxinas envolve a sua propriedade catalítica, antiadesiva, e também seus efeitos na ativação celular e na liberação de componentes bioativos. Mais de 100 representantes deste grupo de toxina já foram descritos, incluindo isoenzimas da mesma espécie (MATSUI et al. 2000). Os venenos, particularmente da família Viperidae, contêm uma variedade de SVMPs que possuem um papel fundamental nas alterações hemostáticas e na injúria tecidual observadas após o envenenamento (BRAUD, et al. 2000). Estas alterações resultam em hemorragia severa, decorrente da interferência das SVMPs com o sistema de coagulação e/ou formação do tampão hemostático ou por degradar membrana basal e componentes da MEC (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; KAMIGUTI et al. 1996a). Sugere-se que as ações promovidas pelas SVMPs e por outros componentes de veneno, que também atuam na hemostasia, como serinoproteases, fosfolipases A2 e lectinas tipo C, são em parte, uma estratégia para imobilização da presa (FAIZ et al. 1996).

As SVMPs, juntamente com as ADAMs, (A Disintegrin And Metalloproteinase) compõem subfamília M12 das metaloproteases, também denominadas de reprotinas. Elas apresentam homologia entre seus domínios metaloproteases e em muitos casos, a homologia também é compartilhada por

outros domínios localizados na porção carboxi-terminal do domínio metaloproteinase (BJARNASON; FOX, 1994; FOX;LONG, 1998).

As SVMPs consistem de uma série de enzimas dependente de zinco que apresentam diferentes massas moleculares. Proteínas deste grupo estão presentes em grande quantidade em venenos de serpentes da família Viperidae. Porém, trabalhos demonstram a purificação de SVMPs provenientes de venenos de algumas espécies de serpentes da família Elapidae e Colubridae (ASSAKURA et al. 1994, KAMIGUTI et al. 2000; MATSUI et al. 2000). Os precursores das SVMPs são latentes, compostos por multidomínios, que são processados, resultando em moléculas enzimaticamente ativas ou em um grupo de produtos, denominado disintegrinas, desprovido de atividade catalítica. A análise do cDNA (Complementary Deoxyribonucleic acid) e das seqüências das SVMPs demonstram que este grupo de proteínas está relacionado com as MMPs e as ADAMs, a partir de um gene ancestral comum (MOURA-DA-SILVA et al. 1996b).

A divergência das MMPs originou o precursor de multidomínios das SVMPs e ADAMs e foi acompanhada pela conservação das estruturas relacionadas à catálise como os domínios pró- e metaloproteinase, presentes nas MMPs, como também, pela adição de novos domínios (disintegrina, tipo-disintegrina e rico em cisteínas) na mesma posição do domínio hemopexina presente nas MMPs (MOURA-DA-SILVA et al. 1996b). O pró-domínio está aparentemente envolvido com a inativação da enzima no interior da glândula de veneno. Esta estrutura apresenta uma seqüência conservada, PKMCGV (Pro-Lys-Met-Cys-Gly-Val), também presente no pró-domínio das MMPs, que está correlacionada com o mecanismo cysteine-switch, responsável pela ativação destas proteínas por proteólise do pró-domínio (BODE et al. 1993; STÖCKER et al. 1995).

O domínio metaloproteinase das SVMPs possui a principal estrutura funcional do domínio metaloproteinase das MMPs: a seqüência relacionada ao sítio de ligação do átomo de zinco HEXXHXXGXXH. Ainda neste domínio, encontra-se a seqüência estrutural Met-turn CI/VM que tem o papel na estabilização estrutural dos três resíduos de histidina envolvidos na catálise (BODE et al. 1993; STÖCKER et al. 1995). Apesar de muitas proteínas da família das ADAMs possuírem atividade enzimática, em algumas, a região que codifica a seqüência de ligação com o zinco apresenta mutações com a substituição de histinas essenciais, resultando em moléculas enzimaticamente inativas (MOURA-DA-SILVA et al. 1996a). O domínio disintegrina foi inicialmente correlacionado com as disintegrinas clássicas ou RGD-disintegrinas, purificadas de venenos de viperídeos. Estas moléculas são capazes de interagir com integrinas de plaquetas com alta afinidade através da seqüência RGD (HUANG et al. 1987).

Atualmente já foram descritos diferentes domínios disintegrinas contendo substituições funcionais na seqüência RGD (CALVETE et al. 2005). No domínio tipo-disintegrina, as ADAMs e algumas SVMPs apresentam a maioria dos resíduos de cisteínas conservados na mesma posição em relação a estrutura das RGD-disintegrinas, porém, verifica-se substituições no tripeptídeo RGD. Esses domínios são então denominados de tipo-disintegrinas e são expressos em combinação com o domínio rico em cisteínas na suaporção carboxi-terminal (BJARNASON; FOX, 1994; HITE et al. 1994; PAINE et al. 1992).

De acordo com os domínios, as SVMPs são classificadas em quatro grupos principais representados na figura 17:

a) as SVMPs da classe P-I são as menores representantes do grupo, apresentam na forma ativa apenas o domínio metaloproteinase;

b) nas SVMPs da classe P-II, os domínios metaloproteinase e disintegrina são juntamente sintetizados, porém, no veneno, geralmente é encontrado o produto processado que contém somente o domínio disintegrina: disintegrinas clássicas;

c) nas SVMPs da classe P-III, ao domínio catalítico são adicionados os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas, também presentes nas ADAMs (PAINE et al. 1992). SVMPs da classe P-III são encontradas no veneno na forma monômeros ou dímeros contendo os domínios metaloproteinase, tipo-disintegrina e rico em cisteínas, ou ainda em formas processadas, inativas enzimaticamente, desprovidas do domínio metaloproteinase;

d) as SVMPs da classe P-IV são dímeros que consistem de duas subunidades apresentando uma organização estrutural similar das P-III SVMPs, com a adição, através de pontes de dissulfeto, de um domínio tipo lectina (FOX; LONG, 1998).

As SVMPs estão relacionadas principalmente com as atividades fibrino(geno)lítica e hemorrágica, observadas após o envenenamento. A especificidade das SVMPs pelos substratos é ampla, sendo relacionada com proteínas do plasma, componentes da MEC localizados na membrana basal da microvasculatura (BARAMOVA et al. 1989; 1990a; FOX; LONG, 1998). A clivagem de proteínas da membrana basal, com a subsequente fragilidade capilar, constitui um dos mecanismos da hemorragia induzida pelas SVMPs (BJARNASON et al. 1988; GUTIÉRREZ et al. 2005).

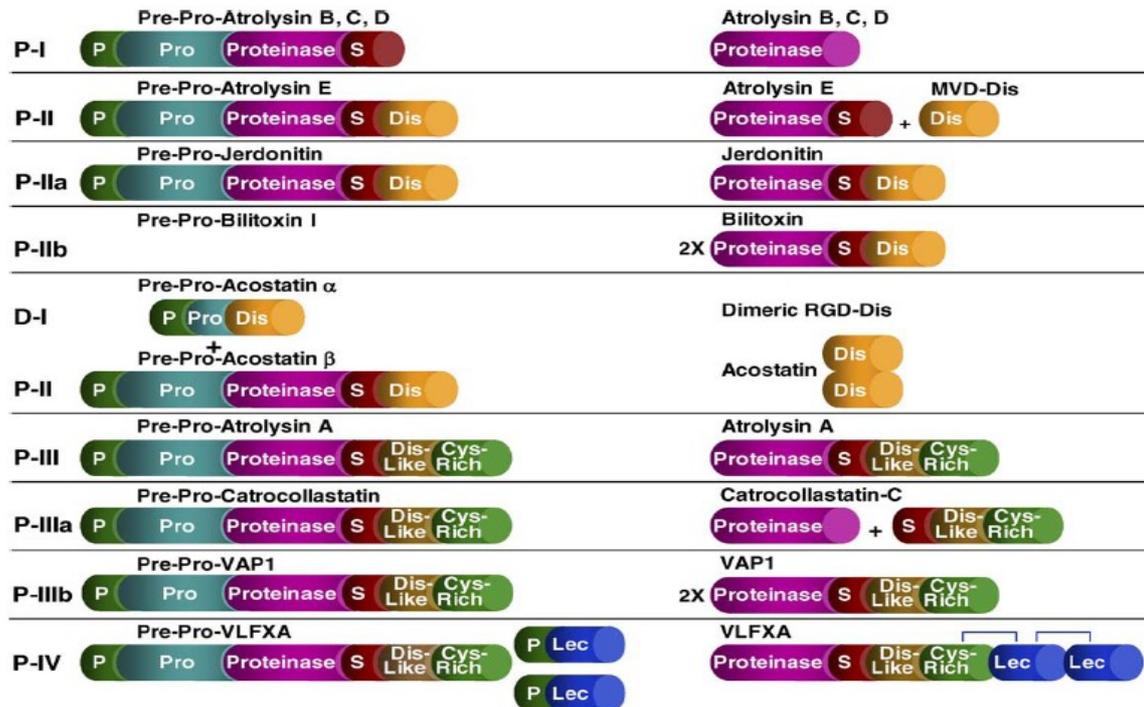


Figura 17: Classificação estrutural das SVMPs. P: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio Proteinase: domínio metaloproteínico; S: espaçoador; Dis: domínio disintegrina; Dis-Like: domínio tipo disintegrina; Cys-Rich: domínio rico em cisteína, Lec: domínio ligante de lectina. Fonte: Fox e Serrano, 2008.

Diversas atividades estão atribuídas a organização estrutural de domínios apresentada pelas SVMPs. Em geral, as SVMPs da classe P-I são enzimas fibrinolíticas, fracamente hemorrágicas que podem apresentar atividades mionecrótica e pró-inflamatória (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Por outro lado, postula-se que a presença dos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas das SVMPs fornecem um potente efeito hemorrágico, atuando nas proteínas da membrana basal das células endoteliais e também inibindo a agregação plaquetária dependente de colágeno (KAMIGUTI et al. 1996a). Além disso, as SVMPs da classe P-III também possuem ação pró-inflamatória e ativam diversos tipos celulares, mostrando-se um grupo versátil em relação a diversos sistemas dependentes de interação célula-MEC (LAING; MOURA-DASILVA, 2005).

Dentre as SVMs do tipo PIII uma atividade biológica tem chamado a atenção. Foi demonstrado que essas metaloproteases possuem a capacidade de induzir apoptose em células endoteliais, sendo estas então denominadas Proteínas indutoras de apoptose vascular (VLAIPs) (TAVARES, et al. 2008).

2.4.3 *PROTEÍNAS INDUTORAS DE APOPTOSE VASCULAR (VLAIPs)*

Em organismos multicelulares, a apoptose, mecanismo que leva à morte programada das células, é essencial para muitos processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento normal, estabelecimento de tolerância imunológica e degeneração de tecidos. Estudos sugerem que o processo apoptótico de células endoteliais vasculares, não só regulam a angiogênese, como também promovem a regressão das células vasculares, são importantes na cura de ferimentos, na progressão de tumores e na metástase, também apresentam uma parte crítica na homeostase, como coagulação sanguínea, contração dos vasos e controle da permeabilidade vascular (YIN et al, 2000).

A possibilidade de impedir a progressão do câncer tem sido alvo de diversos estudos, e a aniquilação de células endoteliais vasculares recrutadas pelos tumores para o fornecimento de nutrientes e crescimento pode constituir a fonte para tal busca (FOLKMAN, 1971). Na verdade, o rompimento do processo de formação de novos vasos sanguíneos está se tornando um meio médico eficaz de interromper o crescimento tumoral. Sua investigação pode ajudar a desenvolver novas terapias e medicamentos (ZHONG; BOWEN, 2006).

Até agora, as toxinas das serpentes, potencialmente capazes de conter a proliferação das células do endotélio vascular, podem constituir fortes candidatas para o desenvolvimento de drogas anti-angiogênese no combate ao câncer (RÁDIS-BAPTISTA, 2005; SWENSON et al. 2007).

Em 1997, foi relatado o isolamento e a purificação de uma proteína do veneno de *Crotalus atrox*, que apresentava a capacidade de induzir apoptose vascular, sendo

denominada VAP-1 (MASUDA et al. 1997). VAP1 é considerada a primeira proteína indutora de apoptose vascular, sendo uma SVMP do tipo PIII, com uma massa molecular de 110 kDa e ponto isoelétrico de 8,5. Posteriormente, VAP2, uma proteína monomérica com massa molecular de 55 kDa, que mata especificamente células endoteliais vasculares (VECS) em cultura, também foi purificada do veneno da mesma (MASUDA et al. 1998) (Figura 18).

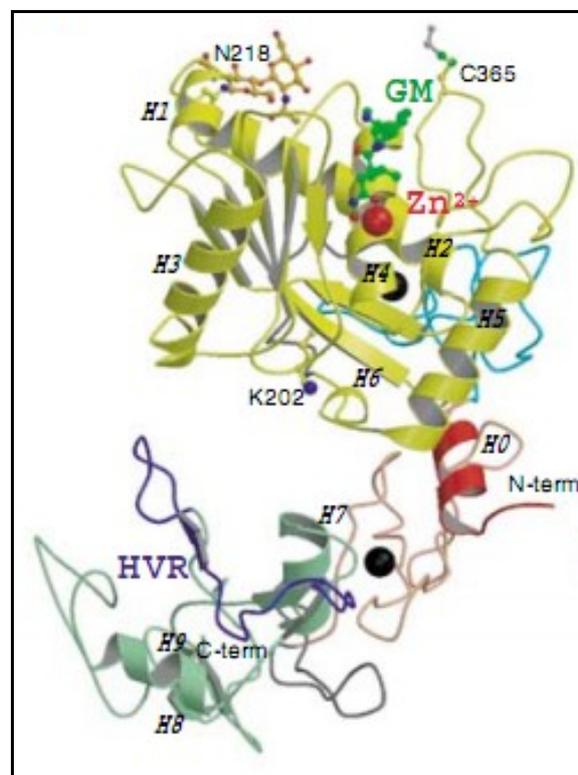


Figura 18: Estrutura tridimensional da VAP1 revela a presença dos domínios Metaloprotease, Disintegrina e Rico em cisteína característico de uma Metaloprotease da Classe PIII (TAKEDA et al. 2006).

O mecanismo pelo qual VAP1 induz apoptose em VECS parece envolver $\alpha 3$, $\alpha 6$ e $\beta 1$ -integrinas, bem como a integrina-associado a proteína CD9, uma vez que os anticorpos dirigidos a essas proteínas de membrana inibem a morte celular (ARAKI et al. 2002). Além disso, a ativação das proteínas caspases, acompanhada da fragmentação severa de células é adicionalmente induzida por VAP1 (MARUYAMA et al. 2005) (Figura 19).

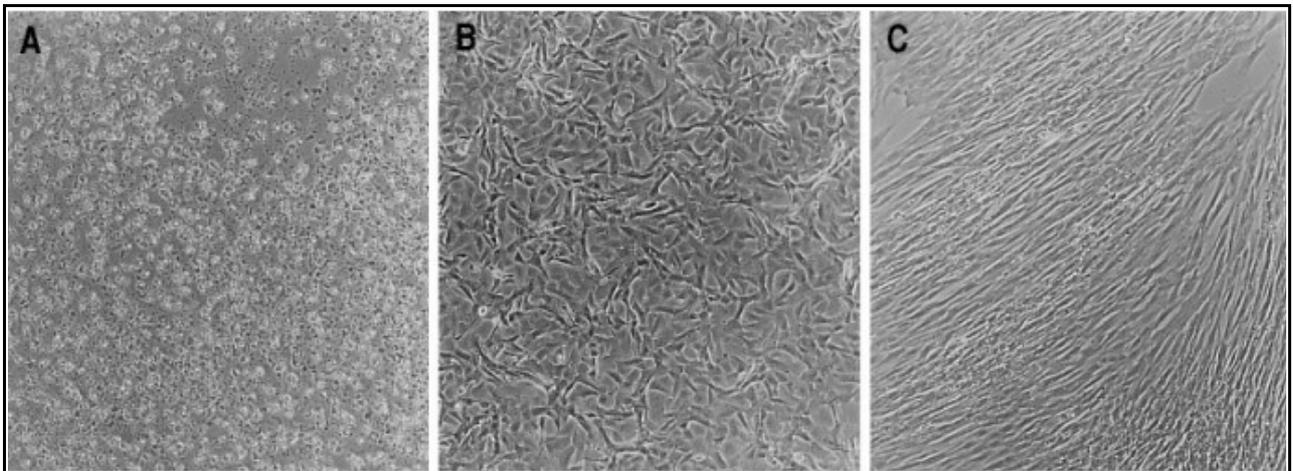


Figura 19: Efeito da VAP2 sobre a viabilidade celular. Células tratadas com 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de VAP2. Após 48h as células foram observadas ao microscópio, aumento x100. (A) VEC; (B) RSMC-3 células musculares de camundongo; (C) TIG-7 fibroblastos humano. Apoptose em A mas não em B e C. fonte (MASUDA et al. 1998).

Estudos anteriores de morte celular *in vitro* estabeleceram características morfológicas que são típicas de apoptose, ou seja, condensação nuclear, formação de bolhas na superfície da célula, resultando na formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA (YOU et al. 2003).

Com a descoberta das VAPs, outras proteínas que apresentam a mesma capacidade de induzir a apoptose passaram a ser clonadas e purificadas. Dentre elas,

encontra-se uma metaloprotease hemorrágica, halysase, isolada a partir do veneno de serpente *Gloydius halys*, que também induz apoptose em células endoteliais. A análise da sequência codificante do cDNA revelou que esta enzima consiste de domínios multifuncionais, incluindo um domínio pró-proteína, um domínio protease, um domínio disintegrin-*like* e um domínio rico em cisteína. Halysase inibe fortemente a proliferação de células endoteliais de veia umbilical de humano de uma forma dose-dependente, bem como a aderência das células extracelulares à matriz extracelular de proteínas (YOU, et al. 2003).

Recentemente, metaloproteases de veneno de serpente tais como HV1 (MASUDA, 2001) foram notificadas por induzir extensa morte celular em células endoteliais vasculares humanas. HV1 foi isolada do veneno de *Trimeresurus flavoridis* e apresenta 85% de similaridade com VAP1.

Uma proteína indutora de apoptose de células endoteliais humanas (VLAIP) também foi purificada, clonada e caracterizada do veneno da *Vipera lebetina*. Esta metaloprotease heterodimérica é uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 106 kDa. Esta SMVP hidrolisa cadeia A- α e de forma mais lenta a cadeia B- β do fibrinogênio (TRUMMAL et al. 2005).

2.5 A BIOLOGIA MOLECULAR

A abordagem bioquímica clássica com venenos animais necessita de grandes quantidades de material bruto para isolar os componentes individuais e, posteriormente, uma grande quantidade suficiente de determinado componente para a sua caracterização. Assim, venenos cuja fonte é escassa ou cujos componentes estão presentes em baixa concentração tendem a ser ignorados. A biologia molecular mudou esse panorama a partir dos fins da década de 80 mostrando-se uma poderosa técnica à disposição dos laboratórios que trabalham com toxinas animais (MIDDLEBROOK, 1991). As toxinas recombinantes podem ser produzidas em grande quantidade. (ADAMS; OLIVEIRA, 1994).

2.5.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

A PCR consiste em amplificar cópias de DNA “in vitro”, usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA. É o método para rápida amplificação de sequências específicas de DNA. Apesar de representar um grande avanço na tecnologia do DNA recombinante, a PCR apresenta limitações quando utilizada como método quantitativo. Isto se deve a dificuldade da quantificação do produto da PCR, pois esta reação origina uma quantidade de produtos semelhantes, independentemente da quantidade inicial do DNA molde presente na reação (KUBISTA *et al.*, 2006).

Essa limitação provocou a necessidade de criação de uma técnica mais específica para análises quantitativas. Higuchi e colaboradores (1992) introduziram a

PCR em tempo real, permitindo a quantificação de fragmentos de DNA e RNA (NOVAIS *et al.*, 2004; KUBISTA *et al.*, 2006; DUSSAULT *et al.*, 2006). A PCR em tempo real realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e altamente reproduzível, pois determina seus valores durante a fase exponencial da reação (NOVAIS *et al.*, 2004). As características relevantes da PCR em tempo real são rapidez, especificidade, sensibilidade e quantificação. É realizada em um sistema de tubos fechados e não requer nenhuma manipulação de amostra pós-PCR. Portanto, o potencial de contaminação da PCR no laboratório é reduzido, uma vez que os produtos amplificados podem ser analisados e eliminados sem abertura dos tubos de reação. Em segundo lugar, este método suporta o uso de um gene de normalização-controle, como β -actina. A análise é efetuada em tempo real durante a fase de acumulação do produto (DUSSAULT *et al.*, 2006).

A curva de quantificação dos ácidos nucléicos através da PCR em tempo real é dividida em 3 fases: a linha basal na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase *log* em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo, e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos (WILHELM *et al.*, 2003). O ponto na curva, dentro da fase exponencial, no qual a quantidade de fluorescência ultrapassa o sinal da linha basal (em inglês “*background*”) é chamado de valor de ciclo do “*threshold*” (Ct) (DUSSAULT *et al.*, 2006). Este ponto é de crucial importância, pois, permite determinar a concentração de ácidos nucléicos com maior acuidade (Krene *et al.*, 2005; WILHELM *et al.*, 2003, Livak *et al.*, 1995).

A PCR em tempo real pode ser utilizada para diversas aplicações, tais como: quantificação do número de cópias de transgênicos, identificação de organismos

geneticamente modificados, detecção e quantificação de patógenos, entre outras. É também um sensível método para detecção de ácidos nucleicos, porque permite um alcance dinâmico na quantificação de uma grande quantidade de alvos (Krene et. al., 2005).

Na PCR em tempo real existem dois métodos de quantificação: a detecção não-específica e a específica. O método que utiliza *Syber Green*, um fluoróforo com excitação e emissão máxima de 494nm e 521nm (DUSSAULT et al., 2006), que se liga à fita-dupla de DNA, emitindo uma fluorescência verde detectada pelo sistema de recepção do equipamento (NOVAIS et al., 2004), é o exemplo mais utilizado de detecção não-específica. O *TaqMan*, uma sonda altamente específica para a sequência-alvo, libera fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse.

A PCR em tempo real baseia-se na detecção dos produtos amplificados de DNA ligados às moléculas fluorescentes, que aumentam a intensidade da emissão à medida que o produto da PCR acumula-se em cada ciclo (DUSSAULT et al., 2006). A emissão da fluorescência é gravada durante cada ciclo e representa a quantidade do produto amplificado (NOVAIS et al., 2004). A plataforma da PCR em tempo real requer um sistema ótico para excitação da fluorescência e outro para a recepção da emissão. As informações adquiridas são transmitidas para *softwares* que analisam e calculam os dados finais da reação (Figura 20).

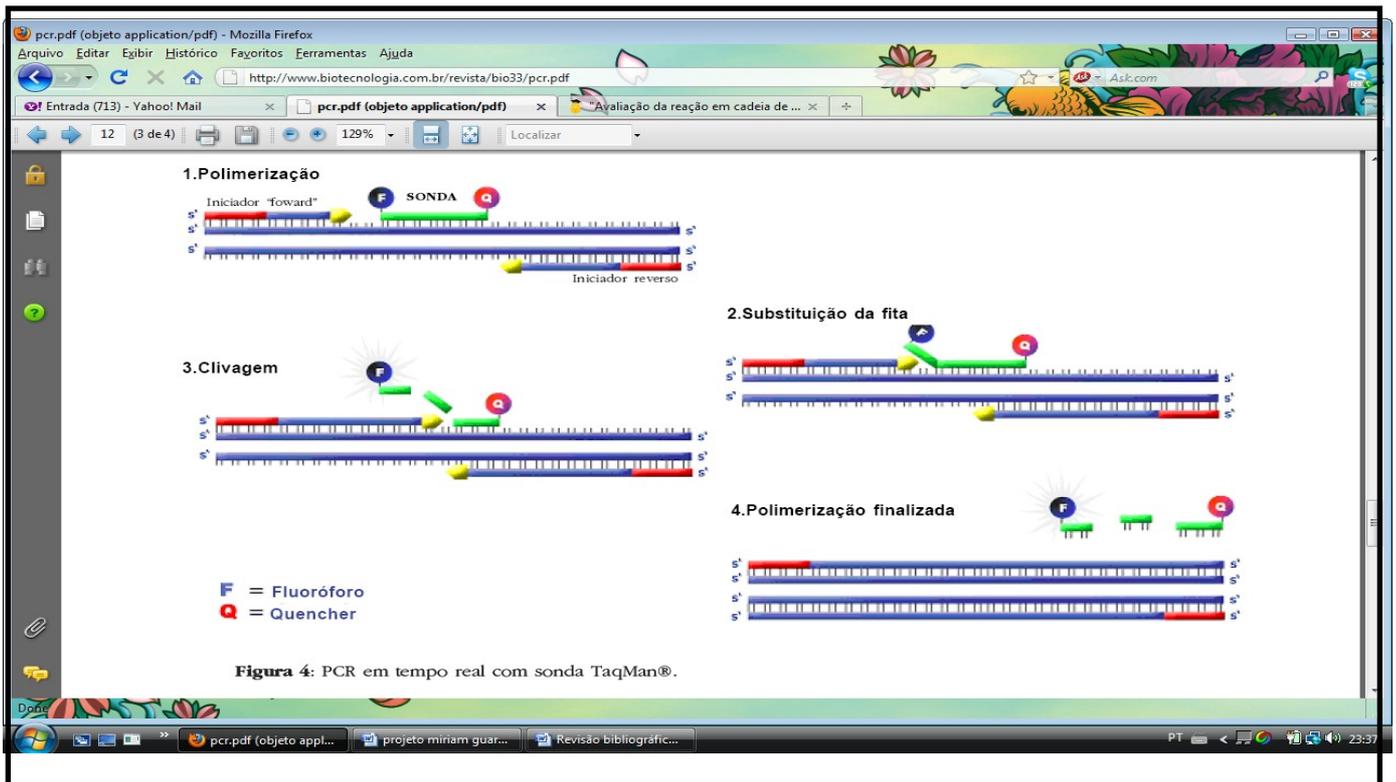


Figura 20: PCR em tempo real com sonda TaqMan®, (F) Fluoróforo, (Q) Quencher. Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).

Como um protocolo adicional, pós-PCR, da PCR em tempo real, a curva de "melting" pode ser realizada a fim de que as sequências amplificadas sejam caracterizadas (WILHELM *et al.*, 2003). A curva de *melting* é realizada pelo aquecimento lento e gradual do *amplicon* na presença de fluoróforo. Na medida em que a amostra aquece, a fluorescência decresce rapidamente (AKEY *et al.*, 2001). A curva de *melting* baseia-se no princípio de que cada fita-dupla de DNA apresenta sua temperatura de *melting* (T_m) específica, que é definida como a temperatura em que 50% do DNA fita-dupla torna-se fita simples, coincidindo com o mais acentuado decréscimo do sinal do fluoróforo. Esta fase pode ser identificada mais simples e

convenientemente como um pico gerado pela derivação negativa da curva de *melting* (WILHELM *et al.*, 2003).

A curva de *melting* é primariamente determinada pelo comprimento e grau do conteúdo de guanina-citosina do DNA fita-dupla (WITTEWER *et al.*, 2001) e realizando a diferença entre diferentes *amplicons* têm sido aplicada a diversas análises como verificação de níveis de expressão de diferentes transcritos. Tal curva também permite identificar a formação de produtos não específicos, bem como de dímeros de *primers* (Krene *et al.*, 2000) (Figura 21).

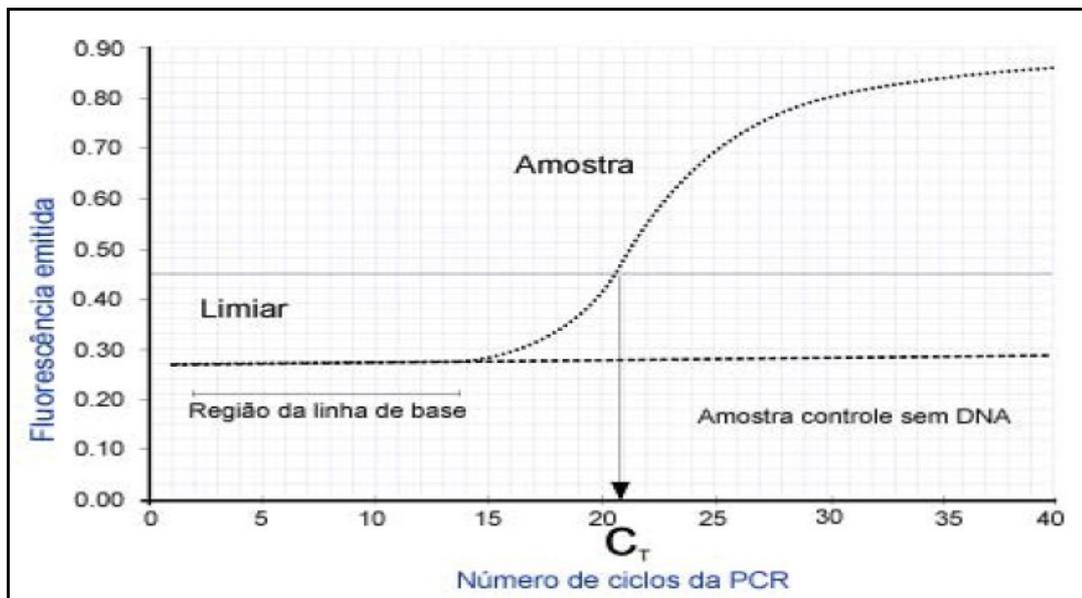


Figura 21: Curva de amplificação do PCR em Tempo Real. C_T – Cycle de Threshold. A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos. Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, ME; OLIVEIRA, BM. Neurotoxins overview of na emerging research technology. **Trends Neurosci.** v.17, n.4, p. 151-5, 1994.

AGUIAR, AS; ALVES, CR; MELGAREJO, A; GIOVANNI-SIMONE, S. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 555-565, 1996.

AIRD, SD; SILVA, NJR. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.99, n.2, p.287-94, 1991.

AKEY, JM; SOSNOSK, DI; *et al.* Melting curve analysis of snps (mcsnp): a gel-free and inexpensive approach for snp genotyping. **Biotechniques**, v.30, n.2, p:358-362, 2001.

ALBUQUERQUE, HN; COSTA, TBG; CAVALCANTI, MLF. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** v.5, 2005.

ALBUQUERQUE, HN; FERNANDES, A; ALBUQUERQUE, ICS. Snakebites in Paraíba, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v.11, p.242-251, 2005.

ALVES, AL. *et al.* Cartilha de ofidismo (Cobral). 4. ed. Brasília, **Fundação Nacional de Saúde.** 1996.

AMARAL, A. Campanhas anti-ophidicas. **Memórias do Instituto Butantan.** v.5, p.195-232, 1930.

AMARAL, CFS; REZENDE, NA; SILVA, AO. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico: Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.28, n.4, p. 220-227,1986.

AQUINO, WK. Epidemiologia e clínica dos acidentres ofídicos no Estado de Pernambuco. In Programa de Pós-Graduação em Biofísica, Volume Master. (Recife: Universidade Federal de Pernambuco), 1999.

ARAKI, S; MASUDA, S; MAEDA, H; YING, MJ; HAYASHI, H. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. **Toxicon**. v.40, n.5, p. 535-42, 2002.

ARAÚJO, IP. Caracterização da atividade fibrinolítica e purificação parcial de fibrinogenase(s) da peçonha de *Bothrops erythromelas* (jararaca malha de cascavel). Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharelado Em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

ASSAKURA, MT; REICHL, AP; MANDELBAUM, FR. Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon**, v. 32, p.819-831, 1994.

AZEVEDO-MARQUES, M; CUPO, P; HERING, SE. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. **Medicina**, v.36, p.480-490, 2003.

BARAMOVA, EN; SHANNON, JD; BJARNASON, JB; FOX, JW. Degradation of extracellular matrix proteins by haemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 275, p. 63-71, 1989.

BARAMOVA, EN; SHANNON, JD; BJARNASON, JB; FOX, JW. Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. **Matrix**, v. 10, p. 91-97, 1990a.

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Ed. De publicações científicas, 1994.

BARROSO, RD. Ofidismo no Brasil. **Boletim do Instituto Vital Brazil**, v.26, p. 35-47, 1944.

BEGHINI, DG; RODRIGUES-SIMIONI, L; TOYAMA, MH; NOVELLO, JC; CRUZ-HÖFLING, MA; MARANGONI, ES. Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick *Biventer cervicis* preparation. **Toxicon**, v.43, n.3, p.255-261, 2004.

BÉRNILS, R. S. (org.). 2010. *Brazilian reptiles – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Captured on date of your online consult.

BJARNASON, JB; HAMILTON, D; FOX, JW. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 369, p. 121-129, 1988.

BJARNASON, JB; FOX, JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.** v. 62, p. 325-372, 1994.

BOCHNER, R; STRUCHINER, CJ. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n.3, p.735-746, 2002.

BOCHNER, R; STRUCHINER, CJ. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.1, p.7-16, 2003.

BOCHNER, R; STRUCHINER, CJ. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, p.735-746, 2002.

BODE, W; GOMIS-RUTH, FX; STOCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS. Lett.**, v.331, p. 134-140, 1993.

BOECHAT, ALR; PAIVA, CS; FRANÇA, FO. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.43, n.1, 2001.

BORGES, RC. **Serpentes peçonhentas brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimento em casos de acidente**. São Paulo, editora Atheneu. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde/Ascom/Pre/FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF, 2001, p. 10-11.

BRAUD, S; BON, C; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

BRAZIL, V. **A Defesa Contra o Ophidismo**. São Paulo: Pocaí & Weiss. 1911.

BUCARETCHI, F; et al. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.44, n.3, p.133-138, 2002.

BELLO, CA; et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v.88, p.189–200, 2006.

CALVETE, JJ; et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, p. 1063-1074. 2005.

CAMPBELL, JA; LAMAR, WW. 1989. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca, ed Cornell University Press.

CAMPBELL, JA. & LAMAR, WW. 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock, Ithaca & London.

CARDOSO, J. L. 1990. Ofidismo. Aracneísmo. Escorpionismo. Epidemiologia. Patogenia e Clínica. Diagnóstico e Terapêutica. In: SOERENSEN, B. (ed.). *Animais Peçonhentos. Reconhecimento. Distribuição Geográfica. Produção de Soros. Clínica e Tratamento dos Envenenamentos*. Atheneu, Rio de Janeiro. p.109-138.

CARDOSO, JLC. 2003. *Serpentes Peçonhentas do Brasil* (São Paulo, Sarvier).

CARDOSO, JLC. **Introdução ao estudo dos acidentes por animais peçonhentos**. In: *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. Schvartsman, S., 2ª ed.1992.

CARDOSO, JLC. 2003. José de Anchieta e as Cartas. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* (J. L. Cardoso et al. Org.), pp. 456-457, São Paulo: Sarvier.

CASAIS E SILVA, LL. 1995. Caracterização das atividades biológicas e enzimáticas do veneno de duas espécies de *Micrurus* (Serpentes; Elapidae) do estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 97p.

CECCHINI, AL; et al., Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, v.140, n.1, p.125-34. 2005.

CORDEIRO, CL; HOGE, AR. Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco. **Mem. Inst. Butantan.** 1973.

CORREIA, JM; SANTANA-NETO, PL; PINHO, MSS; SILVA, JÁ; AMORIM, MLP; ESCOBAR, JAC. Poisoning due to *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) attended at Restauração Hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil: case report. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v. 43, n.336-338, 2010.

CORREIA, JM. 2006. Purificação e caracterização parcial de duas hemorraginas ativadoras de fator X da peçonha de *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco) (Wagler, 1824). Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco.

GREMSKI, LH; et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v.50, p. 120–134, 2005.

DA SILVA JR, JN; AIRD, SD. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v.128, n.3, p.425-56, 2001.

DE-SIMONE, SG; NETTO, CC; SILVA JR, FP. Simple affinity chromatographic procedure to purify-galactoside binding lectins. **Journal of Chromatography B**, v.838, p. 135–138, 2006.

DUSSAULT, AA; POULIOT, EM. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biol. Proced.** v.8, n.1, p.1-10, 2006.

FAIZ, MA; FALKOUS, G; HARRIS, JB; MANTLE, D. Comparison of protease and related enzyme activities in snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.113, p. 119-204, 1996.

FEITOSA, RFG; MELO, IMLA; MONTEIRO, HSA. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará - Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, p.295-301, 1997.

FENWICK, AM; GUTBERLET, JR; EVANS, RL; PARKINSON, CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoo. Jour. of the Linnean Society**, v. 156, p.617–640, 2009.

FLORES, CA; ZAPPELLINI, A; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon.** v. 31.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N. Engl. J. Med.** 285, 1182-6, 1971.

FONSECA, F. *Animais Peçonhentos*. São Paulo: Empresa Gráfica da Revista dos Tribunais / **Instituto Butantan**. 1949

FONSECA, FV; et al. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. **Protein J.** v.25, n.3, p. 183-92, 2006.

FOX, JW; LONG, C. The ADAMs/MDC family of proteins and their relationships to the snake venom metalloproteinases. In: BAILEY, G. (Ed.). Snake Venom Enzymes. Colorado: **Alaken Press**, p. 151-178, 1998.

FRANCIS, BR; et al. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. **Toxicon**, v.35, n.8. p.1193-203, 1997.

FURTADO, MF; MARUYAMA, M; KAMIGUTI, AS; ANTONIO, LC. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, p.219–226. 1991.

GIOVANI-DE-SIMONE, S; et al. Purification, properties and N-terminal amino acid sequence of a kallikrein-like enzyme from the venom of *Lachesis muta rhombeata* (Bushmaster). **J. Protein Chem.**, v.16, p.809–818, 1997.

GUARNIERI, MC; ANDRADE, LR; LIMA, PK; AL, E. Envenoming by snakes of the genus Bothrops in Recife. In International Society on Toxicology: Pan American Section, Fifth Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, 1995, Pergamon, ed. (Maryland, USA: Toxicon), p. 323.

GUOYONG, YIN; et al. Endostatin Gene Transfer Inhibits Joint Angiogenesis and Pannus Formation in Inflammatory Arthritis. **Molecular Therapy**, v.5, n.5, 2002.

GUTIÉRREZ, JM; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82, p.841-845, 2000.

GUTIÉRREZ, JM; RUCAVADO, A; ESCALANTE, T; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metallo proteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v.45, p.997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, JM; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A Review. **Mem. Inst. Butantan**, v.51, n.4, p.211-223. 1989.

GUTIÉRREZ, JM; ROJAS, G; JÚNIOR, NJS; NÚÑEZ, J. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). **Toxicon**, v.30, n.10, p.1299-302. 1992.

Herpetologia, S.B.d. (2009). Brazilian reptiles - list of species. (Sociedade Brasileira de Herpetologia).

HIGUCHI, DA; et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v.89, p.319 – 328, 2007.

HITE, LA; JIA, LG; BJARNASON, JB; FOX, JW. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.308, p.182-191, 1994.

HOGUE, AR; ROMANO-ROGE, SARWL. Sinopse das Serpentes Peçonhentas do Brasil. **Mem. Inst. Butantan**. v.42.43, p.373-497, 1978/79.

HUANG, TF; HOLT, JC; LUKASIEWICZ, H; NIEWIAROWSKI, ST. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **J. Biol. Chem.**, v.262, p.16157-16163, 1987.

JORGE, MT; RIBEIRO, LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v.36, p.66-77. 1990

JOSÉ ARTURO COSTA ESCOBAR. Purificação de um ativador de Fator X da peçonha de *Bothrops erythromelas* (Serpentes, Crotalinae). 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharelado Em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, ILM; SILVA, MB; CHUDZINSKI-TAVASSI, AM; HO, PL. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. **Toxicon**, v.44, p.571–575, 2004.

KAMIGUTI, AS; HAY, CRM; THEAKSTON, RDG; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, p.627-642, 1996a.

KAMIGUTI, AS; THEAKSTON, RD; SHERMAN, N; FOX, JW. Mass spectrophotometric evidence for P-III/P-IV metalloproteinases in the venom of the Boomslang (*Dispholidus typus*). **Toxicon**, v. 8, p.1613-1620, 2000.

KAMIGUTI, AS; CARDOSO, JLC. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon**, v.27, p.955–963, 1989.

KRENKE, BE. et al. Development of a novel, fluorescent, two primers approach to quantitative PCR. *Profiles in DNA*. **Promega Corporation**, v.8, n.1, pp3-5, 2005.

KUBISTA, M; et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**. v.27, v.2, 95-125, 2006.

LAING, G; MOURA-DA-SILVA, AM. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v.45, p.987-996, 2005.

LEMOS, JC; ALMEIDA, TD; FOOK, SML; PAIVA, AA; SIMÕES, MOS. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev. Bras. Epid.**, v.12, p.50-59, 2009.

LIRA-DA-SILVA, RM. 1996. Estudo clínico-epidemiológico dos acidentes ofídicos por *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae) na Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. Mestrado em Saúde Comunitária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 135p.

LIRA-DA-SILVA, RM; et al. Serpentes de Importância Médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, p.7-20, 2009.

LIRA-DA-SILVA, et al. Morbimortalidade por ofidismo no Nordeste do Brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, n.1, p.21-25, 2009.

LIVAK, KJ. et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl.**, Cold Spring Harbor Laboratory Press., Vol.4, pp. 357–62, 1995.

MAGALHÃES, A; et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp. Biochem. Phys., Part C**, v.146, p.565 – 575, 2007.

MAGALHÃES, O. Campanha antiofídica em Minas Gerais. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v.56, p.291-371, 1958.

MÁLAQUE, CMS; FRANÇA, FOS. 2007. Acidente botrópico p.72-86. In: CARDOSO, JLC; FRANÇA, FOS; WEN, FH; MÁLAQUE, CMS; HADDAD, VJR (Eds). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo, Sarvier, FAPESP, 468p.

MARIZ, I. 2004. Identificação de serpentes de importância médica do estado de Pernambuco. Monografia de conclusão de curso, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 45p.

MARLAS, G. Purification and preliminary structure of a potent platelet aggregating glycoprotein isolated from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Toxicon**, v.20, n.1, p.289-90. 1982.

MARQUES, OAV; ETEROVIC, A; SAZIMA, I. 2001. **Serpentes da Mata Atlântica. Guia ilustrado para a Serra do Mar**. Ribeirão Preto. Holos editora Ltda.

MARTINS, AM; et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v.40, n.8, p.1165-171. 2002.

MARUYAMA, J; HAYASHI, H; MIAO, J; SAWADA, H; ARAKI, S. Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases. **Toxicon**, v.46, n.1, p.1-6, 2005.

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.** v.86, p.549–556, 1992.

MASUDA, S; ARAKI, S; YAMAMOTO, T; KAJI, K; HAYASHI, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. **Biochem Biophys. Res. Commun.**, v.235, n.1, p.59-63, 1997.

MASUDA, S; HAYASHI, H; ARAKI, S. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family. **Eur. J. Biochem.**, v.253, n.1, p.36-41, 1998.

MASUDA, S; HAYASHI, H; ATODA, H; MORITA, T; ARAKI, S. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. **Eur. J. Biochem.**, v.268, n.11, p.3339-3345, 2001.

MATSUI, T; FUJIMARA, Y; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostatic and thrombosis. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1477, p.146-156, 2000.

MELGAREJO, AR. 2003. *Serpentes Peçonhentas do Brasil*. In: Cardoso, J.L.C., et al. Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier Editora.

MIDDLEBROOK, LL. 1991. Molecular Cloning of Snake Toxins and other venom components. *In: Handbook of Natural Toxins, Vol. 5, Reptile Venoms and Toxins*. Pp 281-295, Ed Tu, AT., Marcel Decker Inc., New York, NY.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. 1998. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, COMED/ASPLAN/FNS.

Ministério da Saúde, M. (2007). Composição dos Colegiados de Gestão Regional, nome, código IBGE e população dos Municípios do Estado de Pernambuco.

MISE, YF; LIRA-DA-SILVA, RM; CARVALHO, FM. Envenenamento por serpentes do gênero Bothrops no estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, p.569-573, 1997.

MODESTO, JCA; et al. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from Bothrops erythromelas venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v.72, n.3, p.377-384, 2006.

MOSMANN, MN. 2001. *Guia das principais Serpentes do Mundo*. Canoas, Ed. Ulbra, 367p.

MOURA-DA-SILVA, AM; et al. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v.26, p.2000-2005. 1996b.

NAHAS, L; KAMIGUTI, AS; BARROS, MA. Thrombin-like and factor X-activator components of Bothrops snake venoms. **Thromb. Haemostasis**, v.41, p.314–328. 1979.

NOVAIS, CM; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**. v.33, p.10-3, 2005.

OLIVEIRA, DA; et al. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. **Brain. Res. Bull.**, v.75, n.5, p.629-639, 2008.

OUYANG, C; TENG, CM; HUANG, ETF. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v.30, n.9, p.945-966. 1992.

PAINE, MJI; HOWARD, PD; THEAKSTON, RDG; CRAMPTON, JM. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p.22869-22876, 1992.

PENTEADO, DC. Accidentes ophidicos: Efeitos do tratamento específico sobre a mortalidade ophidica. In: *Coletânea dos Trabalhos do Instituto Butantan 1901-1917* (Instituto Butantan, org.), pp. 325-331, São Paulo: Instituto Butantan. 1918.

PINHO, M. S. S. **Levantamento dos acidentes ofídicos ocorridos na Região Metropolitana do Recife**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 42p. 2002.

PINHO, MSS. Purificação e caracterização parcial de duas toxinas hemorrágicas da peçonha de jararaca malha de cascavel, *Bothrops erythromelas* (SERPENTES, VIPERIDAE). 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco.

POUGH, FH; HEISER, JB; McFARLAND, WN. 1999. **A vida dos vertebrados**, 2ª edição, editora Atheneu, São Paulo.

PRIANTI JR, ACG; et al. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**, v.41, p.595–603, 2003.

RÁDIS-BAPTISTA, G. Integrins, cancer and snake toxins (mini-review). **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v.11, n.3, p.217-241, 2005.

RÁDIS-BAPTISTA, G; et al. Crotaletin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell Biochem Biophys.**, v.44, n.3, p.412-23, 2006.

RANGEL-SANTOS, A; DOS-SANTOS, EC; LOPES-FERREIRA, M; LIMA, C; CARDOSO, DF; MOTA,EII. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v.43, n.7, p.801-10. 2004.

ROCHA, ML; VALENÇA, RC; MAIA, MBS; GUARNIERI, MC; ARAUJO, IC; ARAUJO, DAM. Pharmacokinetics of the venom of *Bothrops erythromelas* labeled with 131I in mice. **Toxicon**, v.52, n.3, p.526-529. 2008.

RODRIGUES, MT. 2003. *Herpetofauna da Caatinga*. In: Leal, I. R.; M. Tabarelli, e J. M. C. Silva. *Ecologia e conservação da Caatinga*. Ed. Universitária UFPE. Recife.

ROSENFELD, G; HAMPES, OG; KELEN, EMA. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Mem. Inst. Butantan**, v.59, p.143–163, 1959.

RUSSEL, FE; WALTER, FG; BEY, TA; FERNANDEZ, MC. Snakes e snakebite in Central America. **Toxicon**. v.35, n.10, p. 1469-1522. 1997

SANCHES, EF; et al. Biological activities of venom from South American snakes. **Toxicon**, v.30, n. 1, p.95-103, 1992.

SANCHEZ, EF; SANTOS, CI; MAGALHÃES, A; DINIZ, CR; FIGUEIREDO, S; GILROY, J; RICHARDSON, M. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.378, p.131–141, 2000.

SANTORO, ML; et al. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v.122, n.1, p.61-73. Erratum in: 1999. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v.123, n.3, p.293. 1999.

SCARABOUGH, RM; ROSE, JW; NAUGHTON, MA; *et al.* Characterization of the integrin-specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p.1058–1065, 1993.

SERAPICOS, EO; MERUSSE, JLB. Variação de peso e sobrevivência de *Micrurus corallinus* sob diferentes condições de alimentação em biotério (Serpentes, Elapidae). **Iheringia, Sér. Zool.**, v. 92, n.4, 2002.

SILVA, MB; et al. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem. J.**, v.369, p. 129-139. 2003.

SILVA, ST; TIBURCIO, ICS; CORREIA, GQC; AQUINO, RCT. 2005. Escorpiões, Aranhas e Serpentes: aspectos gerais e espécies de interesse médico no Estado de Alagoas. Maceió, Editora UFAL, 54p.

SILVA, XV. 2000. Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). São Paulo. Tese de doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (1B-USP), 134p.

SOARES-DA-SILVA, MM. 2001. Identificação de serpentes coletadas no Estado de Pernambuco In Centro de Ciência Biológicas, Volume Bacharel. (Recife: Universidade Federal de Pernambuco), 63p.

STELLA, R; ZAMUNÉR, MACH; CORRADO, AP; HYSLOP, S; SIMIONI, LR. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v.44, p.259–271, 2004.

STOCKER, KF. 1990. Composition of snake venoms. In: STOCKER, K. F. **Medical use of snake venoms proteins**. Boca Raton: CRC Press, p. 97-161.

STÖCKER, W; et al. The metzincins – Topological and sequential relations between astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, v.4, p.823-840, 1995.

ELADIO, F; et al. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Arch. Bioch. Bioph.**, v.468, p.193–204, 2007.

SWENSON, S; RAMU, S; MARKLAND, FS. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. **Curr Pharm Des.**, v.13, n.28, p.2860-2871. 2007.

TAMBOURGI, DV; SANTOS, MC; FURTADO, MF; FREITAS, MC; DA SILVA, WD; KIPNIS, TL. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. **Br. J. Pharmacol.**,v.112, n.3, p.723-727, 1994.

TORRES, BS. 1995. Alterações pulmonares provocadas pelo veneno da *Bothrops erythromelas*: estudo experimental em cães. Dissertação de Mestrado, Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 123p.

TOYAMA, OD; et al. Structure-function relationship of new crotoamine isoform from the *Crotalus durissus cascavella*. **Protein J.**, v.24, n.1, p.9-19, 2005.

TRUMMAL, K; et al. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. **Toxicon**, v.46, n.1, p.46-61, 2005

VALENÇA, RC. 1997. Estudo do processo hemorrágico induzido pela peçonha de *Bothrops erythromelas*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 61p.

VANZOLINI, PE; COSTA, AMMR; VITT, LJ. Répteis da Caatinga. Rio de Janeiro. **Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**. 1980.

VANZOLINI, PE; COSTA, AMMR; VITT, LJ. 1980. **Répteis da Caatinga**. Rio de Janeiro. Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT).

VASCONCELOS, CML; et al. Distribution of ¹³¹I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. **Braz. Jour. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 439-443, 1998.

WILHELM, J; PINGOUD, A; Real-time polymerase chain reaction. **ChemBiochem**, v.4, n.11, p.1120-1128, 2003.

WITWER, C.T; HERRMANN, MG; GUNDRY, CNE; ELENITOBA-JOHNSON, KSJ. Real-Time Multiplex PCR Assays. **Methods**, v.25, p.430-442, 2001.

YOU, WK; SEO, HJ; CHUNG, KH; KIM, DS. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. **J. Biochem.** v.134, p.739-749, 2003.

3. OBJETIVOS

3.1 Estudos epidemiológicos

1. Contribuir para a melhoria das informações disponibilizadas no país referente aos acidentes ofídicos de Pernambuco.
2. Apresentar o perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos desde a fundação do Centro de Referência em acidente ofídico de Pernambuco.
3. Relatar um caso específico de acidente raro.

3.2 Estudos moleculares

1. Clonar e analisar quantitativamente genes precursores distintos de metalloproteases indutoras de apoptose vascular em espécies de viperídeos representantes da América do Sul.

Apêndices

Manuscrito de artigo científico 1

Correia, et al., 2011

Acidentes Ofídicos de Importância Médica no Estado de Pernambuco Atendidos no CEATOX-HR (1992-2009).

Será enviado a Toxicon

Acidentes Ofídicos de Importância Médica no Estado de Pernambuco Atendidos no CEATOX-HR (1992-2009)

Venomous Snakebite Accidents in the State of Pernambuco Attended at CEATOX-HR (1992-2009)

Correia, Juliana Mendes^{1,2,3}; Escobar, José Arturo Costa⁴; Santana-Neto, Pedro de Lima^{5,6}; Pinho, Milena Sardou Sabino⁵; Amorim, Maria Lucineide Porto⁶; Guarnieri, Miriam Camargo⁵; Brayner, Fábio^{2,3}; Alves, Luiz Carlos^{2,3}; Lima-Filho, José Luiz de²

¹PPG on Biology Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³Department of Parasitology, Research Center Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brazil.

⁴PPG on Cognitive Psychology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁵Department of Zoology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁶Center of Toxicological Assistance, Hospital da Restauração, Recife, PE, Brazil.

Resumo

Acidentes ofídicos caracterizam-se como problema de saúde pública, causando danos e sofrimento ao acidentado, podendo levar a óbito. Estima-se uma média de 20000 acidentes/ano no Brasil, a maioria provocada por serpentes do gênero *Bothrops*. Os levantamentos epidemiológicos em Pernambuco são incompletos, e aqueles voltados aos protocolos do CEATOX-HR encontram-se atualmente defasados. Nosso estudo atualiza o conhecimento acerca de todos os acidentes ofídicos peçonhentos atendidos desde a fundação do referido centro toxicológico, e lança nova luz na compreensão dos padrões de acidentes no estado. Os dados foram analisados com o auxílio do *software Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 14.0. No período de 1992-2009 foram atendidos 821 casos de importância médica, média de 45,6 casos/ano. Os acidentes crotálicos predominaram nas cidades abrangidas pela I Gerência Regional de Saúde (GERES), enquanto os acidentes botrópicos aumentam em frequência nas cidades distantes da Zona da Mata, em regiões áridas. Mais da metade dos casos atendidos no CEATOX foram oriundos de cidades abrangidas por outras GERES. Os casos de óbito se deveram principalmente a fatores como o tempo levado desde o acidente ao atendimento, à distância de deslocamento e a faixa etária, do que pelo gênero de serpente envolvida no acidente. Evidencia-se aqui a necessidade de um levantamento mais amplo, a fim de elucidar completamente o ofidismo no estado de Pernambuco, .

Palavras-Chave: Ofidismo, Serpentes, Epidemiologia, Nordeste, *Crotalus*, *Bothrops*, Viperidae, Elapidae, Distribuição Geográfica.

Abstract

Snake accidents are characterized as public health problems that cause damage and suffering in man, some evolving to death. About 20000 accidents each year occur in Brazil, the majority provoked by snakes of genus *Bothrops*. The epidemiological data from Pernambuco are incomplete and those researches on protocols of CEATOX-HR (Center of Toxicological Assistance – Hospital da Restauração) are actually lagged. Our study actualize the knowledge of all venomous snake cases attended at CEATOX-HR since its foundation, and points to a new comprehension on patterns of these accidents in the state. Data were analyzed using version 14.0 of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software. In the period of 1992-2009 were attended 821 cases, mean of 45.6 cases/year. The crotalic accidents were predominant in the cities included to the I Regional Department of Health (GERES), although bothropic cases increase in frequency in the cities distant from forest and coastline zones, in arid regions. More than a half of attended cases at CEATOX were derived from cities included in other GERES. Death cases occurred meanly by the factors as the time since accident and attendance, distance of displacement and age group, than the genus of the snake causer of the accident. Here are evident the necessity of a major epidemiological study in the direction of a complete knowledge about snakebite in the state of Pernambuco.

Keywords: Snakebite, Snakes, Epidemiology, Northeastern, *Crotalus*, *Bothrops*, Viperidae, Elapidae, Geographical Distribution.

Introdução

Existe no Brasil uma diversidade de 365 espécies de serpentes distribuídas em 75 gêneros, sendo apenas quatro desses gêneros de elevada importância médica: *Caudisoma* (cascavéis), *Bothrops* (jararacas), *Bothriopsis*, *Lachesis* (surucucus) e *Micrurus* (corais-verdadeiras). Estes gêneros reunidos apresentam 59 espécies peçonhentas (16% das espécies catalogadas no país) ocorrentes em diferentes regiões do território nacional e que podem provocar envenenamentos sérios com necessidade de intervenções médicas apropriadas de acordo com cada gênero .

Em recente publicação sobre os levantamentos de serpentes de interesse médico na Região Nordeste é citado a ocorrência de cinco espécies de jararacas no estado de Pernambuco (*Bothropoides erythromelas*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops lutzi*, *Bothrops moojeni* e *Bothriopsis bilineata*), uma única espécie de cascavel (*Crotalus durissus*) e surucucu (*Lachesis muta*), além de três espécies de corais-verdadeiras (*Micrurus coralinus*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*), representando

17% das espécies peçonhentas do país. Cabe notar também que *Crotalus durissus*, *B. erythromelas* e *B. leucurus* são espécies cosmopolitas nos estados nordestinos . Há ainda registro de ocorrência da espécie *B. neuwiedi piauhyensis* na região do São Francisco , entretanto esta espécie foi sinonimizada com *B. lutzi* consideradas assim como uma única espécie .

As serpentes citadas anteriormente, juntamente com espécies não-peçonhentas de interesse médico provocam os diversos acidentes na região . Levando em consideração o levantamento nacional de acidentes ofídicos no período de 1993 a 1995, acontecem anualmente em média cerca de 20.000 acidentes, sendo 12,7% ocorrentes na Região Nordeste. Os coeficientes de incidência nacional foram em média de 13,5 acidentes/100000 habitantes, sendo a região Nordeste com a menor taxa de incidência em comparação com as demais regiões (6,84/100000 habitantes). Porém, no Nordeste as taxas de mortalidade são elevadas (0,81%), sendo a taxa de letalidade nacional naquele período de 0,45%. Os acidentes botrópicos são os mais evidentes, constituindo 73,1% da totalidade de todos os acidentes ofídicos no Brasil, ou 90,5% dos acidentes ofídicos, considerando apenas os acidentes de importância médica. A sazonalidade de acidentes no Nordeste foi de janeiro a maio. As pessoas do sexo masculino são mais acometidas (70%), A letalidade nacional por gênero de serpentes foi de 1,87% para *Crotalus*, seguido de *Bothrops* (0,31%), *Lachesis* (0,95%) e *Micrurus* (0,36%) .

Segundo os dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), no período de 1999 a 2003, a região Nordeste apresentou 15.345 casos de acidentes por serpentes, em média 3069 casos/ano, com incidência de 4,57 casos/100000 habitantes. A Bahia foi o estado que apresentou maior número de casos (8.599, média de 1.719,8 casos/ano) e maior incidência média (13,16 casos/100000 hab.) no período, seguida do Maranhão (2.871 casos, média de 574,2 casos/ano e 10,16 casos/100000 hab.). Alagoas ocupou o terceiro lugar em incidência (5,74 casos/100000, 680 casos), seguido de Ceará (3,24 casos/100000, 1203 casos), Piauí (2,86 casos/100000, 406 casos), Pernambuco (2,81 casos/100000, 1113 casos), Paraíba (2,03 casos/100000, 350 casos), Sergipe (0,72 casos/100000, 65 casos) e Rio Grande do Norte (0,42 casos/100000, 58 casos). Os estados com maiores taxas de letalidade foram Rio Grande do Norte, Piauí e

Pernambuco . É importante notar pelo conjunto de dados apresentados o descaso com o repasse de informações dos estados para o sistema nacional, dificultando o conhecimento pleno acerca da epidemiologia de acidentes ofídicos, principalmente no Nordeste brasileiro .

Estudos epidemiológicos anteriores no estado de Pernambuco no período de 1992 a 1994 indicaram uma incidência de 47% de acidentes botrópicos na Região Metropolitana do Recife, com letalidade de 0,6% . Levantamentos epidemiológicos mais abrangentes no estado no período de 1995 a 1997, com dados do SINAN, registraram 940 casos de acidentes ofídicos, em média 313,3 acidentes/ano, sendo a maioria ocorrente na Zona Rural. A incidência estadual dos acidentes foi calculada como sendo 4,23/100000 habitantes, que ao serem observadas quanto à zona atingida, rural ou urbana, foram respectivamente de 13,11/100000 e 1,11/100000 habitantes. As regiões semi-áridas do agreste e sertão constituíram 82,7% dos casos. Foi observada uma prevalência de acidentes botrópicos no estado de 58,5% (n= 550), seguido dos acidentes crotálicos de 13,5% (n= 126), elapídicos (2%, n= 19) e laquéticos (0,4%, n= 4). Em 25% dos casos não foi informado o gênero da serpente causadora do acidente (n=235) e 0,6% dos acidentes foi provocado por serpentes não peçonhentas (n= 6). Desconsiderando os casos não informados e não peçonhentos, os acidentes botrópicos constituíram 78,7% dos acidentes e os crotálicos 18%, sendo os primeiros prevalentes em todas as antigas DARES (Diretorias Regionais de Saúde). A letalidade no estado foi calculada em 0,85% (n= 9), sendo 0,72% para o gênero *Bothrops* e 2,38% para *Crotalus* .

Para a Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, os municípios pernambucanos estão agrupados em 10 Gerências Regionais de Saúde (GERES), sediadas em municípios centralizados pela sua situação geográfica e/ou pela sua importância político-econômica e populacional. A primeira GERES está localizada na Região Metropolitana do Recife (RMR), sendo o CEATOX, localizado no Hospital da Restauração - PE, a única unidade aplicadora de soro antiofídico.

Visto a escassez de conhecimento epidemiológico de acidentes ofídicos no Nordeste e no estado de Pernambuco, o presente estudo representa um passo na direção do conhecimento pleno dos acidentes ofídicos no estado, considerando um mapeamento por municípios e por tipos de acidentes em todos os registros

ofídicos na I Gerência Regional de Saúde (GERES), centro de referência estadual no atendimento toxicológico de abrangência de apenas 10,3% da totalidade de municípios do estado, mas que em realidade atende acidentes oriundos de outras GERES e também de outros estados.

Dessa maneira o objetivo do presente estudo é apresentar os resultados referentes aos acidentes ofídicos quanto ao ano de ocorrência, tipos de serpentes envolvidas e distribuição espacial no estado, discutindo com os escassos estudos epidemiológicos do estado, sendo os resultados do levantamento epidemiológico dos acidentes registrados no CEATOX-HR (I GERES), realizado por nosso grupo de pesquisas.

Metodologia

Os casos de acidentes ofídicos do presente estudo foram levantados a partir dos registros de protocolos do Centro de Assistência Toxicológica do Hospital da Restauração (CEATOX-HR), localizado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, indexado a I Gerência Regional de Saúde (I GERES), unidade de abrangência aos casos de intoxicação em 10,3% das cidades do estado (n= 19), ocorridas na capital e Região Metropolitana e algumas cidades da Zona da Mata (Abreu e Lima, Araçoiaba, Cabo de Santo Agostinho, Camaragibe, Chã Grande, Fernando de Noronha, Goiana, Igarassu, Ipojuca, Ilha de Itamaracá, Itapissuma, Jaboatão dos Guararapes, Moreno, Olinda, Paulista, Pombos Recife, São Lourenço da Mata e Vitória de Santo Antão) . Consideramos os protocolos de acidentes no período de 1992 a 2009, perfazendo assim todos os acidentes ofídicos de importância toxicológica registrados desde a fundação do CEATOX-HR até o momento atual.

Casos de acidentes ofídicos não-peçonhentos ou sem importância médica foram excluídos da análise. A presente análise de dados buscou identificar os casos apresentados pelo CEATOX-HR de acordo com as cidades e GERES de origem dos acidentes, ano, sazonalidade, tipos de serpentes envolvidas e óbitos. Os dados foram analisados no pacote estatístico SPSS versão 13.0.

Resultados e Discussão

No período de 1992 a 2009 foram notificados 821 casos de acidentes causados por serpentes peçonhentas no CEATOX-HR (I GERES), atendendo em média 45,6 casos/ano, com incidência de 0,49 acidentes/100000 hab. A incidência dos acidentes foi considerada relativamente baixa quando comparada a média de incidência para o Nordeste (7,6 acidentes/100000 hab) e expressivamente baixa, 28 vezes menor, quando comparada a média nacional (13,9 acidentes/100000 hab) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A maioria dos acidentes foi provocada pelo gênero *Crotalus* (n= 524; 63,8%), seguido dos acidentes para o gênero *Bothrops* (n= 234; 28,5%), *Lachesis* (n= 20; 2,4%) e *Micrurus* (n= 7; 0,9%). Esta alta incidência de acidentes crotálicos em relação aos botrópicos contradiz a estatística nacional de pelo menos 108 anos de estudos epidemiológicos do acidente ofídico (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; PINHO; PEREIRA, 2001). Como neste estudo foram analisados dados de 18 anos, uma amostra bastante significativa, podemos afirmar que o gênero *Crotalus* é o responsável pela maioria dos acidentes na RMR e esse fato se harmoniza com a atual distribuição geográfica da subespécie *Crotalus durissus cascavella* endêmica da caatinga nordestina (SOARES, 2001; PINHO, 2002; MARIZ, 2004; OBSERVAÇÃO PESSOAL).

Em trinta e seis casos não foram informados nos protocolos o tipo de serpente envolvida no acidente, constituindo um total de 4,4% dos casos, sendo que em 22 destes foram administradas a soroterapia e os demais 14 considerados na análise apenas por terem sido registrados como casos peçonhentos, subnotificados quanto ao tipo de acidente e realização de soroterapia, mesmo assim a subnotificação foi baixa comparada a outros estudos (FEITOSA, MELO et al. 1997; ALBUQUERQUE, COSTA et al. 2005; ALBUQUERQUE, FERNANDES et al. 2005; LEMOS, ALMEIDA et al. 2009).

Os acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR deveriam se restringir para as cidades pernambucanas abrangidas pela I GERES (Figura 1), observamos que mais da metade dos casos (49,6%) provêm de outras cidades incluídas nas demais GERES, 4,5% dos casos são oriundos de outros estados (n= 37) e apenas 42,9% dos casos (n= 352) oriundos da I GERES e em 3% dos casos (n= 25) não foi informado a

GERES de origem (Tabela 1). Nenhum acidente ocorrido na GERES VIII foi encaminhado ao CEATOX-HR.

Não sabemos o real motivo da imigração de pacientes provenientes de outros estados, principalmente Paraíba e Bahia, porém podemos supor que o CEATOX-HR seja a unidade de referência no atendimento mais próxima do local de acidente e/ou mais conhecida talvez por ser de referência e também por estar situada na capital pernambucana, entretanto o aumento do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento certamente agrava o quadro clínico do paciente visto que as toxinas da peçonha continuam circulantes e ativas.

A incidência de acidentes para as demais GERES não foi calculada visto que não foram coletados dados dos acidentes atendidos em suas unidades de referência, e a apresentação desses resultados apenas se demonstrarão confusos e irreais.

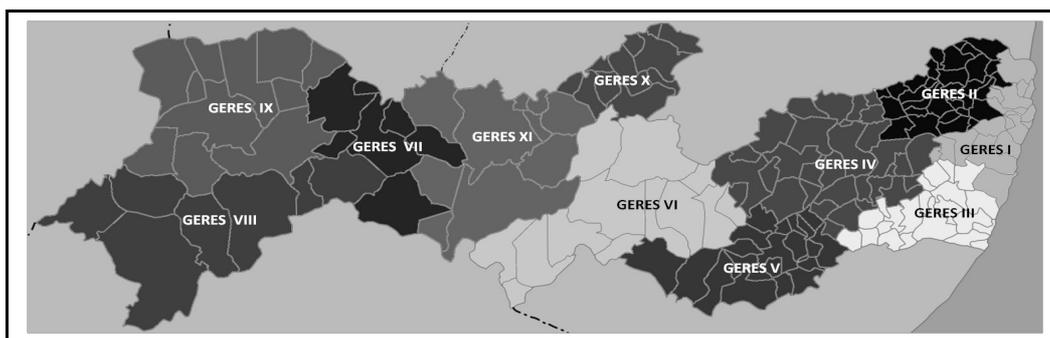


Figura 1. Distribuição dos municípios do estado de Pernambuco quanto às Gerências Regionais de Saúde (GERES).

Excetuando-se os dados apresentados para a I GERES, não informados (concomitantemente GERES e gênero de serpente, n= 25) e dados de outros estados (n=37), verificou-se 56,02% de acidentes crotálicos (n= 407), seguido de 36,86% de acidentes botrópicos, acidentes laquéticos (3,44%) e acidentes elapídicos (0,49%). Em 3,19% dos casos não foi informado o gênero causador do acidente.

Avaliando apenas os acidentes ocorridos nas cidades abrangidas pela I GERES foi possível verificar que a ocorrência de 352 acidentes (42,9% do total de casos registrados no CEATOX-HR). Os acidentes crotálicos foram os mais prevalentes (77%), seguido dos acidentes botrópicos (15%) e acidentes elapídicos e laquéticos com taxas iguais (1%). Em 6% dos casos não foi informado o gênero

causador da serpente. A taxa anual de acidentes na I GERES foi 19,56 casos/ano e a incidência foi 0,49/100000 habitantes.

Realizamos uma análise de variância considerando como fator principal o Tipo de Acidente e a variável dependente GERES de origem do acidente, encontrando diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2= 102,912$; g.l.= 3; $p<0,001$). Nesta análise excluímos os casos onde não foi informado a GERES, analisando assim 760 casos. Análises *a posteriori* demonstraram diferenças entre os acidentes crotálicos e botróticos ($p<0,001$), crotálicos e laquéuticos ($p= 0,021$) e botróticos e elapídicos ($p= 0,016$). Com o intuito de identificar as diferenças entre a variável GERES em relação ao tipo de acidente, realizamos nova análise de variância considerando agora a variável GERES como fator principal e Tipo de Acidente como variável dependente. A interação entre a GERES e o tipo de acidente foi estatisticamente significativa ($\chi^2= 178,009$; g.l.= 10; $p<0,001$). Análises *a posteriori* revelaram diferenças entre I e II GERES ($p<0,001$), I e IV GERES ($p<0,001$), I e V GERES ($p<0,001$), I e VI GERES ($p<0,001$), I e X GERES ($p<0,01$), I e XI GERES ($p<0,01$), I GERES e outros estados ($p<0,001$), II e III GERES ($p<0,001$), III e IV GERES ($p<0,001$), III e V GERES ($p<0,001$), III e VI GERES ($p<0,001$), III e X GERES ($p<0,001$), III e XI GERES ($p<0,001$), III GERES e outros estados ($p<0,001$), e VI e VII GERES ($p= 0,015$) (Tabela 1). Essas análises afirmam que há diferença entre o tipo de acidente e local de ocorrência.

Tabela 1. Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR no período de 1992 a 2009, de acordo com o tipo de acidente e as GERES de origem dos acidentes. (*NI= não informado).

Gerência Regional de Saúde	Tipo de Acidente					Total	
	NI*	Crotálico	Botrótico	Laquéutico	Elapídico	N	%
NI*	0	16	8	0	1	25	3
I GERES	21	271	52	4	4	352	42,9
II GERES	3	20	29	6	1	59	7,2
III GERES	6	140	8	5	0	159	19,4
IV GERES	2	44	74	0	1	121	14,7
V GERES	1	9	12	2	0	24	2,9
VI GERES	1	3	18	0	0	22	2,7
VII GERES	0	5	2	0	0	7	0,9
IX GERES	0	2	0	0	0	2	0,2
X GERES	0	1	3	0	0	4	0,5
XI GERES	0	4	4	1	0	9	1,1

Outros Estados	2	9	24	2	0	37	4,5
Total	n	36	524	234	20	7	821
	%	4,4	63,8	28,5	2,4	0,9	100

A Tabela 2 apresenta a distribuição percentual dos casos de acidentes ofídicos nas cidades pernambucanas no período investigado e segundo o tipo de serpente causadora dos acidentes. Em apenas 25 casos (3,05%) não foram informadas as cidades de origem dos acidentes. Trinta e sete casos atendidos no CEATOX-HR foram oriundos de outros estados (4,4%). Observamos no período pesquisado a ocorrência de acidentes em 114 cidades pernambucanas (61,6% de todos os municípios), sendo aquelas com maior frequência de casos Cabo de Santo Agostinho (52 casos), Jaboatão dos Guararapes (51 casos) e Recife (48 casos), estas abrangidas pela I GERES.

Tabela 2. Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR no período de 1992 a 2009, de acordo com o tipo de acidente e as cidades de origem dos acidentes. * NI= não informado. ** C= crotálico, B= botrópico, L= laquético, E= elapídico, n= total de casos/cidade.

Cidades	Tipo de acidente (%)**						Cidades	Tipo de acidente (%)**					
	NI*	C	B	L	E	n		NI*	C	B	L	E	n
NI*	0,0	64,0	32,0	0,0	4,0	25	Jupi	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Abreu e Lima	5,0	95,0	0,0	0,0	0,0	20	Jurema	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	2
Afogados da													
Ingazeira	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	3	Lagoa do Itaenga	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Agrestina	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Lagoa do Ouro	0,0	25,0	25,0	50,0	0,0	4
Água Preta	9,1	90,9	0,0	0,0	0,0	22	Lagoa dos Gatos	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1
Águas Belas	0,0	42,9	57,1	0,0	0,0	7	Limoeiro	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	2
Alagoinha	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2	Macaparana	14,3	28,6	42,9	0,0	14,3	7
Altinho	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2	Machados	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1
Amaraji	11,1	88,9	0,0	0,0	0,0	9	Maraial	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1
Araçoiaba	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	2	Mirandiba	0,0	66,7	33,3	0,0	0,0	3
Arcoverde	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	3	Moreilândia	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1
Barra de	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Moreno	0,0	72,7	27,3	0,0	0,0	11

Guabiraba													
Barreiros	9,1	81,8	9,1	0,0	0,0	11	Nazaré da Mata	0,0	50,0	25,0	25,0	0,0	4
Belém de Maria	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Olinda	0,0	66,7	33,3	0,0	0,0	3
Belo jardim	0,0	62,5	37,5	0,0	0,0	8	Palmares	4,2	91,7	0,0	4,2	0,0	24
Bezerras	0,0	75,0	25,0	0,0	0,0	4	Panelas	33,3	0,0	66,7	0,0	0,0	3
Bom Jardim	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1	Paranatama	25,0	50,0	25,0	0,0	0,0	4
Bonito	0,0	83,3	0,0	0,0	16,7	6	Passira	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	2
Brejo da Madre													
de Deus	0,0	35,0	65,0	0,0	0,0	20	Paudalho	0,0	46,7	40,0	13,3	0,0	15
Buíque	0,0	16,7	83,3	0,0	0,0	6	Paulista	12,5	75,0	12,5	0,0	0,0	16
Cabo de Sto													
Agostinho	5,8	90,4	1,9	0,0	1,9	52	Pedra	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	2
Caetés	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1	Pesqueira	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	6
Camaragibe	4,5	63,6	22,7	9,1	0,0	22	Petrolândia	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1
Camutanga	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Pombos	0,0	80,0	20,0	0,0	0,0	5
Canhotinho	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Primavera	0,0	85,7	14,3	0,0	0,0	7
Capoeiras	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1	Recife	18,8	58,3	20,8	0,0	2,1	48
Carpina	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Riacho das Almas	33,3	0,0	66,7	0,0	0,0	3
Caruaru	0,0	44,4	55,6	0,0	0,0	18	Ribeirão	0,0	94,4	5,6	0,0	0,0	18
Casinhas	50,0	0,0	50,0	0,0	0,0	2	Rio Formoso	0,0	75,0	25,0	0,0	0,0	4
Catende	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	3	Salgadinho	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Cedro	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	2	Salgueiro	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Chã de Alegria	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Saloá	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Cortês	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	5	Sanharó	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Sta Cruz da Baixa													
Cumarú	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2	Verde	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	1
Sta Cruz do													
Custódia	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1	Capibaribe	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	6
Escada	0,0	84,2	5,3	10,5	0,0	19	Chã Grande	9,5	90,5	0,0	0,0	0,0	21
Exu	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	São Bento do Una	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	6
Feira Nova	25,0	50,0	25,0	0,0	0,0	4	Sao Caetano	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2
São Joaquim do													
Floresta	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	3	Monte	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1
São Lourenço da													
Frei Miguelinho	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2	Mata	0,0	87,5	6,3	0,0	6,3	16
São Vicente													
Gameleira	0,0	90,0	10,0	0,0	0,0	10	Férrer	0,0	0,0	83,3	16,7	0,0	6
Garanhuns	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1	Serra Talhada	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	4
Goiana	11,8	29,4	58,8	0,0	0,0	17	Sertânia	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	6
Gravatá	0,0	90,9	9,1	0,0	0,0	11	Sirinhaém	0,0	75,0	8,3	16,7	0,0	12
Iati	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	2	Surubim	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2
Ibimirim	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1	Tabira	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Ibirajuba	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1	Tacaimbó	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1
Igarassu	0,0	79,2	16,7	4,2	0,0	24	Tamandaré	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	8
Taquaritinga do													
Ipojuca	0,0	95,8	4,2	0,0	0,0	24	Norte	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	3
Itacuruba	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Timbaúba	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0	3
Itaíba	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Toritama	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	1
Itamaracá	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	3	Tupanatinga	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2
Itapissuma	0,0	85,7	14,3	0,0	0,0	7	Verdejante	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1
Itaquitinga	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Vertentes	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	4
Jaboatão dos													
Guararapes	2,0	70,6	23,5	2,0	2,0	51	Vicencia	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	2
Vitória de Santo													
Jaqueira	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	1	Antão	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	10
Jataúba	0,0	16,7	83,3	0,0	0,0	6	Xexéu	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1
Joaquim Nabuco	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	2	Outro estado	5,4	24,3	64,9	5,4	0,0	37

O estado de Pernambuco é subdividido em seis diferentes regiões, principalmente devido ao clima: Região Metropolitana, Zona da Mata, Agreste, Sertão e São Francisco (Figura 2-A). Os acidentes elapídicos foram raros, existentes apenas nas cidades de Bonito (IV GERES), Macaparana (II GERES), Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, Recife e São Lourenço da Mata (I GERES), com um caso cada de um total de sete casos registrados no período de 1992-2009, sendo um dos casos não informado a cidade de origem do mesmo. Os acidentes laquéticos ocorreram em 11 diferentes cidades, sendo a maioria delas pertencentes às GERES I e III. Em Lagoa do Ouro (V GERES), Santa Cruz da Baixa Verde (XI GERES) e Timbaúba (II GERES) prevaleceram os acidentes laquéticos. A maioria dos acidentes elapídicos e laquéticos ocorreu em cidades da Região Metropolitana e Zona da Mata, e apenas a cidade de Jaboatão dos Guararapes apresentou ocorrência de ambos os tipos de acidentes. Também foi observada a ocorrência de acidente elapídico em uma cidade do Agreste, bem como acidentes laquéticos foram observados em uma cidade do Agreste e uma do Sertão (Figura 2-B).

A prevalência de acidentes crotálicos ocorre em praticamente todas as cidades, entretanto, em 43 cidades os acidentes botrópicos foram mais freqüentes que os crotálicos, sendo 39,5% destas pertencentes à IV GERES, 20,9% pertencentes à II GERES, a V e VI GERES apresentaram 14% cada, e demais GERES atingidas foram a I, VII, X e XI GERES. A II, IV, V, VI e X GERES ainda apresentaram prevalência de acidentes botrópicos sobre os crotálicos. Na I GERES apenas a cidade de Goiana apresentou maior número de acidentes botrópicos. Os Acidentes botrópicos se estenderam desde a Região Metropolitana e Zona da Mata, também se concentrando em diversas cidades do Agreste, Sertão e São Francisco (Figura 2-C). Os acidentes crotálicos se concentraram nas cidades da Região Metropolitana e Zona da Mata, mas também foram observados casos em cidades do Agreste, São Francisco e Sertão, embora em menor proporção do que os acidentes botrópicos

nessas regiões. Os acidentes crotálicos foram prevalentes na I, III, VII e IX GERES (Figura 2-D).

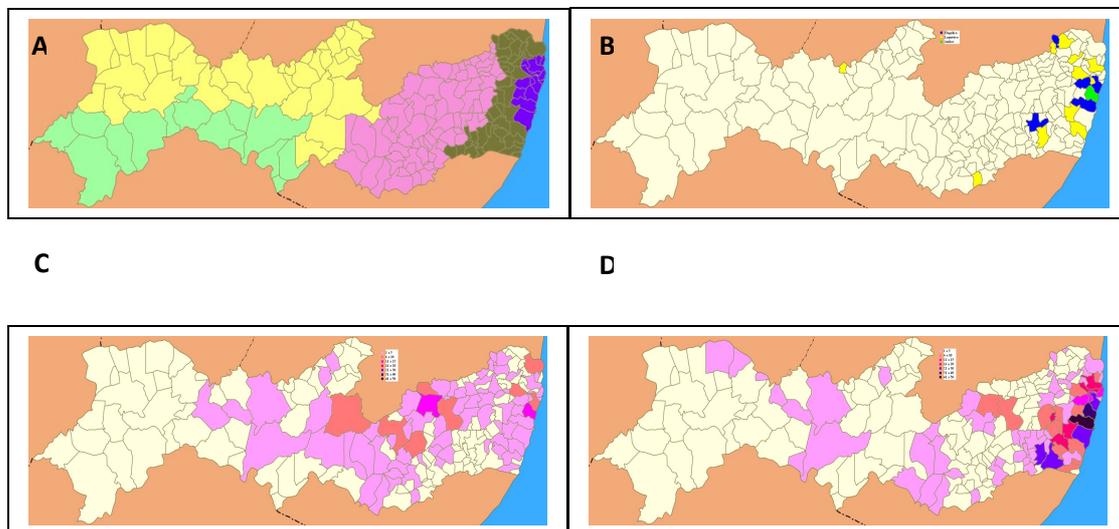


Figura 2. A) Subdivisão estadual em regiões climáticas e Região Metropolitana. ► Região Metropolitana, ► Zona da Mata, ► Agreste, ► Sertão e ► São Francisco; B) Distribuição dos acidentes elapídicos e laquéuticos nos municípios pernambucanos. ► Acidentes elapídicos, ► Acidentes laquéuticos e ► Ambos; C) Distribuição dos acidentes botrópicos nos municípios pernambucanos. Legenda de acordo com o número de casos por cidade, ► 1-5, ► 6-10 e ► 11-15. D) Distribuição dos acidentes crotálicos nos municípios pernambucanos. Legenda de acordo com o número de casos por cidade, ► 1-5, ► 6-10, ► 11-15, ► 16-20, ► 21-30, ► 31-40 e ► 41-50.

Novamente verificou-se prevalência do acidente crotálico em relação ao botrópico no estado, porém quando comparamos os percentuais obtidos das outras GERES e da GERES I podemos indicar um padrão de acidente, onde os acidentes crotálicos aumentam em direção ao litoral com diminuição dos botrópico, enquanto os acidentes botrópicos aumentam em direção ao interior do estado com relativa diminuição dos acidentes crotálicos. Entretanto os dados obtidos das outras GERES são incipientes sendo necessária uma melhor amostragem para confirmar nossa hipótese.

Foram notificados 12 óbitos nos casos atendidos no CEATOX-HR durante o período de 1992 a 2009, sendo 58,3% (n= 7) destes provocados por serpentes do

gênero *Crotalus*. Os óbitos provocados por *Bothrops* aconteceram em cidades da II (n= 1), IV (n= 3) e XI GERES (n= 1). Os acidentes crotálicos provocaram óbitos em cidades da I (n=2), III (n= 1), IV (n= 1), V (n= 1), VII (n= 1) e XI GERES (n= 1). Análise de variância foram realizadas considerando a variável independente Óbito e variáveis dependentes Sexo, Ano, Tipo de Acidente, GERES, Tempo decorrido do acidente e Idade. Observamos diferenças estatisticamente significativas para as interações entre Óbito e Tempo decorrido do acidente ($\chi^2= 6,272$; g.l.= 1; $p= 0,012$), Óbito e GERES ($\chi^2= 7,098$; g.l.= 1; $p= 0,008$) e Óbito e Idade ($\chi^2= 8,928$; g.l.= 1; $p= 0,003$). Observamos que seis acidentes fatais aconteceram em pessoas com mais de 60 anos, quatro desses provocados por *Bothrops*. Um acidente botrópico fatal ocorreu na faixa etária de 45-59 anos. Um acidente crotálico fatal aconteceu na faixa etária < 15 anos e quatro acidentes crotálicos fatais acontecerem em faixa etária entre 16 a 44 anos. Sendo assim nossos dados corroboram com o da literatura onde os óbitos dependem do tempo de atendimento sendo mais graves em pacientes com idade acima de 60 anos (LEMONS et al., 2009; LIRA-DA-SILVA et al. 2009a; LIRA-DA-SILVA et al. 2009b).

Os acidentes ocorreram com maior frequência nos meses de março a maio, representativos 46,6% dos casos totais nos dezoito anos investigados diferindo da ocorrência nacional onde predominam de janeiro a abril associados ao aumento da temperatura e pluviosidade (MISE et al. 2007). Entretanto quando comparados o mês de ocorrência do acidente e o tipo de acidente foi possível verificar diferença estatisticamente significativa ($\chi^2= 44,331$; g.l.= 11; $p<0,001$). Análises *a posteriori* indicaram diferenças ($p<0,05$) entre os acidentes e os meses de março e julho, março e setembro, maio e julho, e junho e julho. A estatística afirma que os acidentes crotálicos se concentraram nos meses de março a maio, enquanto os acidentes botrópicos, mais esparsos, concentraram-se nos meses de abril a agosto (Figura 3). Os acidentes laquéuticos foram registrados principalmente nos meses de março a maio e setembro a outubro, enquanto os acidentes elapídicos foram registrados principalmente nos meses de setembro a dezembro.

Analisando o tipo de acidente com relação aos meses (janeiro a dezembro) e anos (1992 a 2009), excluindo apenas os casos em que o tipo de acidente não foi informado (n=785), encontramos diferenças estatisticamente significativas para a interação entre tipo de acidente e ano ($\chi^2= 13,795$; g.l.= 3; $p= 0,003$) e tipo de

acidente e mês ($\chi^2= 25,482$; g.l.= 3; $p<0,001$). Análises *a posteriori* mostraram diferenças significativas entre o tipo de acidente e ano apenas para os acidentes provocados por *Crotalus* e *Bothrops* ($p= 0,001$), e quanto à interação entre tipo de acidente e mês para *Crotalus* e *Bothrops* ($p<0,001$), *Crotalus* e *Micrurus* ($p= 0,01$) e *Bothrops* e *Lachesis* ($p= 0,036$).

Não é ao acaso que os acidentes por gênero ocorrem em determinada época do ano talvez sejam devido aos aspectos biológicos dos espécimes como forrageio e reprodução, aumento ou diminuição da temperatura e da pluviosidade, aumento da atividade humana próximo aos locais de ocorrência das serpentes (NICOLETI et al. 2010; MISE et al. 2007, ROJAS et al. 2007; PINHO et al. 2002; BORGES et al. 1999).

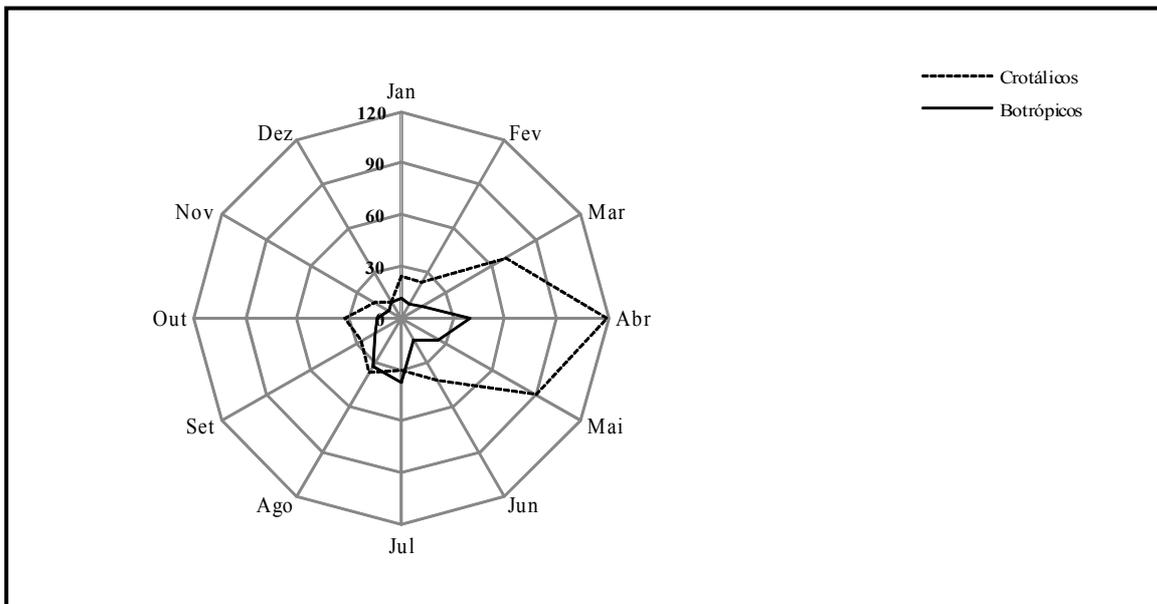


Figura 3. Sazonalidade de acidentes crotálicos (n= 524) e botrópicos (n= 234) no estado de Pernambuco registrados no CEATOX-HR, no período de 1992 a 2009.

Desde a fundação do CEATOX-HR, o ano de 2003 apresentou a maior taxa de acidentes (n=111) enquanto em 1998, primeiro ano de funcionamento, houve a menor taxa de notificações onde ocorreram apenas 17 atendimentos. Os acidentes crotálicos prevaleceram em praticamente todos os anos (47,37-95,65%) exceto no

ano de 2005 cuja prevalência de acidentes botrópicos (75%) atendidos ultrapassou o de acidentes crotáticos (18,75%) (Tabela 2). Análises de variância considerando o Ano como fator principal e variável dependente tipo de Acidente foi estatisticamente significativa ($\chi^2= 92,265$; g.l.= 17; $p<0,001$). O número de casos e percentuais de acidentes e significâncias das diferenças *a posteriori* entre os anos são sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência e porcentagens anuais de acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR no período de 1992 a 2009, de acordo com o gênero da serpente. Em destaque o único ano (2005) em que o acidente botrópico prevaleceu com relação ao crotático.

Ano	Tipo de Acidente										Total	p ($\alpha= 0,05$)	
	NI		Crotalus		Bothrops		Lachesis		Micrurus				
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%			
1992	a	1	4,17	14	58,33	8	33,33	0	0,00	1	4,17	24	-
1993	b	0	0,00	18	47,37	17	44,74	1	2,63	2	5,26	38	e,f,g,h,i,k
1994	c	0	0,00	17	65,38	8	30,77	1	3,85	0	0,00	26	-
1995	d	0	0,00	17	65,38	9	34,62	0	0,00	0	0,00	26	-
1996	e	0	0,00	22	95,65	1	4,35	0	0,00	0	0,00	23	b,h
1997	f	4	10,81	30	81,08	2	5,41	0	0,00	1	2,70	37	b,n,o,q
1998	g	2	11,76	14	82,35	0	0,00	1	5,88	0	0,00	17	b,n
1999	h	5	12,50	28	70,00	6	15,00	1	2,50	0	0,00	40	b,n,o
2000	i	0	0,00	36	85,71	6	14,29	0	0,00	0	0,00	42	b,n
2001	j	0	0,00	46	77,97	9	15,25	3	5,08	1	1,69	59	-
2002	k	11	20,75	36	67,92	6	11,32	0	0,00	0	0,00	53	b,l,m,n,o,p,q
2003	l	7	6,31	64	57,66	38	34,23	2	1,80	0	0,00	111	k,n
2004	m	3	6,98	21	48,84	18	41,86	1	2,33	0	0,00	43	K
2005	n	1	3,13	6	18,75	24	75,00	1	3,13	0	0,00	32	e,f,g,h,i,k,l,r
2006	o	0	0,00	22	55,00	14	35,00	3	7,50	1	2,50	40	f,h,k
2007	p	1	1,79	39	69,64	11	19,64	5	8,93	0	0,00	56	K
2008	q	1	1,20	42	50,60	39	46,99	0	0,00	1	1,20	83	f,k
2009	r	0	0,00	52	73,24	18	25,35	1	1,41	0	0,00	71	N

Não observamos diferenças estatísticas entre o tipo de acidente e sexo, embora 77,8% dos acidentes tenham sido acometidos em pessoas do gênero masculino, ficando claro que essa frequência é devida a casuística do encontro, pois o sexo masculino apresenta maior atividade fora do lar (ROJAS et al. 2007).

Conclusões

Crotalus durissus cascavella (cascavel) foi o principal agente etiológico dos acidentes na região metropolitana do Recife (RMR) em Pernambuco, contrariando a estatística nacional e responsável pela maioria dos óbitos, com maior frequência na Zona da Mata, enquanto os acidentes botrópicos, ocorreram nas regiões mais áridas. Os acidentes elapídicos e laquéuticos se concentraram na Zona da Mata. Os homens são mais acometidos, na faixa etária produtiva, o pico dos acidentes coincide com o período de atividades das serpentes. Existe relação entre o tempo de atendimento e a letalidade, sendo maiores de 60 anos os mais susceptíveis. Os dados epidemiológicos acerca dos acidentes ofídicos em todo o estado encontram-se desatualizados, no entanto, o presente estudo representa um avanço com vistas a obter no futuro o conhecimento pleno do ofidismo no Estado. É necessário priorizar a qualificação e atualização de equipes de epidemiologia com intuito de atingir esse fim.

Referências

ALBUQUERQUE, HN; COSTA, TBG; CAVALCANTI, MLF. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.5, 2005.

ALBUQUERQUE, HN; FERNANDES, A; ALBUQUERQUE, ICS. Snakebites in Paraíba, Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v.11, p.242-251, 2005.

AQUINO, W. K. **Epidemiologia e clínica dos acidentes ofídicos no Estado de Pernambuco**. (Master). Programa de Pós-Graduação em Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, CJ. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.3, p.735-746. 2002.

BOCHNER, R; STRUCHINER, CJ. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.1, p.7-16, 2003.

BORGES, RC. **Serpentes peçonhentas brasileiras: manual de identificação, prevenção e procedimento em casos de acidente**. São Paulo, editora Atheneu. 1999.

CORREIA, J. M., P. D. L. SANTANA-NETO, *et al.* Poisoning due to *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) attended at Restauração Hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil: case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.3, p.336-338. 2010.

FEITOSA, RFG; MELO, IMLA; MONTEIRO, HSA. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas no Estado do Ceará - Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, p.295-301, 1997.

GUARNIERI, M. C., L. R. ANDRADE, *et al.* **Envenoming by snakes of the genus Bothrops in Recife**. International Society on Toxicology: Pan American Section, Fifth Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, 1995. Maryland, USA: Toxicon, 1996. 323 p.

HERPETOLOGIA, S. B. D. Brazilian reptiles - list of species.: Sociedade Brasileira de Herpetologia 2009.

HOGUE, A. R.; S. A. R. W. L. ROMANO-HOGE. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Memórias do Instituto Butantã**, v.40-41, p.19-36. 1978-79.

LEMOS, JC; ALMEIDA, TD; FOOK, SML; PAIVA, AA; SIMÕES, MOS. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev. Bras. Epid.**, v.12, p.50-59, 2009.

LIRA-DA-SILVA, RM; et al. Serpentes de Importância Médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, p.7-20, 2009a.

LIRA-DA-SILVA, et al. Morbimortalidade por ofidismo no Nordeste do Brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, n.1, p.21-25, 2009b.

MARIZ, I. 2004. **Identificação de serpentes de importância médica do estado de Pernambuco**. Monografia de conclusão de curso, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 45p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, COMED/ASPLAN/FNS. 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, COMED/ASPLAN/FNS, 2001.

MISE, YF; LIRA-DA-SILVA, RM; CARVALHO, FM. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.40, p.569-573, 2007.

NICOLETI, A. F.; MEDEIROS, C. R. de; DUARTE, M. R.; FRANCA, F. O. de S. Comparison of *Bothropoides jararaca* bites with and without envenoming treated at the Vital Brazil Hospital of the Butantan Institute, State of São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2010, vol.43, n.6, pp. 657-661.

PINHO, FMO; PEREIRA, ID. **Ofidismo**. Rev. Ass. Med. Brasil, v.47, n.1, p.24-29, 2001.

PINHO, M. S. S. **Levantamento dos acidentes ofídicos ocorridos na Região Metropolitana do Recife**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 42p. 2002.

ROJAS, C. A.; GONÇALVES, M. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.3, p.193-204, jul/set, 2007.

SOARES-DA-SILVA, MM. 2001. **Identificação de serpentes coletadas no Estado de Pernambuco**. In: Centro de Ciência Biológicas, Volume Bacharel. (Recife: Universidade Federal de Pernambuco), 63p.

Apêndices

Manuscrito de artigo científico 2

Correia, et al., 2011

Poisoning Case Report by *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766) treated at Hospital da Restauração, Recife-PE, Brazil.

Enviado ao *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*

**Poisoning Case Report by *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766) treated at Hospital da
Restauração, Recife-PE, Brazil**

**Relato de Caso de Envenenamento por *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766) Atendido no Hospital
da Restauração, Recife-PE, Brasil**

Correia, Juliana Mendes^{1,2,3}; Escobar, José Arturo Costa⁴; Santana-Neto, Pedro de Lima^{5,6}; Pinho, Milena Sardou Sabino⁵; Amorim, Maria Lucineide Porto⁶; Brayner, Fábio^{2,3}; Alves, Luiz Carlos^{2,3}; Lima-Filho, José Luiz de²

¹PPG on Biology Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³Department of Parasitology, Research Center Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brazil.

⁴PPG on Cognitive Psychology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁵Department of Zoology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁶Center of Toxicological Assistance, Hospital da Restauração, Recife, PE, Brazil.

ABSTRACT

We describe the first confirmed accident by *L. muta* attended at Hospital da Restauração in Pernambuco state. The patient presented gingival hemorrhage, edema, pain, ecchymosis and coagulation time alteration. Treatment was realized with venous hydration, corticoids and antithrombotic-lachetic serum therapy. The patient leaved the hospital five days after entrance in the health service with passages in toxicological and pediatric departments.

Keywords: Snakebite; Toxinology; Epidemiology; Bushmasters

RESUMO

Descreve-se o primeiro acidente confirmado por *L. muta muta* atendido no Hospital da Restauração em Pernambuco. O paciente apresentou gengivorragia, edema, dor, equimose e alterações no tempo de coagulação. O tratamento foi realizado mediante hidratação venosa, corticóides e aplicação de soroterapia antibotrópica-laquéica. Após cinco dias, recebeu alta hospitalar, tendo passado por dois serviços distintos, a toxicologia e a pediatria.

Palavras-chaves: Acidente Ofídico; Toxinologia; Epidemiologia; Surucucu.

Introduction

From all accidents caused by lethal animals, snakebite is often the most serious. Therefore, it is a public health issue, globalizing all regions of Brazil, leading to the necessity of early adequate antivenom therapy .

Moreover, it is estimated five hundred cases by 100.000 inhabitants with 20.000 deaths yearly in Africa, Asia and Latin America. In the USA more than 8.000 cases yearly are notified . In Brazil, according to the Ministry of Health, it occurs between 19.000 to 22.000

snakebites yearly with 0.45% of lethality caused by snakes of Viperidae family (genus *Bothropoides*, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Crotalus* and *Lachesis*).

The genus *Lachesis* has unique specie in Brazil, *Lachesis muta*, known as bushmaster in USA, Bosmeester in Suriname, Daya and Guiama and Manaré in Venezuela, Verrucosa in Colômbia, Cascavel Pua and Pucarara in Bolívia, diamante and cascavel muda in countries of Spanish language and, Surucucu in Brazil .

Lachesis muta is the major Brazilian poisonous snake, 3.5 m long, presenting dark spots in the head with a characteristic strong post-ocular strike, yellow color pattern with dark rhomboidal figures, white or ivory belly and bristly scales tip to tail with pale to dark . This terrestrial specie has nocturne habit and during the day it is found in animal burrows and hollows of fallen trees, little mammals are its' favorite food . Its defense strategies consist in vibrate the tail producing a characteristic sound and bite .

Lachesis muta is known as Surucucu, Surucutinga, Surucucu-de-fogo or Surucucu-pico-de-jaca in Pernambuco, a Brazilian state. This specie is exclusive of Brazilian fauna inhabiting reminiscent of Atlantic and Amazonian Rain Forests and being distributed in all territory from the North of Rio de Janeiro (Southeast) until Paraíba state (Northeast), it can also be found in isolated populations in humid enclaves .

Due to be a snake of forest areas cases of envenomation are rare . The action of venom and symptomatology are similar of the bothropic accident; furthermore, some affected people shows clinical alterations in the local of the bite. Pain, edema, heat and flushing are similar to bothropic accidents and diagnostic could be confused. Coagulation time could be altered and contributes to systemic hemorrhage. Whatever the patient could present vagal stimulation as bradycardia, diarrhea, arterial hypotension and shock . The specific treatment is realized with lachetic antivenom ministrations or bothropic-lachetic antivenom .

In the present work we related a case of accident caused by *Lachesis muta* treated at Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), located at Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, and the specimen was identified by specialists.

Case Report

Male child, 13 years old, from rural zone of Igarassu-PE, gives entrance at Hospital da Restauração with history of snake bite in the left foot two hours before (Fig.01). It comes to

health service referring bite local pain, vomit and abdominal pain. Physical exams revealed awareness, orientation, eupneic, somnolence, gingival hemorrhage, apparent marks of the bite in the affected local with continuous bleeding. Alterations on coagulation were detected (Coagulation Time= +10m, Bleeding Time: 2'30'', Prothrombin Time and Activated Prothrombin Time were undetected). Renal function and platelet counting were normal. The bothropic-lachetic antivenom therapy was realized with 10 ampoules, and corticoid was applied before the treatment. Clinical evolution and improvement of systemic symptoms was observed after 48 hours from antivenom therapy, absence of coagulation alterations, however, with discrete edema, pain and ecchymosis in the local of the bite. These conditions were sufficient to patient be leaved from CEATOX-PE. The pediatric department accompanied the case and oriented treatment with antibiotics of developed cellulites in the local bitten. After this, patient leaved the hospital five days after accident.

Discussion

This case report is the first confirmed case of snakebite by *Lachesis muta* in a male child from the city of Igarassu-PE (Fig. 01). The animal was captured and identified at Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas (LAPT_x/UFPE) and was incorporated at CEATOX animal collection.

This city is located next to the Itamaracá Island in the Pernambuco. It is limited in the north by the city of Goiana, in the south by Paulista city and Abreu e Lima city, in the east by Itamaracá, Itapissuma and Atlantic Ocean and by Tracunhaém city and Araçoiaba city in the west. Igarassu city is an anthropic region with intense human activities on cane sugar culture with vestiges of well conserved subperennial Atlantic Rain Forest, mixed with semideciduous Forest. These environmental characteristics are favorable to reproduction of *Lachesis muta* and propitious accidents with humans.

Among rare reports of *Lachesis* accidents in the literature , and considering most of the cases diagnosed and treated at Hospital da Restauração, all accidents followed the standard characteristics, including the regional area.

The present case demonstrated symptomatology background similar to others cases published in national literature. In general, lachetic accidents presents pronounced local effects as pain, edema, ecchymosis, hemorrhagic blisters and tissue necrosis, and causes sequelae like muscular tissue lost and amputation of the

extremities affected. Coagulation alterations occur mainly by defibrination. Other symptoms could be presented as nausea, vomit, diarrhea, hypotension, bradycardia, abdominal pain and renal failure, in this last symptom, if the accident was not identified and treated with urgency .

The case reported reveals initial symptoms and consequences in the post-treatment of an envenomation by *Lachesis*, precociously identified and treated (2 h after bite). This fact was favorable to fast clinical evolution and improvement observed in the patient, without tissue commitment and treated with specific antivenom therapy.

In conclusion, snakebite shows complex symptomatology backgrounds that are variable according the time between accident and treatment. Consequently, to decrease risks to patient is necessary immediate identification of the specimen and diagnostic of symptoms. Clinical data of snake accidents complications has not been considered in a serious manner at Brazilian clinical knowledge. So, a politics of continuous capacitating of health professionals from different health services that receives snakebite accidents considering the actual status of knowledge on the field is necessary, once a time some of these workers became prisoners of the National Manual of Diagnostic and Treatment of Accidents by Venomous Animals. This manual is the most important guide on clinical treatment of venomous animal accidents adopted in Brazil, but it is extremely outdated at the present. It could sound like a repetitive conclusion; however, it is a real fact that few hospitals in Brazil have enough quality to the treatment and the urge for a change is highlighted for years. More directional governmental actions are in need, mainly due to a high increase of the accidents since 2003 to present in which the mean of accidents exceeded 26.500 in all country with more than a hundred deaths by year.

Acknowledgments

We acknowledge CNPq for financial support to doctoral students (JMC and JACE). We thanks Dr. Américo Ernesto, Dra. Cleide Ribeiro, Mrs. Vilma Gomes, and all nurse team of CEATOX-PE, patient and family.

References



Figure 01: (A) *Lachesis muta* e (B) Points of inoculation of the fangs of *Lachesis* patient's left leg.

J Venom Anim Toxins incl Trop Dis

(© 2009 Journal Citation Reports,
published by Thomson Reuters)

ISSN 1678-9199

Preparations of Originals

Manuscripts should be written in English and submitted online (www.jvat.org.br – “Online Submission”). The copies should be typed in a Word file with 25 mm margins on all sides (on size A4 paper), Arial 12 pt font, justified, 1.5 line spacing. Full papers should be organized in the following order:

- Title (should be clear, descriptive and not too long)
- Name(s) of author(s)
- Affiliations of author(s)
- Abstract

- Key words (indexing terms, normally 3 to 6 items)
- Conflicts of interest
- Financial source (information concerning research grants)
- Trial Registration Number (when applicable)
- Correspondence to: (complete postal address, full telephone, fax number and email of the corresponding author)
- Introduction
- Materials (or patients) and methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (when applicable)
- Acknowledgements
- References
- Tables
- Figure captions
- Tables (separate files)
- Figures (separate files)

[Back](#)

References

Authors must verify references against the original documents before submitting the article. The journal has just adopted the **Vancouver style for references**; therefore, all the submitted manuscripts, hereafter, must follow this guideline. Nevertheless, papers presenting the new reference style will be published starting in 2009.

References should be numbered in the order in which they appear in the text. The full list of references, at the end of the article, must follow the Vancouver style (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). In the text, identify references with Arabic numerals on the line (not superscript) and in parentheses, e.g. "(7, 38)".

Examples of reference style:

- *Standard journal article* (list the first six authors followed by "et al.")
 1. Ferreira Júnior RS, Barraviera B. Tissue necrosis after canine bothropic envenoming: a case report. *J Venom Anim Toxins*. 2001;7(2):302-12.
 2. Almeida RAMB, Silva GF, Llanos JC, Winckler CC, Gomes MRB, Biagioni DS, et al. Cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii* seroprevalence in a Brazilian liver transplant waiting list. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007;13(4):881-4.
- *Chapter in a book*
 3. Chaud-Netto J, Gobbi N, Malaspina O. Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas. In: Barraviera B, editor. *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: EPUC; 1994. p. 173-93.
- *Conference paper*
 4. Haddad Junior V. Clinical aspects of accidents caused by aquatic animals. In: *Proceedings of the Seventh Symposium of the Brazilian Society on Toxinology (SBTx); 2002 Sep 16-20; Pirenópolis, Brazil*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2002. p. 28.
- *Part of a homepage/website*
 5. PubMed [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; c1993-2008 [updated 2008 October 22; cited 2008 October 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>.
- *Dissertations and theses*
 6. Ferreira Junior RS. Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticrotálicos produzidos em ovinos jovens, avaliação

clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com Cobalto-60 [doctoral dissertation]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista; 2005. 132p.

[Back](#)

Illustrations

All illustrations (line drawings, photographs and graphs) should be submitted as separate files, preferably in JPG, TIFF or XLS format. Audio or video clip should be sent separately in MP3, WMA, WAV, and AVI, MOV, WMV, MPG files, respectively. Figures should be numbered according to their sequence in the text and each one must have a caption (included at the end of the manuscript). References should be made in the text to each illustration. Explanations should be given in the figure legends, so that drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

[Back](#)

Tables

Authors should take notice of the limitations set by the size and layout of the journal. Therefore, large tables should be avoided. Tables should be numbered according to their sequence in the text, where all tables must be mentioned.

Apêndices

Manuscrito de artigo científico 3

Correia, et al., 2011

Estado da arte do estudo das peçonhas ofídicas das espécies com ocorrência em pernambuco.

Será enviado ao *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*

ESTADO DA ARTE DO ESTUDO DAS PEÇONHAS OFÍDICAS DAS
ESPÉCIES COM OCORRÊNCIA EM PERNAMBUCO.

Juliana Mendes Correia^{1,2}, José Arturo Costa Escobar³; Pedro de Lima Santana Neto⁴, Milena Sardou Sabino Pinho⁴, Jeanne Claíne de Albuquerque Modesto⁵, Renata Cristina Valença Fraga⁶, Marliete Soares⁷, Taísa Vasconcelos⁸, Márcia

Bezerra da Silva⁷, Gandhi Rádis-Baptista, José Luiz de Lima Filho², Miriam Camargo Guarnieri⁸.

¹PPG on Biology Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. ²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. ³PPG on Biology Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. ⁴Department of Zoology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. ⁵Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ⁶Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ⁷Departamento de Biofísica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ⁸Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. ⁸Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

RESUMO

As serpentes de peçonhentas do Estado de Pernambuco pertencem as famílias Colubridae (*Boiruna maculata*, *Boiruna sertaneja*, *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis*), Elapidae (*Micrurus ibiboboca* e *Micrurus leminiscatus*) e Viperidae (*Bothropoids erythromelas*, *Bothrops leucurus*, *Bothriopsis bilineata*, *Crotalus durissus cascavella* e *Lachesis muta*) sendo responsáveis pelos acidentes ofídicos de ocorrência no estado. Devido a grande variedade de enzimas produzidas em suas glândulas de veneno, resultantes de diferentes sintomatologias e com potencial farmacológico, estudos vem sendo realizados sobre a sua constituição. O presente estudo tem como objetivo atualizar dados sobre as pesquisas realizadas com as peçonhas das serpentes de importância médica encontradas em Pernambuco. A maioria dos estudos são oriundos de monografias e dissertações não publicadas em

revistas científicas, porém produzidas sob orientação de professores com renomada experiência na área.

PALAVRAS-CHAVE: Toxinas, Serpentes, Estado de Pernambuco.

ABSTRACT

The venomous snakes of the State of Pernambuco belong to the families Colubridae (*Boiruna maculata*, *Boiruna sertaneja*, *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis*), Elapidae (*Micrurus ibiboboca* e *Micrurus leminiscatus*) and Viperidae (*Bothropoids erythromelas*, *Bothrops leucurus*, *Bothriopsis bilineata*, *Crotalus durissus cascavella* e *Lachesis muta*) is responsible for the occurrence of snakebites in the state. The large variety of enzymes produced in their venom glands, resulting in different symptomatology and pharmacological studies have been carried out on its constitution. This study aims to update data on research conducted with the venoms of snakes of medical importance found in Pernambuco. Most studies were from unpublished dissertations and papers in scientific journals, but produced under the guidance of renowned professors with experience in the area.

KEYWORDS: Toxins, Serpents, State of Pernambuco.

Nenhum conflito de interesse

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da Universidade Federal de Pernambuco.

Correspondência para:

Juliana Mendes Correia, Rua Esperança, nº 651, CEP 51230-665, Iburá, Recife-PE, Fone: 81-8655-5572, e-mail: mendescorre@yahoo.com.br.

1. INTRODUÇÃO

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, os mais complexos de todos os venenos, atuando tanto na imobilização da presa quanto na digestão dos tecidos animais. São constituídas por cátions metálicos (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn), carboidratos (freqüentemente na forma de glicoproteínas), nucleosídeos, aminas biogênicas, lipídeos e aminoácidos livres. Entretanto, os principais componentes da peçonha são as proteínas e os peptídeos (90 – 95% do peso seco), responsáveis pela maioria das atividades biológicas (1,2).

Uma grande variedade de enzimas pode ser encontrada nas peçonhas ofídicas, como fosfolipases, fosfodiesterases, fosfomonoesterases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, enzimas proteolíticas das classes serinoproteases e metaloproteases, arginina esterases, 5'-nucleosidases, hialuronidases e NAD nucleosidases. Além das enzimas, estão presentes também peptídeos dos quais merecem destaque as neurotoxinas pré e pós-sinápticas, miotoxinas, cardiotoxinas, potenciadores de bradicina (BPP) e inibidores de agregação plaquetária (desintegrinas) (3,4). Entretanto, é importante ressaltar que nem todas as peçonhas apresentam esta variedade

de componentes. As atividades biológicas provenientes destas moléculas são responsáveis pela maioria dos efeitos tóxicos nos envenenamentos ofídicos.

No Brasil, os acidentes ofídicos têm importância médica e epidemiológica constituindo um problema de saúde pública. No país são registrados anualmente 20.000 acidentes ofídicos, dos quais 13,8% ocorrem na região Nordeste, que é a primeira em letalidade (0,81%), seguindo-se do Centro-Oeste (0,63%), Norte (0,53%), Sul (0,33%) e Sudeste (0,26%) (5).

No estado de Pernambuco, o gênero *Bothrops* foi responsável por 78,7% dos acidentes ofídicos no período de 1995 a 1997, com índice de letalidade de 0,72%. A maior proporção de acidentes botrópicos ocorreu no interior do estado, enquanto os acidentes crotálicos predominaram na zona litorânea (6). Os levantamentos realizados por Guarnieri *et al.* (7), no período de 1992 a 1994, e por Pinho (8), de 2000 a 2002, ambos na Região Metropolitana do Recife, demonstraram um decréscimo de 47% para 14,8% dos acidentes com o gênero *Bothrops*, respectivamente, com conseqüente aumento proporcional dos acidentes por cascavéis. Esses dados são preocupantes do ponto de vista médico, uma vez que os acidentes por cascavéis são mais graves do que os botrópicos e que a densidade demográfica da região metropolitana de Recife é muito maior do que a do interior de Pernambuco.

A investigação das toxinas ofídicas tem como focos principais a purificação das mesmas, os estudos de suas ações biológicas, a determinação da estrutura molecular e o entendimento da relação estrutura-função. Várias Instituições brasileiras de ensino e/ou pesquisa estão voltadas para estes campos, das quais se destacam o Instituto Butantan – SP, a Fundação

Ezequiel Dias – MG e o Instituto Osvaldo Cruz - RJ. A distribuição heterogênea desses Institutos ao longo do Brasil, com grande concentração na região Sudeste, possibilitou um conhecimento proporcional das peçonhas de serpentes características de cada região. O Nordeste é especialmente prejudicado pela carência de profissionais, restringindo-se a um ou dois grupos de pesquisa na Bahia, Pernambuco e Ceará.

A UFPE vem há anos estudando as peçonhas das serpentes da região, desenvolvendo pesquisas na área de caracterização, estrutura e função de algumas famílias de toxinas, bem como de seus receptores-alvos nas células. O presente estudo teve como objetivo atualizar dados sobre as pesquisas realizadas com peçonhas das serpentes de importância médica encontradas em Pernambuco.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de um estudo retrospectivo de todas as pesquisas realizadas sobre as toxinas ofídicas das serpentes de Importância Médica de ocorrência em Pernambuco. Os dados aqui utilizados são provenientes de levantamentos bibliográficos oriundos de monografias, dissertações e teses, além de artigos científicos de revistas especializadas na área em bases de dados nacionais e internacionais da área de Toxinologia e apresentados na forma de Lista comentada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Mariz (9), as serpentes de peçonhentas do Estado de Pernambuco pertencem as famílias Colubridae (*Boiruna maculata*, *Boiruna sertaneja*, *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis*), Elapidae (*Micrurus ibiboboca* e *Micrurus lemniscatus*) e Viperidae (*Bothrops erythromelas*, *Bothrops leucurus*, *Bothriopsis bilineata*, *Crotalus durissus cascavella* e *Lachesis muta rhombeata*).

3.1 Família Colubridae

A família Colubridae possui a 65% das 2900 espécies de serpentes descritas atualmente em todo o mundo, dos quais 40% apresentam glândula de Duvernoy associada a uma denteção opistóglifa. Assim como nas glândulas de peçonha das serpentes proteróglifas e solenóglifas, na glândula de Duvernoy ocorre a síntese de várias toxinas, incluindo enzimas (10). Segundo Mariz (9), em Pernambuco encontram-se apenas três espécies de serpentes opistóglifas da família Colubridae: *Boiruna maculata*, *Boiruna sertaneja*, *Philodryas olfersii* e *Philodryas patagoniensis*.

Assakura *et al.* (11) analisando a peçonha total de *P. olfersii* observaram aspectos semelhantes as peçonhas do gênero *Bothrops*, tendo sido evidenciadas as atividades hemorrágica, edematogênica e fibrin(ogen)olítica. Por outro lado, ao contrário da maioria das peçonhas botrópicas, a peçonha de *P. olfersii* demonstrou baixa atividade fosfolipásica e ausência das atividades trombina-símile, procoagulante e agregante plaquetária.

Resultados similares aos de Assakura *et al.* (11) foram obtidos com a peçonha da espécie *P. patagoniensis*. De acordo com Acosta *et al.* (12), esta

peçonha apresenta uma alta atividade proteolítica, forte ação hemorrágica e capacidade de degradar o fibrinogênio *in vitro*. Já segundo Peichoto *et al.* (13) a mesma é capaz de induzir edema e necrose e não apresenta atividade fosfolipásica.

De acordo com Ching *et al.* (14) a similaridade da peçonha de *P. olfersii* com as peçonhas botrópicas pode explicar a base molecular da eficácia do soro antibotrópico para neutralizar a toxicidade desta peçonha. De fato, a partir da biblioteca de cDNA da glândula de Duvernoy de *P. olfersii*, os autores observaram a presença da maioria das classes de toxinas encontradas na família Viperidae tais como: serinoproteinases, metaloproteinases, lectinas tipo-C, e um peptídeo natriurético tipo C (CNP).

Até o momento, poucas toxinas da peçonha de *P. olfersii* foram isoladas. Os relatos restringem-se a purificação de cinco enzimas fibrin(ogen)olíticas, sendo quatro metaloproteinases e uma serinoproteinase (11), além de uma miotoxina com 20.000 Da de massa molecular e desprovida de atividade fosfolipásica (15). Os efeitos miotóxicos e neurotóxicos da peçonha de *P. olfersii* já haviam sido anteriormente descrito por Prado-Franceschi *et al.* (15), tendo sido estas atividades recentemente relatadas também para a espécie *P. patagoniensis* (16).

Da peçonha de *P. patagoniensis*, apenas recentemente foi isolada a primeira toxina (17). A enzima, denominada patagonfibrase, é uma metaloproteinase α -fibrinogenolítica com massa molecular de 53.224 Da, indutora de intensa hemorragia local e sistêmica, necrose e com ação inibidora da agregação plaquetária. Com base nestes resultados, os autores atentam

para a possível relevância desta toxina na patogênese dos envenenamentos causados por esta espécie.

Com relação as espécies *Boiruna maculata* e *Boiruna sertaneja*, não há relatos na literatura quanto a composição da sua peçonha e atividades biológicas. Apenas um relato de caso de acidente com *B. maculata* está descrito na literatura, não tendo o mesmo ocorrido no estado de Pernambuco. O acidente, caracterizado por forte edema e hemorragia local, foi tratado com soro antibotrópico (18).

3.2 Família Elapidae – Gênero *Micrurus*

Estudos têm mostrado que as peçonhas de serpentes do gênero *Micrurus* apresentam ações neurotóxicas, miotóxicas, hemorrágicas e cardiovasculares (19, 20,21). Durante o envenenamento, as frações neurotóxicas destas peçonhas se manifestam clinicamente por parestesias e paralisias musculares. Essas toxinas podem agir nas regiões pré e pós-sináptica, bloqueando a comunicação neuromuscular (5,22).

3.2.1 *Micrurus ibiboboca* (coral verdadeira)

A peçonha de *M. ibiboboca* apresenta atividade hemolítica, é capaz de induzir aumento de permeabilidade e possui componentes que podem interferir com os fatores humorais associados a respostas pró-inflamatórias (23). Esta espécie possui peçonha capaz de induzir alta atividade acetilcolinesterase, L aminoácido oxidase, hialuronidase, fosfodiesterase, 5' nucleotidase, fosfolipásica e mionecrótica, porém ausência das atividades hemorrágica, fibrinolítica, trombina símile e proteolítica sobre calicreína, plasmina e catepsina C (24).

3.2.2 *Micrurus lemniscatus carvalhoi* (coral verdadeira)

A peçonha de *M. lemniscatus carvalhoi* apresenta atividade acetilcolinesterase, L aminoácido oxidase, fosfolipásica, fosfodiesterase, 5' nucleotidase, e mionecrótica, porém ausência das atividades hialuronidase, hemorrágica, fibrinolítica, trombina símile e proteolítica sobre caliceína, plasmina e catepsina C (24).

A potente atividade fosfolipásica A₂ e ação neurotóxica pós-sináptica (25), provavelmente, é decorrente da ação sinérgica de quatro fosfolipases A₂, capazes de induzir dano neuronal, alterações motoras e eletroencefalográficas, bem como convulsões (22).

3.3 Família Viperidae

3.3.1 Gêneros *Bothrops* e *Bothriopsis* (jararacas)

Apesar da existência de variações interespecíficas e intraespecíficas na composição e atividades das diferentes peçonhas botrópicas, um quadro fisiopatológico qualitativamente similar pode ser observado, sendo caracterizado por:

a) dano tecidual local, traduzido por hemorragia, mionecrose, hiperalgesia, edema e infiltrado celular;

b) distúrbios na coagulação, incluindo a ativação da cascata seguida de depleção de fatores da coagulação e incoagulabilidade sanguínea;

c) distúrbios renais, podendo evoluir para a insuficiência renal aguda (26). A insuficiência renal aguda pode ser causada por necrose tubular aguda ou necrose cortical decorrente da ação direta de proteases ou pela deposição de microtrombos na circulação (27). Estes efeitos, atuando sinergicamente,

podem desencadear o choque hipovolêmico, que constitui a principal causa de morte do envenenamento botrópico (26).

Na literatura não existem estudos acerca da peçonha da espécie *B. lutzi*, dessa forma, trataremos aqui apenas das espécies *B. erythromelas*, *B. leucurus* e *Bothriopsis bilineata*.

3.3.1.1 *Bothriopsis bilineata* (jararaca-verde)

Ainda não existe qualquer estudo publicado sobre a peçonha da serpente *Bothriopsis bilineata*. As únicas informações disponíveis sobre a espécie referem-se a identificação da alta atividade proteolítica sobre calicreína, trombina e plasmina e a capacidade de induzir inflamação via recrutamento neutrofílico na cavidade peritoneal de animais experimentais inoculados com a peçonha de *B. bilineata smaragdina*, subespécie encontrada na Amazônia.

3.3.1.2 *Bothropoides erythromelas* (jararaca malha-de-cascavel)

A peçonha de *B. erythromelas* possui 83,7% de sua composição formada por proteínas e sua porção inorgânica é representada por altos níveis dos íons Na, Cl, K, Ca e Zn e baixas quantidades dos elementos Rb, Se, Cr, Br e Sb (29). Essa peçonha destaca-se das demais do gênero por apresentar uma das mais potentes atividades coagulantes do grupo devido a potentes ativadores de fator II e X (28,30), e diferencia-se pela ausência da atividade trombina símile, (31,32,33), baixa atividade miotóxica e discreto efeito neurotóxico (34).

Além dessas, as atividades características do gênero são encontradas na peçonha de *B. erythromelas*, destacando-se a atividade

hemorrágica (29,35), a capacidade de promover a migração de neutrófilos via liberação de mediadores quimiotáticos do ácido araquidônico (36), a atividade potenciadora de bradicina, a potente atividade fibrinolítica (37) e o efeito nefrotóxico que induz o decréscimo da pressão de perfusão e da resistência vascular.

A peçonha de *B. erythromelas* induz, em cães, coagulopatia similar à observada em vítimas humanas de acidentes botrópicos: hipofibrinogenemia, trombocitopenia moderada, consumo dos fatores II, V e X da coagulação, bem como uma incoagulabilidade sanguínea logo após uma breve fase de hipercoagulação (29). Essa peçonha também induz gengivorragia, petéquias hemorrágicas cutâneas, hematúria e hemorragia aguda sistêmica, levando ao comprometimento dos pulmões, rins e fígado de animais experimentais (35,38).

Estudos de biodistribuição revelaram que a peçonha de *B. erythromelas* tende a concentrar-se na local do inóculo, bem como no estômago e intestinos (29). A curva de distribuição e eliminação dessa peçonha revelou rápida meia vida de distribuição e lenta meia vida de eliminação. A farmacocinética da peçonha de *B. erythromelas* foi alterada pela injeção de soro anti-botrópico, devido ao processo de redistribuição de 20% da peçonha do tecido para o compartimento vascular, onde ocorre a neutralização (39).

Três alternativas para otimização do tratamento foram testadas: o uso do soro monoespecífico anti-erythromelas, que é duas vezes mais eficiente do que o soro antibotrópico comercial em neutralizar as atividades coagulante, hemorrágica, necrozante, fosfolipásica e letalidade da peçonha de *B. erythromelas*; a associação da soroterapia convencional e da heparina, que na dose de 6 IU foi capaz de neutralizar as atividades edematogênica e fosfolipásica da peçonha e aumentar a efetividade do soro anti-botrópico (40); e

o tratamento com soro-anti-botrópico isolado de *Didelphis marsupialis*, que foi efetivo na neutralização dos efeitos induzidos por esta peçonha em rim isolado (41).

Apesar da existência de vários estudos com a peçonha total de *B. erythromelas* na última década, até o momento apenas cinco toxinas foram purificadas: 1) berytractivase, uma metaloprotease ativadora de protrombina de 78 KDa, que converte protrombina em meizotrombina, de forma independente do complexo protrombinase (42); 2-3) berytrogina 1 e 2, metaloproteases hemorrágicas de 55 KDa (43); 4) Be-X1, uma metaloprotease ativadora de Fator X de 45 kDa (44); e BE-I-PLA₂, uma fosfolipase A₂ ácida com potente atividade inibidora de agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico (45). A grande dificuldade de purificar toxinas da peçonha de *B. erythromelas*, caracterizá-las e estudar os seus mecanismos de ação reside no baixo rendimento da peçonha por extração, devido ao pequeno tamanho dessa espécie, e ao baixo rendimento das toxinas decorrente da alta complexidade da peçonha.

Além das toxinas purificadas, três clones foram seqüenciados a partir da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha desta serpente e correspondem as toxinas já purificadas berytractivase e BE-I-PLA₂ e ao fator de crescimento do endotélio vascular (svVEGF) cuja ocorrência na peçonha ainda não foi confirmada (42-45-46).

3.3.1.3 *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco)

A peçonha de *B. leucurus* possui atividades coagulante e hemorrágica, edematogênica e necrosante similares às demais espécies do gênero (28), bem como alta atividade fosfolipásica, miotoxicidade e capacidade

de inibir a contração induzida por acetilcolina em fibras musculares, o que sugere um possível papel deletério na transmissão neuromuscular (47).

Recentemente foram purificadas sete enzimas da peçonha de *B. leucurus*: 1-2) Bleu-H1 e Bleu-H2, metaloproteinases da classe PIV com alta atividade hemorrágica e ativadora de fator X, sendo Bleu-H2 consideravelmente mais ativa que Bleu-H1 (48); 3) leucurolysina-a, metaloproteinase fibrino(geno)lítica de 23 KDa, inibidora da agregação plaquetária induzida por ADP e não-hemorrágica (49), com efeito citotóxico em células endoteliais e atividade edematogênica (50); 4) leucurolysina-B, uma metaloproteinase fibrino(geno)lítica de 55 KDa, que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno, degrada componentes da matriz extracelular e é um potente agente hemorrágico (51); 5) leucurobina, uma serinoproteinase de 35 KDa, com atividade trombina símile capaz de clivar o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio humano, formando coágulos instáveis de fibrina (52); 6-7) *b/D-PLA₂* e *b/K-PLA₂*, fosfolipases A₂ básicas de 14 KDa; *b/D-PLA₂* apresenta ação citotóxica e anticoagulante, sem interferir em a agregação plaquetária induzida por colágeno, ácido araquidônico ou ADP, capaz de estimular o crescimento de tumores de Ehrlich, sem agir na angiogênese, com atividade fosfolipásica 20 vezes maior que *b/K-PLA₂* (53).

3.3.2 Gênero *Lachesis*

O gênero *Lachesis* é representado por serpentes de grande porte que, chegam a secretar 4 ml de peçonha líquida, o equivalente a aproximadamente um grama de peçonha seca. Os acidentes por estas serpentes apresentam características comuns ao envenenamento botrópico, sendo, entretanto rotineiramente mais graves (54).

3.3.2.1 *Lachesis muta* (surucucu)

A peçonha de *L. muta* apresenta forte atividade coagulante e desfibrinogenante que resulta em incoagulabilidade sanguínea, potente atividade proteolítica produzindo intensa lesão tecidual local; induz um quadro hemorrágico caracterizado por sangramentos local e sistêmico, além de apresentar atividade neurotóxica e ação inflamatória acompanhada de edema e intensa hiperalgesia (2,5,28,55,56). Muitas toxinas deste gênero foram purificadas da peçonha da subespécie *L. muta muta* encontrada na região Amazônica, enquanto apenas seis foram isoladas da peçonha de *L. m. rhombeata*: 1) metaloproteinase com atividades hemorrágica e fibrinogenolítica (28); 2) desintegrina (57); 3) LMR-47, serinoproteinase com atividade trombina símile (45 a 47 KDa), que libera preferencialmente fibrinopeptídeos A do fibrinogênio humano e apresenta 100% de homologia com uma trombina símile isolada da peçonha de *L. muta muta* (58); 4) serinoproteinase calicreína símile (32 KDa), com efeito hipotensivo em ratos anestesiados (59) e ativadora de plasminogênio (60), 5) fosfolipase A₂ (61); e 6) lectina tipo-C, ligante de galactosídeos (62).

3.3.2.2 Gênero *Crotalus*

A peçonha crotálica quase não induz reações no local da picada, podendo estar presente um discreto edema na região acometida e parestesia ou anestesia local possivelmente relacionadas a ação antinociceptiva da peçonha. Com relação as manifestações sistêmicas, alterações neuromusculares são evidenciadas nas primeiras horas do acidente com presença de ptose palpebral, diplopia e flacidez da musculatura da face,

podendo ocorrer ainda uma insuficiência respiratória aguda decorrente de paralisia da musculatura intercostal e/ou diafragmática. Já a miotoxicidade manifesta-se por mialgia e pelo escurecimento da urina devido a mioglobinúria (63). Em casos graves, a deposição de mioglobina nos túbulos renais pode evoluir para insuficiência renal aguda (64). Alterações na coagulação sanguínea acometem cerca de 50% dos acidentados, sendo caracterizada pelo aumento do tempo de sangramento ou mesmo pela incoagulabilidade sanguínea devido ao consumo de fibrinogênio, Fator V e proteína C (27).

3.3.2.2.1 *Crotalus durissus* (cascavel)

A peçonha crotálica é do tipo coagulante, neurotóxica, miotóxica e nefrotóxica (64,65,66). De grande importância epidemiológica para a região Nordeste do país, a peçonha de *C. d. cascavella* e seus componentes ainda são pouco explorados. Até o momento apenas sete toxinas foram purificadas: 1) convulxina, glicoproteína de 60 a 78,4 KDa, com ação agregante plaquetária (67); 2-3) fosfolipase A₂ básica (15 KDa) e crotapotina ácida (9 KDa) que consistem nas subunidades da crotoxina; 4) crotoxina, com ação neurotóxica, nefrotóxica, letal e edematogênica (68,69,70); 5) crotamina, peptídeo (4,9 KDa) capaz de induzir espasmos na musculatura esquelética (71); 6) Casca LAO, L-amino oxidase (68 KDa) que induz agregação plaquetária, possui ação anti-leishmania, *in vitro*, observada em promastigotas de *Leishmania amazonenseis*, e inibe o crescimento bacteriano de cepas Gram-negativas e Gram-positivas devido ao rompimento da membrana plasmática (71); 7) serinoproteinase (28 KDa) com atividade fibrinolítica e agregante plaquetária (72); 8) lectina tipo C, considerada isoforma da convulxina, com ação

agregante plaquetária e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (73).

4. AGRADECIMENTOS

A todos os estudantes que se propuseram a realizar esses estudos, a Universidade Federal de Pernambuco, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami, ao CNPq por conceder as bolsas de Doutorado (de J.M.C, J.A.E), de Mestrado (de M.S.S.P) e de iniciação científica (de T.V).

5. REFERÊNCIAS

1. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac.Ther.* 1994;62:325-372.
2. França FOS, Fan HW, Malaque CMS, Cardoso JLC. O Paciente Vítima de Animais Peçonhentos I. Acidentes Ofídicos e Soroterapia. In: Velasco IT, Karam JA, Cruz

- Neto LM, Caraméz MPR, Gattaz MD Ed. Propedêutica na Emergência. São Paulo: Ed. Atheneu, 2003: 23:347-358.
3. Russell FE. Snakes and Snakebite in Central America. *Toxicon*. 1997; 35:1469-1522.
 4. Ouyang C, Teng CM, Huang ETF. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*. 1992;30(9):945-66.
 5. Ministério da Saúde DO Brasil, 2001. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília, COMED/ASPLAN/FNS.
 6. Aquino WK. Epidemiologia e clínica dos acidentes ofídicos no estado de Pernambuco. [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 1999. 100p.
 7. Guarnieri MC, Andrade LR, Lima PK. Poisonous animal accidents in Pernambuco, Brazil: an epidemiological retrospective study from 1992 to 1994, In: International Society on Toxinology: Pan american section fifth pan american symposium on animal, plant and microbial toxins, Frederick, Maryland, USA, *Toxicon*. 1996;324.
 8. Pinho MSS. Levantamento dos acidentes ofídicos ocorridos em Recife (Pe) e das Serpentes encontradas nas Indústrias da BR-101. [Monografia]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 2003. Páginas?
 9. Mariz, I. Identificação de serpentes de importância médica do estado de Pernambuco. [Monografia]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 2004. 45p.
 10. Mackessy, SP. Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. *Journal Toxicology-Toxin Reviews*. 2002;21:43-83.
 11. Assakura MT, Salomão MG, Puerto G, Mandelbaum FR. Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas offersii* (green M. M.T. da Rocha & M. de F. D. Furtado snake). *Toxicon*. 1992;30(4):427-438.
 12. Acosta O, Leiva LC, Peichoto ME, Maruñak S, Tebler P, Rey L. Hemorrhagic activity of the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. *Toxicon*. 2003;41:1007-12.
 13. Peichoto ME, Acosta O, Leiva L, Teibler P, Maruñak S, Ruíz R. Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of Duvernoy's gland secretion of the

- xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. *Toxicon*. 2004;44:589-596.
14. Ching ATC, et al. Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas offersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Lett*. 2006;580:4417–22.
 15. Prado-Franceschi J, Hyslop, S, Cogo JC, Andrade AL, Assakura MT, Cruz-Höfling MA, RODRIGUES-SIMIONI L The effects of Duvernoy's gland secretion from the xenodontine colubrid *Philodryas offersii* on striated muscle and the neuromuscular junction: partial characterization of a neuromuscular fraction. *Toxicon*. 1996;34(4):459-466.
 16. Carreiro da Costa RS, et al. Neuromuscular action of venom from the South American colubrid snake *Philodryas patagoniensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol*. 2008;148(1):31-8.
 17. Peichoto MEP, et al. Purification and biological activities of patagonfibrase, an alpha-fibrinogenase from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1770:810-819.
 18. Santos-Costa MC, Outeiral AB, D'agostini FM, Hele L. Envenomation by the Neotropical Colubrid *Boiruna maculata* (Boulenger, 1896): A Case Report. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2000;42(5):283-286.
 19. Aird SD, Jorge da Silva NJ. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venom. *Comp. Biochem. Physiol*. 1991; 99:287-294.
 20. Gutiérrez JM, Rojas G, da Silva JR, Núñez NJ. Experimental myinecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon*; 1992;30(10):1299-1302.
 21. Francis BR, DA SILVA NJ, SEEBART C, CASAIS E SILVA LL, Schmidt JJ, Kaiser II. Toxins isolated from the Venon of the Brazilian Coral Snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include Hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*;1997;35:193-203.
 22. Oliveira DA, et al. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. *Brain. Res. Bull*. 2008;75(5):629-39.

23. Tambourgi DV, dos Santos MC, Furtado MF, de Freitas MC, DA Silva WD, Kipnis TL. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms, Br. J. Pharmacol. 1994;112(3).
24. Casais-e-Silva LL. Caracterização das atividades biológicas e enzimáticas do veneno de duas espécies de *Micrurus* (Serpentes; Elapidae) do Estado da Bahia. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo. 1995.
25. Oliveira, DA; et al. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. Brain. Res. Bull. 2008;75(5):629-39.
26. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms, a review. Memórias do Instituto Butantan. 1989;51(14):211-33.
27. Jorge MT, Ribeiro LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. Rev. Ass. Med. Bras. 1990;36:66-77.
28. Sanches EF, Freitas TU, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Gotta G, Diniz CR. Biological activities of venom from South American snakes. Toxicon. 1992;30(1):95-103.
29. Vasconcelos CML, et al. Distribution of 131I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1998;31:439-43.
30. Ferreira ML, Moura-da-Silva AM, França FOS, Mota I, Cardoso J L. Toxic activities of venom from nine Bothrops species and their correlation with lethality and necrosis. Toxicon. 1992;30:1603-608.
31. Nahas L, Kamiguti AS, Barros MAR. Thrombin-like and factor X-activator components of Bothrops snake venoms. Thrombs. Haemostas. (Stuttg). 1979;41:314-28.
32. Furtado MF, Maruyama M, Kamiguti AS, Antonio LC. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon. 1991;29:219-26.
33. Maruyama M, Kamiguti AS, Tomy SC, Antonio LC, Sugiki M, Mihara H. Prothrombin and factor x activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1992;80:549-56.

34. Zamunér SR, Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*. 2004; 44:259-271.
35. Valença RC. Estudo do processo hemorrágico induzido pela peçonha de *Bothrops erythromelas*. [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 1997.
36. Flores CA, Zappellini A, Prado-Franceschi J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon*. 1993;31: 1551-59.
37. ARAÚJO IP. Caracterização da atividade fibrinolítica e purificação parcial de fibrinogenase(s) da peçonha de *Bothrops erythromelas* (jararaca malha de cascavel). [Monografia]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 2004.
38. TORRES BS. Alterações pulmonares provocadas pelo veneno da *Bothrops erythromelas*: estudo experimental em cães. [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 1995. páginas
39. Rocha ML, Valença RC, Maia MBS, Guarnieri MC, Araujo IC, Araujo DAM. Pharmacokinetics of the venom of *Bothrops erythromelas* labeled with ¹³¹I in mice. *Toxicon*. 2008;52(3):526-29.
40. Boechat ALR, Paiva CS, França FS, Dos-Santos MC. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 2001; 43(1):7-14.
41. Martins AMC, et al. Actions of anti-bothropic factor from *Didelphis marsupialis* on renal effects of *Bothrops erythromelas* venom. *Toxicon*. 2005;46:595-99.
42. Silva MB, et al. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J*. 2003;369:129-39.
43. Pinho MSS. Purificação e caracterização parcial de duas toxinas hemorrágicas da peçonha de jararaca malha de cascavel, *Bothrops erythromelas* (SERPENTES, VIPERIDAE). [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 2005.

44. Escobar JAC. Purificação de um ativador de Fator X da peçonha de *Bothrops erythromelas* (Serpentes, Crotalinae). [Monografia]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 2006.
45. De Albuquerque Modesto JC, et al. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:377-84.
46. Junqueira-de-Azevedo ILM, Silva MB, Chudzinski-Tavassi AM, Ho, P.L. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. *Toxicon.* 2004;44:571-75.
47. Prianti jr ACG, et al. Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick biventer cervicis preparations. *Toxicon.* 2003;41:595–603.
48. Correia JM. Purificação e caracterização parcial de duas hemorraginas ativadoras de fator X da peçonha de *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco) (Wagler, 1824). [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco. 2006.
49. Bello CA, et al Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie.* 2006;88:189–200.
50. Gremski LH, et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon.* 2007;50:120–134.
51. Sanchez EF, et al. Structural and functional characterization of a P-II metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Arch. Bioch. And Biofhy.* 2007;468:193-204.
52. Magalhães A, et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comp. Biochem. Phys.* 2007; 146:565–75.
53. Higuchi DA, et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie.* 2007;89(3):319-28.
54. Barraviera, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Ed. De publicações científicas, 1994.

55. Kamiguti AS, Cardoso JLC. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. *Toxicon*. 1989;27:955–963.
56. Rosenfeld G, Hampes OG, Kellen EMA. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*. 1959;59:143–163.
57. Scarabouch RM, et al. Characterization of the integrin-specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *J. Biol. Chem*. 1993; 268:1058–1065.
58. Aguiar AS, Alves CR, Melgarejo A, Giovanni-Simone S. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. *Toxicon*. 1996; 34(5):555-65.
59. Giovani-de-Simone S, et al. Purification, properties and N-terminal amino acid sequence of a kallikrein-like enzyme from the venom of *Lachesis muta rhombeata* (Bushmaster). *J. Protein Chem*. 1997;16:809–18.
60. Sanchez EF, et al. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys*. 2000;378:131–141.
61. Damico DCS, et al. Novello Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve–muscle preparations. *Toxicon*. 2005;46:222–29.
62. De-Simone SG, Netto CC, Silva JR FP. Simple affinity chromatographic procedure to purify-galactoside binding lectins. *Journal of Chromatography B*. 2006;838:135–38.
63. Bucarechi F, et al. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2002;44(3) 133-38.
64. Azevedo-Marques M, Cupo P, Hering SE. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. *Medicina*. 2003;36:480-90.
65. Santoro ML, et al. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*. 1999;122(1):61-73. Erratum in: 1999. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*. 1999;123(3):293.

66. Martins AM, et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon*. 2002; 40(8):1165-171.
67. Marlas G, Bon C., Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. *Eur. J. Biochem*. 1982; 25: 157–165.
68. Martins AM, et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon*. 2002; 40:1165–71.
69. Rangel-Santos A, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso DF, Mota, EII. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon*. 2004; 43(7):801-10.
70. Beghini DG, Rodrigues-Simioni L, Toyama MH, Novello JC, DA Cruz-Höfling MA, Marangoni S. Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon*. 2004;43(3):255-6.
71. Toyama OD, et al. Structure-function relationship of new crotoxin isoform from the *Crotalus durissus cascavella*. *Protein J*. 2005; 24(1):9-19.
72. Fonseca FV, et al. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. *Protein J*. 2006;25(3):183-92.
73. Rádis-Baptista G, et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44(3):412-23.

J Venom Anim Toxins incl Trop Dis

(© 2009 Journal Citation Reports,
published by Thomson Reuters)

ISSN 1678-9199

Preparations of Originals

Manuscripts should be written in English and submitted online (www.jvat.org.br – “Online Submission”). The copies should be typed in a Word file with 25 mm margins on all sides (on size A4 paper), Arial 12 pt font, justified, 1.5 line spacing. Full papers should be organized in the following order:

- Title (should be clear, descriptive and not too long)
- Name(s) of author(s)
- Affiliations of author(s)
- Abstract
- Key words (indexing terms, normally 3 to 6 items)
- Conflicts of interest
- Financial source (information concerning research grants)
- Trial Registration Number (when applicable)
- Correspondence to: (complete postal address, full telephone, fax number and email of the corresponding author)
- Introduction
- Materials (or patients) and methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (when applicable)
- Acknowledgements
- References
- Tables
- Figure captions
- Tables (separate files)
- Figures (separate files)

[Back](#)

References

Authors must verify references against the original documents before submitting the article. The journal has just adopted the **Vancouver style for references**; therefore, all the submitted manuscripts, hereafter, must follow this guideline. Nevertheless, papers presenting the new reference style will be published starting in 2009.

References should be numbered in the order in which they appear in the text. The full list of references, at the end of the article, must follow the Vancouver style (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). In the text, identify references with Arabic numerals on the line (not superscript) and in parentheses, e.g. “(7, 38)”.

Examples of reference style:

- *Standard journal article* (list the first six authors followed by “et al.”)

1. Ferreira Júnior RS, Barraviera B. Tissue necrosis after canine bothropic

- envenoming: a case report. *J Venom Anim Toxins*. 2001;7(2):302-12.
2. Almeida RAMB, Silva GF, Llanos JC, Winckler CC, Gomes MRB, Biagioni DS, et al. Cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii* seroprevalence in a Brazilian liver transplant waiting list. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007;13(4):881-4.
– *Chapter in a book*
3. Chaud-Netto J, Gobbi N, Malaspina O. Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas. In: Barraviera B, editor. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC; 1994. p. 173-93.
– *Conference paper*
4. Haddad Junior V. Clinical aspects of accidents caused by aquatic animals. In: Proceedings of the Seventh Symposium of the Brazilian Society on Toxinology (SBTx); 2002 Sep 16-20; Pirenópolis, Brazil. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2002. p. 28.
– *Part of a homepage/website*
5. PubMed [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; c1993-2008 [updated 2008 October 22; cited 2008 October 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>.
– *Dissertations and theses*
6. Ferreira Junior RS. Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticrotálicos produzidos em ovinos jovens, avaliação clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com Cobalto-60 [doctoral dissertation]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista; 2005. 132p.

[Back](#)

Illustrations

All illustrations (line drawings, photographs and graphs) should be submitted as separate files, preferably in JPG, TIFF or XLS format. Audio or video clip should be sent separately in MP3, WMA, WAV, and AVI, MOV, WMV, MPG files, respectively. Figures should be numbered according to their sequence in the text and each one must have a caption (included at the end of the manuscript). References should be made in the text to each illustration. Explanations should be given in the figure legends, so that drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

[Back](#)

Tables

Authors should take notice of the limitations set by the size and layout of the journal. Therefore, large tables should be avoided. Tables should be numbered according to their sequence in the text, where all tables must be mentioned.

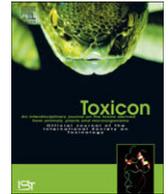
Apêndices

Manuscrito de artigo científico 4

Tavares, N.A; Correia, et al., 2008

Expression of mRNAs coding for VAP1/crotastatin-like metalloproteases in the venom glands of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR

Artigo publicado na Toxicon



Expression of mRNAs coding for VAP1/crotastatin-like metalloproteases in the venom glands of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR

N.A.C. Tavares^a, J.M. Correia^a, M.C. Guarnieri^b, J.L. Lima-Filho^a,
A.R.B. Prieto-da-Silva^c, G. Rádis-Baptista^{a,*}

^a Department of Biochemistry and Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil

^b Laboratory of Venomous Animals and Toxins – LAPT_x, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil

^c Molecular Toxinology Laboratory, Butantan Institute, Av. Vital Brazil 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2008

Received in revised form 27 August 2008

Accepted 29 August 2008

Available online 27 September 2008

Keywords:

South American pit viper

Metalloprotease

Venom apoptosis-inducing protein

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Toxin transcript level

ABSTRACT

Snake venom metalloproteases encompass a large family of toxins, with approximately 200 members already catalogued, which exhibit a diversity of structures and biological functions. From this relatively large number, only a dozen examples of apoptosis-inducing metalloproteases, like VAP1 and 2 from the venom of *Crotalus atrox*, are known. Since most VAP1-like toxins ever characterized were purified from the venom of Viperidae species inhabiting diverse places on earth, we investigate the expression of VAP-like metalloproteases in the venom gland of three representative pit vipers of the Brazilian territory. By molecular cloning and quantitative real-time polymerase chain reaction, using as calibrator gene the *Crotalus durissus terrificus* homolog of VAP1, named crotastatin, it is reported here that VAP1/crotastatin-like homologues in the venom gland of *Bothrops atrox*, *C. d. cascavella* and *Lachesis m. rhombeata* are expressed at different levels. Hence, batroxstatins, the crotastatin-like precursors from *B. atrox*, are expressed 87 times more than crotastatin-1, from *C. d. cascavella*, and 7.5-fold that lachestastins, from *L. m. rhombeata*. Moreover, *in silico* structural analysis of amino acid sequences indicates that batroxstatin-2, crotastatins and lachestatin-1 and -2 which share the archetypal motifs and metal-binding sites of VAP1, are subgrouped in a branch that comprises some apoptosis-inducing toxins.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Metalloproteases constitute a large family of biologically active proteins isolated from the venom of diverse Viperidae (Crotalidae and Viperinae) species (Ramos and Selistre-de-

Araujo, 2006). Snake venom metalloproteinases (SVMPs) comprise zinc-dependent enzymes of the repolysin family. Fundamentally, the members of such metalloprotease subgroup are structurally classified into four main classes (P-I, P-II, P-III, or P-IV), according to the presence of distinct protein domains. Metalloproteases of P-I class (20–30 kDa) includes enzymes presenting only a metalloproteinase domain; P-II enzymes (30–60 kDa) possess both the metalloproteinase and a disintegrin-like domain; P-III (60–100 kDa) have the two domains of P-II in addition to a cysteine rich domain; and members comprised in P-IV class have all the aforementioned

* Corresponding author. Institute of Marine Sciences, Federal University of Ceara, Av da Abolição, 3207, Fortaleza, CE 60165-081, Brazil. Tel.: +55 85 3242 6422; fax: +55 85 3242 8355.

E-mail addresses: radisbra@ufpe.br, radisbap@labomar.ufc.br (G. Rádis-Baptista).

domains linked to a type-C lectin subunit by disulfide bridges (Hite et al., 1994; Bjarnason and Fox, 1995). Based on proteolytic processing of latent precursor pro-proteinases and the formation of dimeric structures, representative members are further subclassified with the PII and PIII classes (Fox and Serrano, 2005), reflecting the vast modular diversity of SVMPs. Moreover, the proteolytic processing of PII and PIII SVMPs give rise respectively to the disintegrins and disintegrin-like toxins (Calvete et al., 2005).

Snake venom metalloproteases induce severe hemorrhagic disturb – an activity associated in some part to their proteolytic domain (Gutiérrez et al., 2005). However additional data have showed that these enzymes are also responsible for local myonecrosis, skin damage, inflammatory reaction, inhibition of platelet aggregation, and induction of apoptosis in endothelial cells (Ramos and Selistre-de-Araújo, 2006; Moura-da-Silva et al., 2007). This latter effect is particularly worth of note, since one strategy to undermine cancer progression is to target and aniquilate vascular endothelial cells which are recruited by tumor for blood (and nutrient) supply and growth (Folkman, 1971). In fact, the disruption of the process of new blood vessel formation (angiogenesis) is becoming an effective medical management to arrest tumor growth (Zhong and Bowen, 2006). Thus far, snake toxins potentially able to restrain vascular endothelial cell proliferation might constitute promising candidates for the development of anti-angiogenic peptide drugs against cancer (Rádis-Baptista, 2005; Swenson et al., 2007).

In 1997, Masuda and collaborators reported the purification of the first vascular apoptosis-inducing protein (VAP1) from the hemorrhagic venom of *Crotalus atrox* (Masuda et al., 1997). VAP1 is a disulfide-bridged homodimer P-III SVMP with a molecular mass of 110 kDa and an isoelectric point of 8.5. Thereafter, VAP2, a monomeric protein with a molecular mass of 55 kDa and an acidic character (pI 4.5), which kills specifically vascular endothelial cells (VECs) in culture, was also purified from the same venom source (Masuda et al., 1998). The mechanism by which VAP1 induces apoptosis in VECs seems to involve α_3 -, α_6 -, and β_1 -integrins, as well as the integrin-associated protein CD9, since antibodies directed to these membrane proteins inhibit cell death (Araki et al., 2002). Moreover, activation of caspase accompanied of severe cell fragmentation is additionally induced by VAP1 (Maruyama et al., 2005).

Since the time that VAP1 and 2 were first purified and cloned, a stepwise increase in the number of reports about the ability of other SVMPs in inducing apoptosis in endothelial cells have been published (Masuda et al., 2001; You et al., 2003; Wu and Huang, 2003; Tanjoni et al., 2005; Baldo et al., 2008). Hence, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* the first identified ortholog of VAP1, named HV1, was purified. HV1 is a homodimeric VAP1-like metalloprotease, with a molecular mass of 110 kDa and showing 85% of similarity with VAP1, capable of inducing extensive cell death in vascular endothelial cells (Masuda et al., 2001). Another example of VAP-like toxin is halysase, from the snake venom of *Gloydius halys*. It belongs to class P-III SVMP with hemorrhagic-inducing properties, and with a strong capacity to inhibit the proliferation of human

umbilical vein endothelial cells in a dose-dependent manner. Halyase is another example, in which the inhibition of cell adhesion to extracellular matrix proteins, and the hydrolysis of fibronectin, vitronectin, and type-IV collagen, as well $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins, and the α -chain of fibrinogen, contribute to cell death (You et al., 2003, 2006). A human endothelial cell apoptosis-inducing protease (VLAIP) was also purified, cloned and characterized from the venom of *Vipera lebetina*. This metalloprotease is a heterodimeric glycoprotein with molecular mass of about 106 kDa. This SVMP hydrolyzes the A α -chain and more slowly the B β -chain of fibrinogen (Trummal et al., 2005).

Albeit this progress, nothing is known until now about VAP-like proteins and their transcripts in the venom and venom glands of a South American pit viper snakes. Therefore, our interest was to verify whether South American rattlesnakes (*C. durissus* sp.) and two other pit vipers, from the genus *Bothrops* and *Lachesis*, inhabiting different geographical regions of Brazil, express VAP1-like genes in their venom glands. By molecular cloning and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), we present data in this work that reveal the existence of distinct precursors and variable level of expression of VAP-like metalloprotease in the venom glands of these South American pit vipers.

2. Materials and methods

2.1. Snake specimens

Specimens of three genus of South American pit vipers (Crotalinae subfamily) were from distinct laboratories of Herpetology, in Brazil: *Bothrops atrox*, captured in Serra de Itapipoca (Ceara, CE, Brazil), was from Federal University of the Ceará (Fortaleza, CE, Brazil); *Crotalus durissus terrificus*, captured in Martinópolis (São Paulo, SP, Brazil), was from Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil); *Crotalus durissus cascavella*, captured in the neighborhood of Recife (Pernambuco, PE, Brazil), was from Federal University of Pernambuco (Recife, PE, Brazil), and *Lachesis muta rhombata*, captured in Igarassu (Pernambuco, PE, Brazil), was from Federal Rural University of Pernambuco (Recife, PE, Brazil). All snakes were adult specimens, caught in the nature, as above mentioned, and maintained in the laboratory for no longer than 1 month. The animals used in this investigation presented no signals of any known reptile disease.

The venom glands were removed from a single specimen of each sampled snake species 3 days after venom extraction, when the maximum level of RNA synthesis is achieved (Rottenberg et al., 1971). Then, the glands were quickly frozen in liquid nitrogen, and stored in deep freezer (at -80°C) until used.

2.2. Preparation of mRNAs from Viperidae venom glands and first strand cDNA synthesis

Frozen venom glands were finely powdered in a mortar and pestle under liquid nitrogen, and total RNA was purified using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The quality and yield of total RNA were verified by the integrity of 28S

and 18S rRNA, through denaturing agarose gel electrophoresis, and spectrophotometrically using the ratio 260/280 nm.

Poly(A⁺)-RNA was purified from total RNA by a complex of oligo(dT)-biotin and streptavidin-MagneSphere paramagnetic particles (PolyAtract system, Promega, Madison, WI, USA). The mRNAs were quantified and used for cDNA synthesis. ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) was used to prepare the full length cDNA, as follow: mRNA (1.2 µg) from all Viperidae venom glands were mixed with 500 ng oligo-dT primer (Promega, Madison, WI, USA), in a final volume of 14 µl, heated to 70 °C for 10 min, to disrupt possible secondary structures, and quickly cold on ice. Thereafter, a total of 100 U of reverse transcriptase were combined with 1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 40 U of RNase inhibitor, and RNase-free water to make a final reaction volume of 25 µl. The reverse transcription was conducted at 42 °C for 60 min, and finally heated to 70 °C for 15 min.

2.3. Homology screening-PCR of VAP-like homologue in *Crotalus durissus terrificus* venom gland cDNA library

A *Crotalus durissus terrificus* venom gland cDNA phage library was constructed with the gland tissue of a single adult animal, as described in Radis-Baptista et al. (1999). The library was titrating and pools of approximately 10⁶ plaque forming units (pfu) were used as template in several separated homology screening polymerase chain reactions (HR-PCRs). Each reaction, in a final volume of 50 µl, was constituted by 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase, 2.0 mM of MgCl₂, dNTPs, of 0.2 µM of each forward and reverse primer, in high fidelity PCR buffer (60 mM Tris-SO₄, pH 8.4, 18 mM ammonium sulfate, 2.5 mM MgSO₄). The primers utilized to isolate the *C. d. terrificus* VAP-like toxin cDNA were the SVAT-SE1 (5'-GAACAACAAAGATACTTGAACGCCA-3') and SVAT-AS2 (5'-TGATGTGAATACACCTACTAA-3'), which correspond exactly to the 5' and 3'-stretch of the encoding nucleotide sequence of mature VAP1 toxin homodomain. The cloned *C. d. terrificus* VAP-like cDNA was sequenced as further described.

2.4. Quantitative real-time PCR analysis

The cloned *C. d. terrificus* VAP-like cDNA, named 'cro-tastatin' (GenBank accession number DQ224420), encompasses a sequence of 1266 nucleotides (1266 bp), which encodes the three typical SVMPs' protein domains: zinc-dependent metalloprotease (ZnMc superfamily or adamalysin II like subfamily), disintegrin (DISIN superfamily) and cysteine rich domain (ADAM CR superfamily). Based on crostastatin cDNA sequence, the primers SVAT-ASRT1 (5'-TAACTGAGCATTATCATGACTTTTGC-3') and SVAT-SERT2 (5'-ACGGTACTGCTACAATGGGAA-3') were synthesized (Integrated DNA Technologies – IDT, Coralville, IA, USA) and used in combination with SVAT-SE1 and SVAT-AS2, respectively, in all experiments of quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The primer pair SVAT-SE1/SVAT-ASRT1 was used to amplify a sequence of 300 bp (RT1), which corresponds to the initial 5'-stretch of

the zinc-dependent metalloprotease domain of crostastatin and VAP1, while the pair SVAT-SERT2/SVAT-AS2 was to generate an amplicon of 350 bp (RT2), which covers the 3'-terminal cysteine rich domain of crostastatin. The standard curve of crostastatin amplification was constructed by serial dilution of a cDNA solution, which was measured spectrophotometrically at 260 nm.

To convert the number of copies of crostastatin mRNA in the venom glands of all pit vipers used in this work, the following formula was used: number of copies = (amount * 6.022 × 10²³)/(length * 1 × 10⁹ * 650). Thus, 1 µg of 1266 bp double-stranded (ds-) cDNA = 7.32 × 10¹¹ molecules.

The single-stranded cDNA (ss-cDNA) samples of each South American pit viper venom glands (i.e., *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata*) were diluted to yield synthesized single-stranded (ss) cDNA equivalent to 0.8 and 0.08 ng of mRNA per reaction (20 µl). The specific primer pairs were used (SVAT-SE1/SVAT-ASRT1 and SVAT-SERT2/SVAT-AS2). Amplification of crostastatin-like cDNAs were carried out in the Rotor-Gene 3000 operated with its respective software, version 6.0.19 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Each reaction consisted of: 1 µl of ss-cDNA solution (0.8 and 0.08 ng of reverse transcribed messenger RNA), 500 nM of primers, 10 µl of SYBR Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in a final reaction volume of 20 µl. Amplification conditions were as follows: 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (20 s) in 45 repetitions. Levels of β-actin transcript proved to be stable among the tissues in all reactions of qRT-PCR amplification. Fluorescence was collected at 494–521 nm during the extension phase.

Specificity of each reaction was ascertained after completion of the amplification protocol. This was achieved by performing the melting procedure (55–90 °C; 1 °C/5 s). Additionally, the melting curves and melting temperature (*T_m*) were used to discriminate distinct crostastatin-like cDNA precursors. Finally, the PCR products were separated on a 1.8% agarose gel, stained with 0.5 µg/ml of ethidium bromide, and visualized with an UV transilluminator (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

2.5. Data analysis

Threshold and threshold cycle (Ct) values were automatically determined by Rotor Gene 6.0.19 software, using default parameters. The Ct and *T_m* data were expressed as mean of two or more measurements ± SEM. The absolute quantification of crostastatin-like in South American pit viper venom glands was done as described by Overbergh et al. (1999). The values (copy numbers) were normalized to one microgram of messenger RNA. The copy number of molecules was presented as mean of nine measurements ± SEM. The corresponding real-time PCR efficiencies (*E*) of cycles in exponential phase were calculated from the given slopes (*S*) in Rotor Gene 6.0.19 software, according to the equation: $E = 10^{(-1/k)} - 1$. The linearity was expressed as square of Pearson correlation coefficient (*R*²).

2.6. Cloning of crotastatin-like cDNAs from the venom gland of *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata* pit vipers

Crotastatin-like double-stranded complementary DNA (ds-cDNA) were prepared by reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (RT-PCR) as follow: 1.0 µg of each mRNA pool prepared from snake venom glands of *Bothrops atrox* (Bat), *Lachesis muta rhombeata* (Lam), and *Crotalus durissus cascavella* (Cdc) was separately combined with 1.0 µg of oligo-dT primer (Promega, Madison, WI, USA) and sterile deionized water (to a total volume of 14 µl). The RNA and oligo-dT mixture was heated at 70 °C for 10 min, to disrupt possible secondary structures, and then quickly cooled on ice. Thereafter, a total of 100 U of ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), in reaction buffer, were combined with 1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 40 U of RNase inhibitor, and RNase-free water to make a final reaction volume of 25 µl. The reverse transcription was conducted at 42 °C for 60 min. The reaction was halted by heat-inactivating the reverse transcriptase at 70 °C for 15 min. The ds-cDNA products were diluted 50-fold and an aliquot of 2 µl were transferred to a high fidelity PCR mixture, using the primers SVAT-SE and SVAT-AS, as above detailed. The VAP1/crotastatin-like cDNAs were subcloned into pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA), and plasmids of positive clones were sequenced as follows in Section 2.7.

2.7. Nucleotide sequencing, alignment and functional dendrogram

All cloned South American Crotalinae VAP1/crotastatin-like cDNAs were sequenced by the dideoxy chain termination method, using the dye terminator chemistry (DYEnamic ET Dye Terminator kit, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and the MegaBACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Each clone was sequenced twice with both sense and antisense 5'- and 3'-flanking primers and the contig sequence was assembled with the software SeqMan (Lasergene, DNASTar Inc, Madison, WI, USA). The annotated nucleotide sequences were submitted to Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received the following sequential accession numbers: EU733631, EU733639, EU733640, EU733641, EU733642, and EU733643.

The crotastatin-like cDNAs were *in silico* translated, and the deduced amino acid sequences were compared against all entries in the GenBank database, using the BLASTp program (Altschul et al., 1997). Multiple sequence alignment was conducted by the ClustalW2 program, available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustaw2> (Brooksbank et al., 2003), and the structural characteristics of each predicted protein was manually annotated based on data from the literature.

The dendrogram of the South American pit viper VAP1/crotastatin-like homologues and the best scored snake venom metalloproteases type-III mature toxins (SVMP-III) was inferred using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 4.19500254 was presented as topology only. The

percentage of replicate trees in which the associated toxins clustered together in the bootstrap test (500 replicates) was indicated next to the branches (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method (Jones et al., 1992), taking the number of amino acid substitutions per site as unit. All positions with alignment gaps and missing data were eliminated for pairwise sequence comparison. There were a total of 423 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted by using the MEGA4 (Tamura et al., 2007). All mature toxins sequences were aligned with MUSCLE3.6 (Edgar, 2004) using groups of amino acid similarity GA, ST, MVLI, KR, EQDN, FWYH, C, P.

3. Results

3.1. Homology screening PCR of crotastatin – a VAP-like metalloprotease from *C. durissus terrificus* venom gland

Homology screening- polymerase chain reaction (HS-PCR) of *C. d. terrificus* snake venom cDNA phage sub-libraries, using SVAT oligonucleotides as primers, yielded positive amplicons immediately after the first round of PCR selection. The positive phage clones were separately stored for further analysis, but the products of amplification were subcloned and sequenced. Such HS-PCR product, named crotastatin, is 1266 bp long and its nucleotide sequence shares 98% of identity with the same region of VAP1 cDNA from *Crotalus atrox*, with which it aligns. It codes for a mature toxin of 421 residues of amino acids (97% of similarity with VAP1), with a theoretical molecular mass of approximately 46,500 Da and a *pI* of 6.4. The deduced protein encompasses the three domains: Zn-metalloprotease, disintegrin and cysteine rich domain (CRD), composed of 206, 77 and 121 residues of amino acids, respectively, and a spacer of 17 residues between the metalloprotease and disintegrin domains – a structure that is typical of P-III family of snake venom metalloproteases (Fig. 1). Crotastatin also presents the Zn²⁺-binding motif (-HEMGHNLMDH-) – a structural characteristics of members of metzincin family –, as well the ECD-motif, which is part of the disintegrin domain of some metalloproteases (Cidade et al., 2006).

3.2. Real-time PCR melting curves reveal polymorphism in crotastatin-like genes

Melting curves can be produced in experiments of quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Using this approach, melting temperature (T_m) of each amplicon can be determined, in which the value of T_m denotes the product length and its base composition. The primer pair SVAT-SE1/SVAT-ASRT1, and SVAT-SERT2/SVAT-AS2, that anneal to the 5'-terminal of crotastatin and VAP1 and the 3'-region cysteine rich domain of crotastatin (Fig. 2A), were combined and used to generate the two amplicons (Fig. 2B) and their respective curves of melting. The qRT-PCR product of crotastatin amplification, RT1^{Cdt} and RT2^{Cdt}, have main melting temperatures of 77.85 ± 0.12 ($n = 12$) and 79.95 ± 0.17 ($n = 12$), respectively. Another melting temperature of RT1_b^{Cdt} crotastatin segment is given at

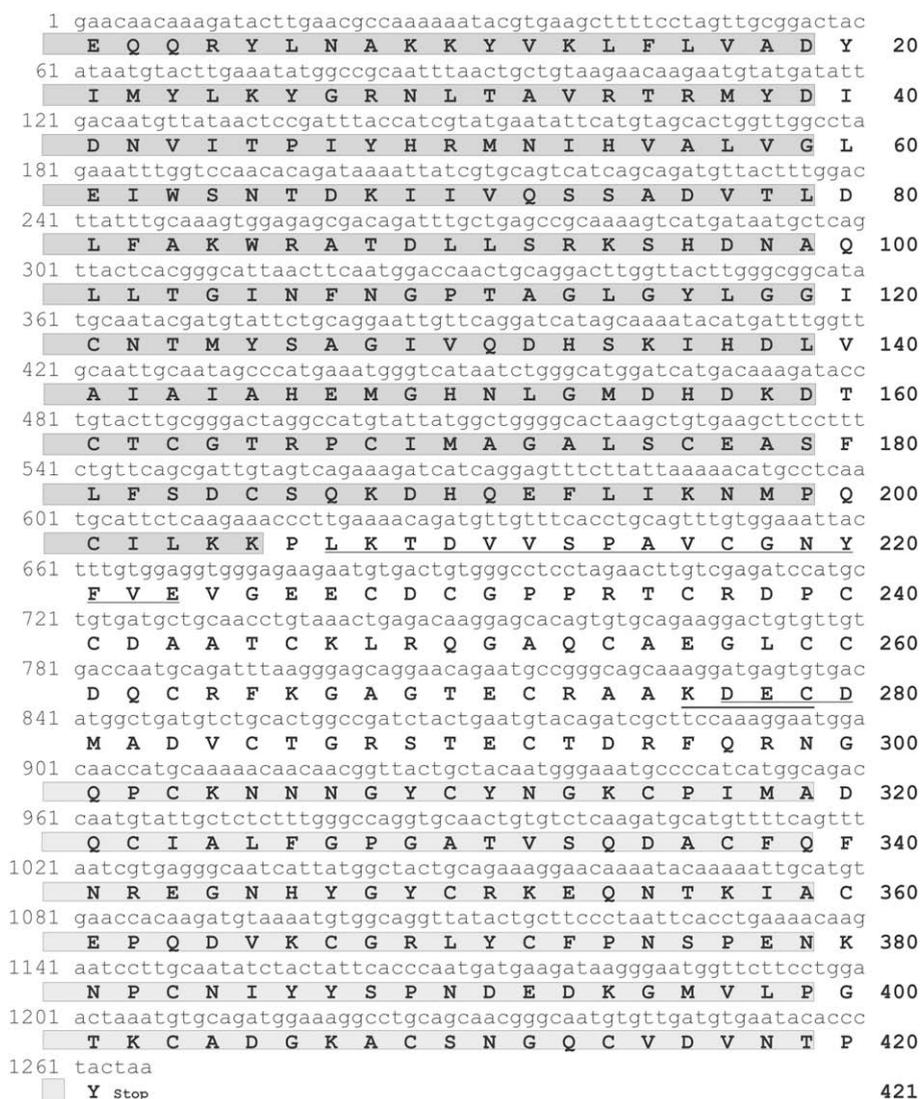


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Crotalus durissus terrificus* VAP-like toxin (crostastatin, Sta) mRNA, partial cds (GenBank accession number DQ224420). The gene sequence, corresponding to the mature crostastatin (1266 bp, numbered in the left side of the sequence), codes for a protein of 421 residues with a metalloprotease domain (dark gray box), a disintegrin domain (unlabeled) and the conserved cysteine rich domain (light gray box). The spacer connecting the disintegrin and the CRD is indicated by an underline. The doubled underlined DECD peptide shows the replacement to the typical RGD motif found in most snake venom disintegrins.

76.46 ± 0.20, what indicates that at least two genes might be actively expressed. Melting temperatures of crostastatin-like genes were determined for the homologues of crostastatin from the venom gland of *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata*, using single-stranded cDNA as template (Table 1). These data reveal that more than two homologous crostastatin-like genes are expressed in the venom gland of *B. atrox* and *L. m. rhombeata*.

3.3. Quantification of crostastatin-like transcripts in the venom glands of species of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* by qRT-PCR

Since the melting curves reveal that crostastatin-like homologues are being expressed in the venom gland of these three principal genus of South American pit vipers,

the absolute quantification of each transcript were conducted. Optimized calibration curves for quantification of crostastatin-like expression were obtained with serial dilution of crostastatin ds-cDNA (3.51×10^{10} copies/ μ l), and the primer pairs SVAT-SE1/SVAT-ASRT1, and SVAT-SERT2/SVAT-AS2, which amplify the segments RT1 and RT2, respectively. A good coefficient of correlation (R^2 -value) and better efficiency (E) were obtained with the amplification curve for RT1 (Fig. 3, insert), where the copy number (concentration) was given according to the following equation: $\text{copy nr} = 10^{(-0.264 * Ct + 12.125)}$ ($R = 0.99$; $R^2 = 0.99$, and $E = 0.84$) In Table 1, the absolute quantification of crostastatin-like genes expression in each venom gland is compared and normalized in terms of total amount of transcripts (messenger RNA, mRNA). From these data, it was verified that *B. atrox* expresses 87 times

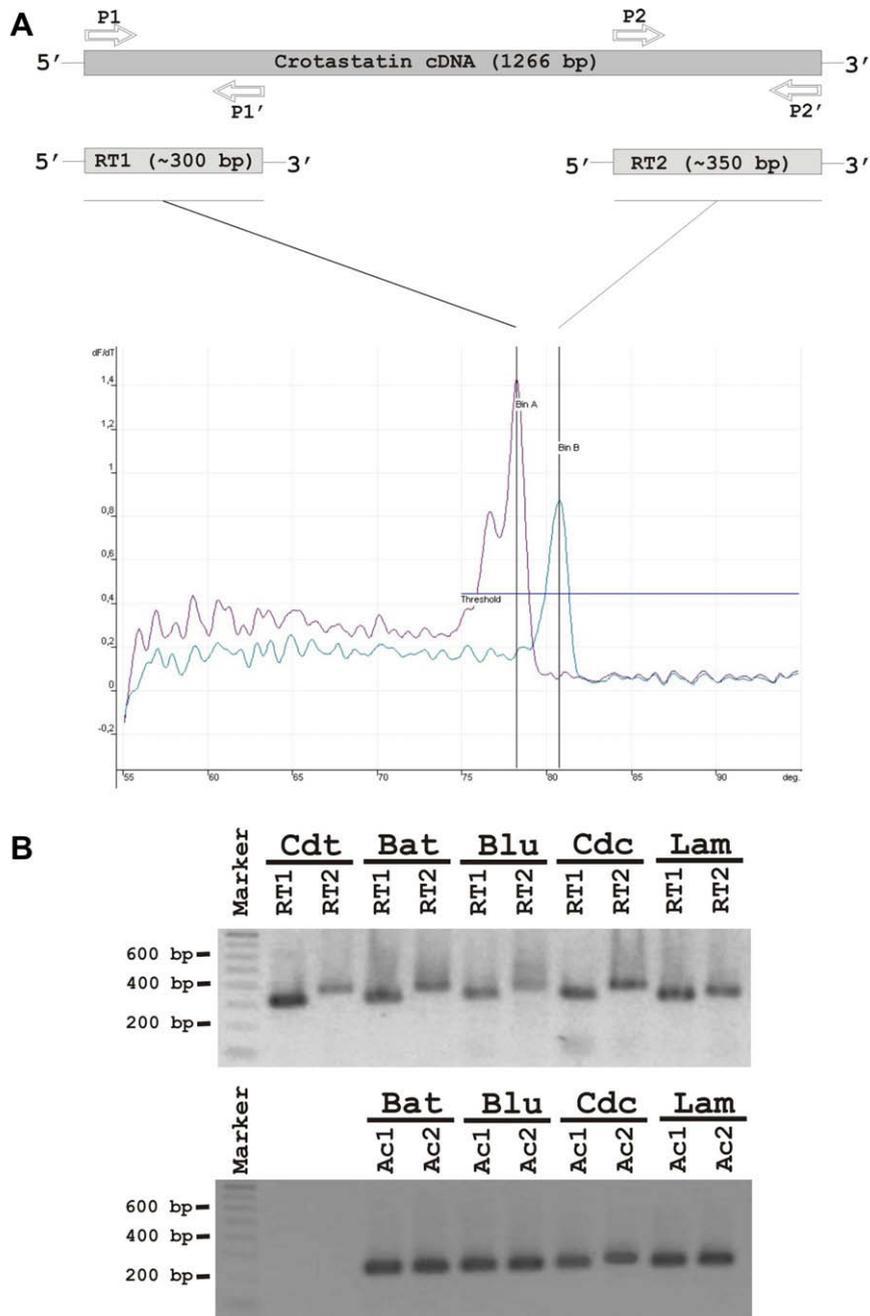


Fig. 2. Schematic strategy for the study of crostastatin-like polymorphism using real-time PCR. Specific primers, pairs P1/P1' (SVAT-SE1/SVAT-ASRT1) and P2/P2' (SVAT-RTSE2/SVAT-AS2) were synthesized based on the 5'- and 3'-coding region of the crostastatin gene (GenBank accession number DQ224420), which correspond to part of the conserved metalloprotease and cysteine rich domains. These primer pairs were used to generate standard melting curves (A). The melting curves for three different pool of Viperidae single-stranded cDNAs were compared: *Bothrops atrox* (Bat), *Crotalus durissus cascavella* (Cdc), and *Lachesis muta* (Lam). Blu stands for *Bothrops luzzi*. The real-time PCR products (RT1 and RT2) corresponding to the amplification products of our strategy were separated in 1.8% agarose gel and visualized with ethidium bromide (B). The β -actin amplified fragment (AC1 and AC2) was used for gene normalization and comparison (B).

(3.37×10^{16} copies per μg mRNA) more crostastatin-like message than *C. d. cascavella* ($3.88 \times 10^{14}/\mu\text{g}$ mRNA) and 7.5-fold higher than *L. m. rhombeata* ($4.45 \times 10^{15}/\mu\text{g}$ mRNA). In the venom gland of *L. m. rhombeata* crostastatin ortholog is expressed 11.5-fold in relation to *C. d. cascavella* homologue Fig. 3.

3.4. Cloning, amino acid sequences and functional inference of novel crostastatin-like metalloprotease genes

Making use of the same 5'- and 3'-flanking primers SVAT-SE1 and SVAT-AS2, employed to retrieve and clone the crostastatin cDNA from *C. d. terrificus* venom gland, six new

Table 1

Values of T_m , Ct, and numbers of copy of crostastatin-like transcripts in the venom glands of *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus cascavella* and *Lachesis muta rhombeata*

Crostastatin-like in the venom gland of	$T_m \pm$ SEM	Ct-value (threshold value)		Mean copy number		Mean copy nr/ μ g mRNA
		0.8 ng mRNA	0.08 ng mRNA	0.8 ng mRNA	0.08 ng mRNA	
<i>Bothrops atrox</i>	RT1 ^{Bat} = 77.33 \pm 0.03	15.63 \pm 0.14	19.50 \pm 0.18	1.79 $\times 10^{13}$ \pm 1.01	3.55 $\times 10^{12}$ \pm 1.20	3.37 $\times 10^{16}$ \pm 1.11
	RT2 ^{aBat} = 78.12 \pm 0.04					
	RT2 ^{bBat} = 79.90 \pm 0.04					
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	RT1 ^{Cdc} = 78.19 \pm 0.03	22.63 \pm 0.46	26.46 \pm 0.46	2.72 $\times 10^{11}$ \pm 1.21	3.48 $\times 10^{10}$ \pm 1.01	3.88 $\times 10^{14}$ \pm 1.11
	RT2 ^{Cdc} = 79.33 \pm 0.04					
<i>Lachesis muta rhombeata</i>	RT1 ^{Lam} = 76.25 \pm 0.10	17.95 \pm 0.07	21.94 \pm 0.25	2.67 $\times 10^{12}$ \pm 1.66	4.45 $\times 10^{11}$ \pm 1.01	4.45 $\times 10^{15}$ \pm 1.34
	RT1 ^{bLam} = 77.56 \pm 0.05					
	RT2 ^{Lam} = 78.71 \pm 0.20					

cDNA sequences were additionally cloned from the South American pit vipers studied in this work. Three cDNAs were cloned from the venom gland of *B. atrox* (batroxstatin-1, -2, and -3; GenBank accession numbers EU733639, EU733640 and EU733641), two others from *L. m. rhombeata* (lachestatin-1, and -2; EU733631 and EU733642) and one from *C. d. cascavella* (crostastatin-1; EU733638). These cDNAs encompass sequences of 1244–1472 nucleotides, which code for polypeptides sharing between 59% (batroxstatin-1 and -3) and 99% (crostastatin-1) of similarity with crostastatin. VAP1 itself shares 97% of similarity with crostastatin. The deduced amino acid sequences and the primary structures of batroxstatins, crostastatins and lachestatins are compared with VAP1 in Fig. 4. Due to the high similarity in their primary structures, most proteins domains, like metal-binding sites and cysteine pairings, are conserved in these crostastatin/VAP-like P-III SVMs. Easily seen in these sequences are the Ca²⁺-binding site I, II and III (residues 13, 97 and 204; 216–231; 280–296, respectively), the dimerization motif -QDHSK- (residues 131–135), the Zn²⁺-binding

site -HEMGNLGMDSH- (residues 146–157), the methionine residue of the M-turn (residue 170), and the D-loop (desintegrin ECD/RGD, residues 277–280). The region referred as hADAMs hyper-variable-region (HVR) (residues 374–395) is indeed variable also in these new members of SVMs.

Batroxstatins, crostastatins and lachestatins were also compared against the entire GenBank and the data collected were used to infer the dendrogram presented in Fig. 5. Based on such phylogenetic analysis, a clear branch is observed which includes the predicted amino acid sequences of crostastatin-like homologues (batroxstatin-2, crostastatin-1, lachestatin-1 and -2) and the sequences of mature vascular apoptosis-inducing proteins purified from snake venoms.

4. Discussion

Snake venom is a rich source of pharmacologically active compounds with a diverse spectrum of biological activities (Birrell et al., 2007; Yamazaki and Morita, 2007). The components of snake venom have been constantly and

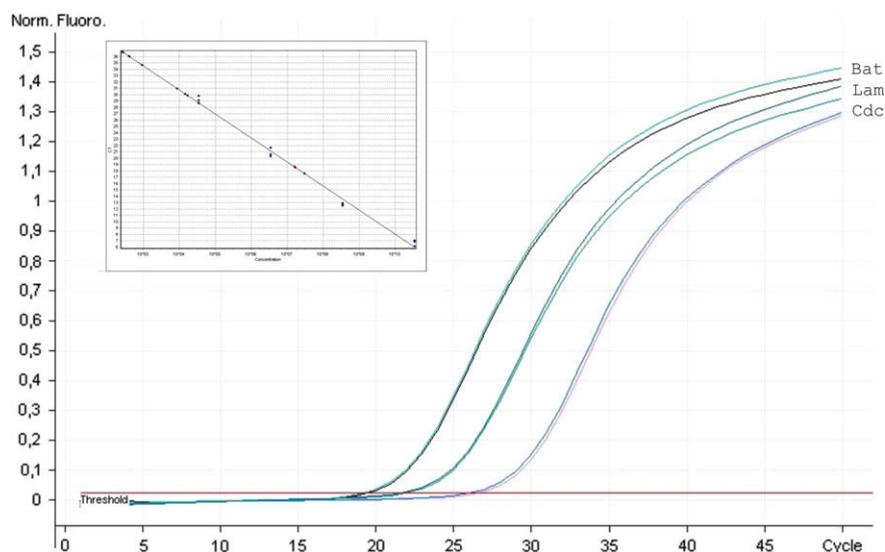


Fig. 3. Representative amplification (Ct) curves for absolute quantification of crostastatin-like metalloprotease transcripts in the venom gland of South American pit vipers. Single-stranded cDNAs of venom glands of *B. atrox*, *C. d. cascavella*, and *L. m. rhombeata*, equivalent to 0.08 ng of mRNA, were utilized for qRT-PCR analysis (see Section 2). In this figure, representative curves of each sample are shown in duplicate. The fluorescence was collected at 494–521 nm during the extension phase. The inset represents the amplification curve for the fragment RT1, utilized to calculate the copy number of crostastatin-like transcripts in each venom gland of the three snake species investigated here.

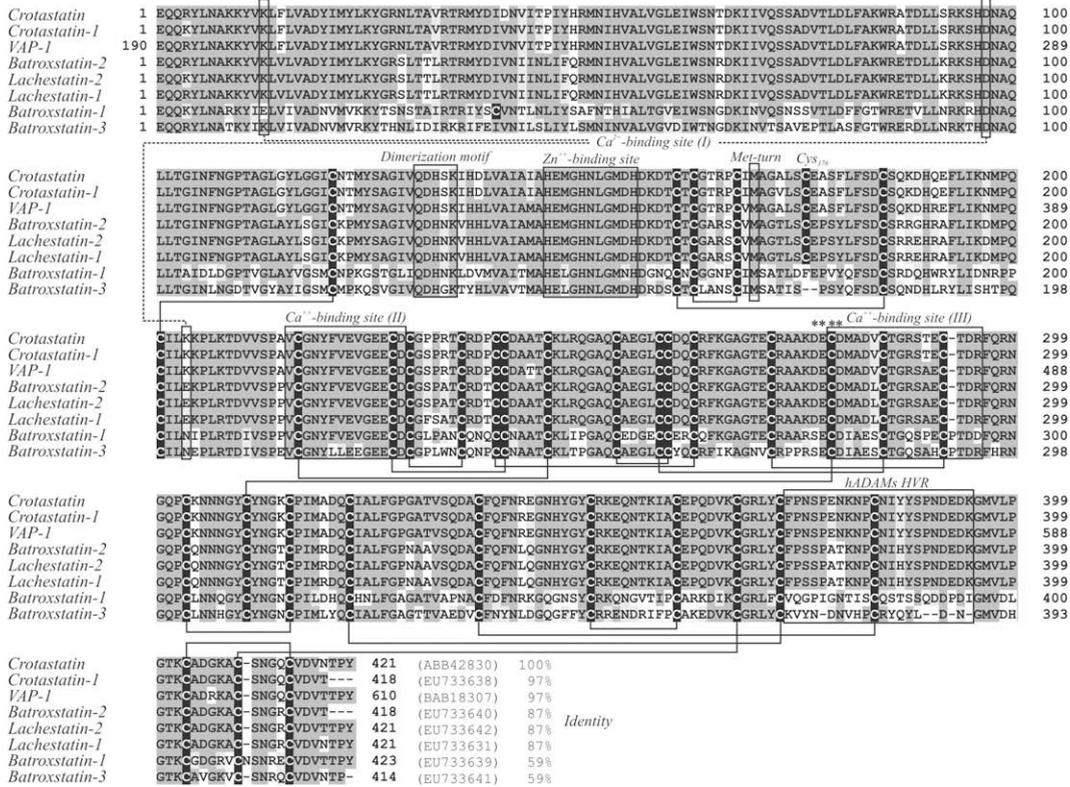


Fig. 4. Sequence alignment of VAP1/crotastatin-like metalloproteases and their principal structural characteristics. Batroxstatin-1, -2, and -3 (EU733639, EU733640, and EU733641), crotastatin (ABB42830), crotastatin-1 (EU733638), and lachestatin-1 and -2 (EU733631, and EU733642) were aligned with VAP1 (BAB18307) by using the ClustalW2 and Muscle 3.2 algorithms. Cysteine residues are labeled with black boxes, and whenever possible the S–S bonds are indicated by connecting continuous lines. Conserved amino acids are boxed in dark gray, and non-synonymous mutation are in white boxes. The principal conserved motifs (e.g. the dimerization motif - QDHSK-, and the hADAM HVR), and metal-binding sites (the Ca²⁺-binding sites I, II and III; and the Zn²⁺-binding site) were annotated for comparison, based on the works by Takeda et al. (2006) and Igarashi et al. (2007).

inexhaustibly investigated for application in medicine and biotechnology.

Up to date, biochemical information of approximately 200 snake venom metalloproteases is known. From this relatively huge number, only a few of these toxins have been described as vascular apoptosis- inducing protein (VAP). Since VAP1 and VAP1-like toxins have been worldwide purified from the venom of snakes belonging to the Viperidae family, we aimed to investigate whether South American pit vipers also express metalloproteases similar to VAPs. Representative snake species of three main genus of Crotalinae (Viperidae), in Brazil, were chosen for this work: *Crotalus durissus* (*C. d. terrificus* and *C. d. cascavella*), *Bothrops atrox* and *Lachesis muta rhombata*. These species inhabit distinct geographical regions of Brazilian territory and their venoms show the inter-specific and intra-specific variation in toxin composition. Based on the nucleotide sequence of VAP1 (GenBank accession number BAB18307), the primers SVAT-SE1 and SVAT-AS2 (acronym of snake venom apoptosis-inducing toxin) were synthesized and used for the cloning technique of homology screening by polymerase chain reaction (HS-PCR). These primers anneal to the gene segment that encodes the mature form of VAP1 homodomain, starting with the residues EQQR/KY and ending with the hexapeptide

DVNTPY. Applying this molecular cloning strategy, a VAP1-like gene sequence was retrieved from a *C. d. terrificus* venom gland phage cDNA library, constructed in 1999 from a single adult specimen of this subspecies of South American rattlesnake (Rádis-Baptista et al., 1999). The *C. d. terrificus* VAP1-like cDNA, i.e. crotastatin, is 1266 nucleotides long and encodes a PIII snake venom metalloprotease of the metzincin family with all three conserved domains: the Zn-metalloprotease, disintegrin and cysteine rich domain (MDC).

The following steps in our investigation were to verify the expression of crotastatin-like genes in the venom gland of the three other South American pit vipers (*B. atrox*, *C. d. cascavella*, and *L. m. rhombata*). To this aim, we made use of quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). In real-time PCR the amount of product formed is monitored during the course of the reaction by checking the fluorescence of dyes or probes, which were introduced into the mixture reaction. The fluorescence is proportional to the amount of product formed, and to the number of cycles required to obtain a particular amount of deoxyribonucleotide acid molecules. Assuming that the amplification efficiency is close to a doubling of the number of molecules per amplification cycle, it is possible to calculate the number of DNA molecules of the amplified sequence

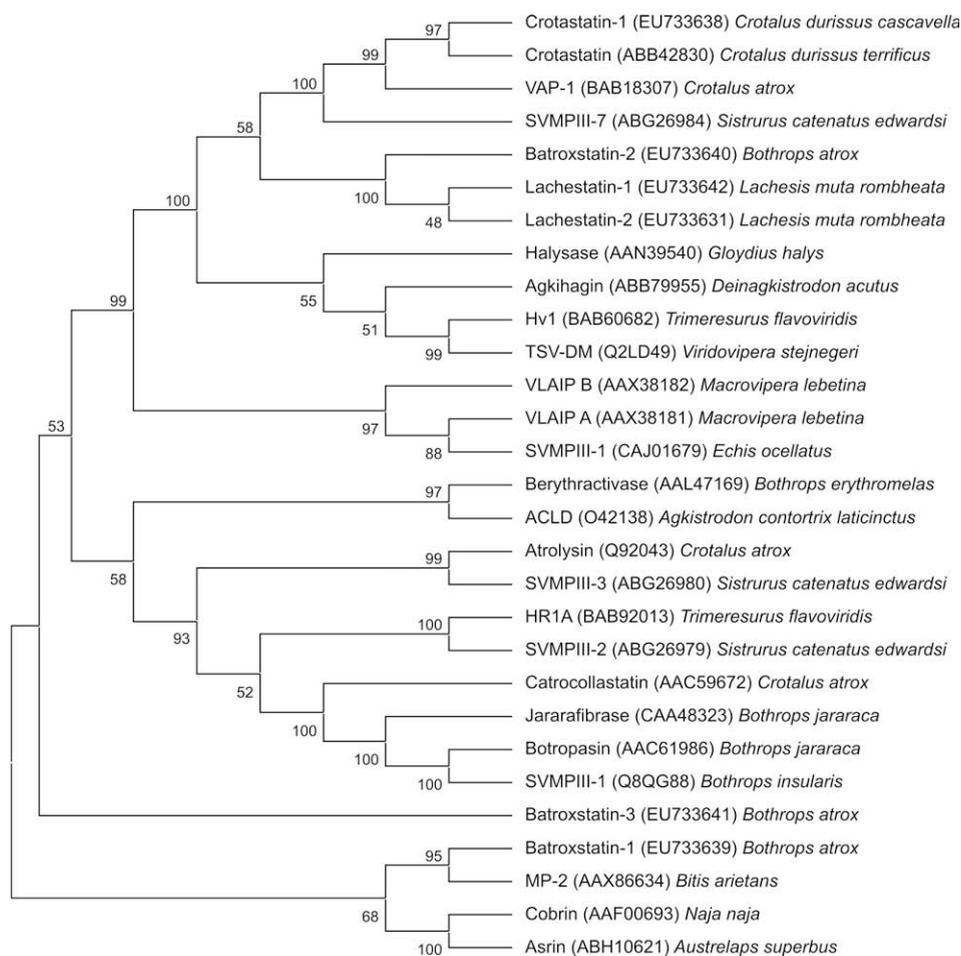


Fig. 5. Dendrogram of the South American pit viper VAP1/crotastatin-like homologues and the best scored snake venom metalloproteases type-III mature toxins (SVMP-III). The dendrogram was inferred as detailed in Section 2. The aligned toxins are listed by toxin name, GenBank accession number, and the scientific name of each snake specimen, as follows: ACLD (O42138) *Agkistrodon contortrix laticinctus*; agkihagin (ABB79955) *Deinagkistrodon acutus*; asrin (ABH10621) *Austrelaps superbus*; atrolysin (Q92043) *Crotalus atrox*; batroxstatin-1 (EU733639) *Bothrops atrox*; batroxstatin-2 (EU733640) *Bothrops atrox*; batroxstatin-3 (EU733641) *Bothrops atrox*; berythracivase (AAL47169) *Bothrops erythromelas*; botropasin (AAC61986) *Bothrops jararaca*; catrocollastatin (AAC59672) *Crotalus atrox*; cobrin (AAF00693) *Naja naja*; crotastatin (ABB42830) *Crotalus durissus terrificus*; crotastatin-1 (EU733638) *Crotalus durissus cascavella*; halysase (AAN39540) *Gloydus halys*; HR1A (BAB92013) *Trimeresurus flavoviridis*; Hv1 (BAB60682) *Trimeresurus flavoviridis*; jararafibrase (CAA48323) *Bothrops jararaca*; lachestatin-1 (EU733642) *Lachesis muta rombheata*; lachestatin-2 (EU733631) *Lachesis muta rombheata*; MP-2 (AAX86634) *Bitis arietans*; SVMPIII-1 (CAJ01679) *Echis ocellatus*; SVMPIII-1 (Q8QG88) *Bothrops insularis*; SVMPIII-2 (ABG26979) *Sistrurus catenatus edwardsi*; SVMPIII-3 (ABG26980) *Sistrurus catenatus edwardsi*; SVMPIII-7 (ABG26984) *Sistrurus catenatus edwardsi*; TSV-DM (Q2LD49) *Viridovipera stejnegeri*; VAP1 (BAB18307) *Crotalus atrox*; VLAIP A (AAX38181) *Macrovipera lebetina*; VLAIP B (AAX38182) *Macrovipera lebetina*. The numbers next to the branches represent the percentage of replicate trees in which the associated toxins clustered together in the bootstrap test.

that were initially present in the sample (Kubista et al., 2006). Real-time PCR has been used for absolute and relative quantification of nucleic acid template molecules (DNA and RNA) in a variety of applications, which include pathogen detection and loads, gene expression analysis, single nucleotide polymorphism and genotyping (Wilhelm and Pingoud, 2003). Consequently, quantitative real-time PCR is also becoming a standard method for measuring and comparing gene expression at the mRNA level (Ong and Irvine, 2002; Dussault and Pouliot, 2006). In our study of VAP1/crotastatin-like expression using qRT-PCR, we first achieved the melting curve analysis of crotastatin homologues to detect the presence of more than a single gene transcript in the venom glands of *B. atrox*, *C. d. cascavella*

and *L. m. rombheata*. In melting curves, the signal of fluorescence decreases gradually as a result of the melting (separation of the two DNA strands) of the amplicons. At certain temperature (melting temperature, T_m) the fluorescence is maximal and its value is determined, which indirectly reflects the nucleotide composition and product length. The primer pairs that amplify two separated and distinct crotastatin segments, RT1 (300 bp) and RT2 (350 bp) were used (see Section 2 and Fig. 2). Distinct melting temperatures were then observed when pool of positive clones for crotastatin of *C. d. terrificus* cDNA library were used as calibrator template, as well as when single-stranded cDNA pools prepared from the venom glands of *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rombheata* were analysed

(Table 1). These results confirmed that at least two crostastatin homologues are expressed in the venom glands of each of the three studied species of South American pit vipers.

To achieve the absolute quantification of the level of crostastatin-like transcripts in the pit vipers venom glands, standard curves of threshold were generated using a dilution series of crostastatin cDNA and the primers that amplify the segment RT1 and RT2. The Ct-values (number of amplification cycles required to reach a threshold) of the diluted standard was plotted versus the logarithm of crostastatin cDNA concentration (or copy numbers), so the concentration of an unknown sample could be obtained by the equation $CT = k * \log(N_0) + CT(1)$, and the PCR efficiency ($E = 10^{-1/k} - 1$) calculated by the slope (k). The intercept of the standard curve corresponds to the CT(1) of the diluted standard containing a single target molecule (Kubista et al., 2006). From the standard Ct curves of crostastatin segments RT1 and RT2, the values of amplification efficiency (E) of 0.87 ($k = -3.78$) and 1.07 ($k = -3.17$) were respectively obtained (calculation not completely shown for RT2). Although the E -value of RT2 is ideal – the value of 1 represents that a doubling of amplification product occurred in each cycle-, the correlation coefficient (R^2) was relatively low ($R^2 = 0.84$). In contrast, the R^2 value for the standard threshold curve of RT1 was sufficient good ($R^2 = 0.99$) to set the equation for calculating the number of copies of crostastatin-like transcripts in the pit vipers venom glands. The formula that best fit the real quantities of transcripts is: $CT = -3.78 * \log(\text{conc}) + 53.86$ or, directly, $\text{Conc} = 10^{(-0.264 * CT + 14.24)}$, where concentration (conc) can be read as 'copy number'. Using this formula we were able to calculate the amount of crostastatin-like mRNA molecules in the venom gland of each snake species studied here: the higher expression level is observed in *B. atrox* venom gland, where it was calculated to contain 3.37×10^{16} copies per microgram of mRNA. The calculated number of crostastatin-like transcript in *L. m. rhombeata* and *C. d. cascavella* is 4.45×10^{15} and 3.88×10^{14} molecules/ μg mRNA, respectively. So, in relative terms *B. atrox* expresses almost 90 times more crostastatin-like gene than *Crotalus durissus cascavella* and 7.5 times more than *Lachesis muta rhombeata*. In the venom gland of *L. m. rhombeata*, crostastatin-like gene is expressed 11.5 -fold in relation to its ortholog in *C. d. cascavella* (Fig. 3 and Table 1).

These numbers are interesting since they quantitatively reflect a notable difference in the level of VAP1/crostastatin-like mRNA expression in the venom glands of these three snake species, when the venom gland cDNA pools – used as templates – are normalized for microgram of mRNA.

Since all qRT-PCR products were amplified with one of the two SVAT primer pairs (SVAT-SE1/SVAT-RTAS1 for amplicon RT1, and SVAT-RTSE2/SVAT-AS2 for amplicon RT2), we utilized the combination of SVAT-SE1 and SVAT-AS2 to clone the complete crostastatin-like cDNAs. Thus, three novel cDNAs were cloned from the venom gland of *Bothrops atrox* (batroxstatin-1, -2, and -3), two others from *Lachesis muta rhombeata* (lachestatin-1, and -2) and one from *Crotalus durissus cascavella* (crostastatin-1).

These cDNAs encodes highly similar metalloproteases, which share the common characteristics of most PIII-class

and, particularly, of VAP1 (Fig. 4). Based on the structural analysis of VAP1 (Takeda et al., 2006) and of our crostastatin-like toxins, it is clearly evident the Ca^{2+} -binding site I, II and III, the dimerization motif -QDHSK-, the Zn^{2+} -binding site -HEMGNLGMDS-, the methionine residue of the M-turn, the D-loop (desintegrin ECD/RGD), and the human ADAMs hyper variable region as well (Fig. 4). Special mention should be made for the cysteine residues in these sequences: the Cys176 (also indicated in Fig. 4), which corresponds to the Cys365 in VAP1 (Igarashi et al., 2007), has an essential role in the dimerization of each monomer, by which it forms an intermolecular S–S bond in the homodimer. Interestingly, the most divergent batroxstatin-1 and -3 proteins have missed their Cys176, although preserved all the other 34 cysteine residues that might be involved in 17 intrachain S–S bonds. On the other hand, lachestatin-1, beside its 35 cysteine residues, has an additional cysteine at position 40 (Cys40), which might bind to Cys 176, forming 18 intrachain S–S bonds, and consequently might be expressed in the venom as a monomer. The predictive pattern of S–S bonds of these novel crostastatin/VAP-like toxins should be further validated by molecular modeling analysis and by interpretation of physical structural data. However, since VAP1 is a homodimer and VAP2 is a single chain toxin, whose crystal structures were solved by X-Ray diffraction (Takeda et al., 2006; Igarashi et al., 2007), detailed inferences can be further done for members of SVMPs that is subgrouped here.

In fact, molecular phylogenetic analysis of high scored aligned sequences indicates that batroxstatin-2, crostastatins, and lachestatin-1 and -2 are dicotomically distributed in branches that delimit SVMP members, which in some cases were experimentally proved to be dimeric apoptosis-inducing proteins/toxins (Fig. 5). Evidently, biological assays should be conducted with recombinant or native proteins to ascertain that such VAP1/crostastatin-like can effectively induce apoptosis. Interestingly, even if VAP1/crostastatin-like genes are expressed at different levels in the venom gland of South American pit vipers, and accelerated evolution is a molecular process of diversification of toxin genes, snake species inhabiting geographical regions as diverse as Asia (*Bitis arietans*, *Gloydius halys*, and *Trimerurus flavoviridis*), North (*Sistrurus c. edwardsi* and *Crotalus atrox*), and South America (*Bothrops atrox*, *Crotalus durissus* and *Lachesis muta*, this work), which have diverged millions of years ago, maintain the expression of highly similar metalloproteases sequences, like vascular endothelial inducing-apoptosis protein (VAP) and crostastatin isoforms. Thus, the recruitment of such gene might contribute in some way to the pool of hemorrhagic toxin responsible for the envenomation and tissue damage caused by Viperidae (vipers and pit vipers) venoms.

Taken together, we present compelling data concerning to the quantitative difference in the expression level of VAP1/Crostastatin-like mRNA in the venom glands of three representative South American pit vipers: *Bothrops atrox*, *Lachesis muta rhombeata* and *Crotalus durissus cascavella*. Moreover, the information present here widen the possibility of investigating the variation of venom composition,

particularly of a given subgroup of toxins, using the robust molecular technique analysis of quantitative real-time PCR.

Acknowledgements

We are indebted to The National Brazilian Council for the Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support to this work. We are thankful to the post-graduate students Lucas A. C. Brandão and Rafael L. Guimarães for the technical assistance with the experiments of qRT-PCR, and Taysa A. Vasconcelos and Lidiany A. Linhares for the care with the snake specimens. N.A.C.T. and J.M.C. are, respectively, master and doctoral students supported by fellowships from CNPq. G.R.B. is a member of the Scientific Committee of The National Council for the Scientific and Technological Development (CNPq).

Conflict of interest

None declared.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17), 3389–3402.
- Araki, S., Masuda, S., Maeda, H., Ying, M.J., Hayashi, H., 2002. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. *Toxicon* 40 (5), 535–542.
- Baldo, C., Tanjoni, I., León, I.R., Batista, I.F., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarante-Mendes, G.P., Rodrigues, V.M., Peralles, J., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2008. BnP1, a novel P-1 metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* 51 (1), 54–65.
- Birrell, G.W., Earl, S.T., Wallis, T.P., Masci, P.P., de Jersey, J., Gorman, J.J., Lavin, M.F., 2007. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Mol. Cell. Proteomics* 6 (6), 973–986.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1995. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. *Methods Enzymol* 248, 345–368.
- Brooksbank, C., Camon, E., Haris, M.A., Magrane, M., Martin, M.J., Mulder, N., O'Donovan, C., Parkinson, H., Tuli, M.A., Apweiler, R., Birney, E., Brazma, A., Henrick, K., Lopez, R., Stoesser, G., Stoehr, P., Cameron, G., 2003. The European Bioinformatics Institutes data resources. *Nucleic Acids Res.* 31, 43–50.
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., Sanz, L., 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45, 1063–1074.
- Cidade, D., Wermelinger, L.S., Lôbo-Hajdu, G., Dávila, A.M., Bom, C., Zingali, R.B., Albano, R.M., 2006. Molecular diversity of disintegrin-like domains within metalloproteinase precursors of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 48, 590–599.
- Dussault, A.A., Pouliot, M., 2006. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online* 8, 1–10.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med* 285, 1182–1186.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45 (8), 997–1011.
- Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys* 308, 182–191.
- Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., Takeda, S., 2007. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprotolysin family proteins. *FEBS Lett.* 581, 2416–2422.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci* 8, 275–282.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med* 27 (2–3), 95–125.
- Maruyama, J., Hayashi, H., Miao, J., Sawada, H., Araki, S., 2005. Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases. *Toxicon* 46 (1), 1–6.
- Masuda, S., Araki, S., Yamamoto, T., Kaji, K., Hayashi, H., 1997. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 235 (1), 59–63.
- Masuda, S., Hayashi, H., Araki, S., 1998. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family. *Eur. J. Biochem* 253 (1), 36–41.
- Masuda, S., Hayashi, H., Atoda, H., Morita, T., Araki, S., 2001. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem* 268 (11), 3339–3345.
- Moura-da-Silva, A.M., Butera, D., Tanjoni, I., 2007. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Curr. Pharm. Des* 13 (28), 2893–2905.
- Ong, Y.L., Irvine, A., 2002. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology* 7, 59–67.
- Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C., 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11, 305–312.
- Rádis-Baptista, G., 2005. Integrins, cancer and snake toxins (mini-review). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis* 11 (3), 217–241.
- Rádis-Baptista, G., Oguiura, N., Hayashi, M.A., Camargo, M.E., Grego, K.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., 1999. Nucleotide sequence of crotoamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 37 (7), 973–984.
- Ramos, O.H., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Snake venom metalloproteinases—structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol* 142 (3–4), 328–346.
- Rottenberg, D., Bamberger, E.S., Kochva, E., 1971. Studies on ribonucleic acid synthesis in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Ophidia, Reptilia). *Biochem. J.* 121, 609–612.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Swenson, S., Ramu, S., Markland, F.S., 2007. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. *Curr. Pharm. Des* 13 (28), 2860–2871.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., Araki, S., 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 25 (11), 2388–2396.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Saldanha-Gama, R.F., de Freitas, M.S., Barja-Fidalgo, C., Amarante-Mendes, G.P., Moura-da-Silva, A.M., 2005. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis* 10 (4), 851–861.
- Trummal, K., Tõnismägi, K., Siigur, E., Aaspõllu, A., Lopp, A., Sillat, T., Saat, R., Kasak, L., Tammiste, I., Kogerman, P., Kalkkinen, N., Siigur, J., 2005. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. *Toxicon* 46 (1), 46–61.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* 4 (11), 1120–1128.
- Wu, W.B., Huang, T.F., 2003. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. *Exp. Cell Res.* 288, 143–157.
- Yamazaki, Y., Morita, T., 2007. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. *Curr. Pharm. Des* 13 (28), 2872–2886.
- You, W.K., Seo, H.J., Chung, K.H., Kim, D.S., 2003. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J. Biochem* 134, 739–749.
- You, W.K., Jang, Y.J., Chung, K.H., Jeon, O.H., Kim, D.S., 2006. Functional roles of the two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 339 (3), 964–970.
- Zhong, H., Bowen, J.P., 2006. Antiangiogenesis drug design: multiple pathways targeting tumor vasculature. *Curr. Med. Chem.* 13 (8), 849–862.

3.CONCLUSÕES

- Relatamos um caso raro de acidente ofídico ocasionado pela serpente do Gênero *Lachesis*. Este se trata do primeiro relato confirmado para o estado de Pernambuco cujos sintomas do acidente corroboram com os já citados na literatura.
- Caracterizamos o acidente ofídico, na Região Metropolitana do Recife (RMR), durante o período de 1992 a 1993; 1995 a 1997 e durante janeiro de 2000 a agosto de 2002. Através deste relatamos pela primeira vez na estória do ofidismo no Brasil, que o Gênero *Crotalus* é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos na RMR. Gênero este responsável por alta taxa de mortalidade entre os acidentes.
- Resolvemos então desvendar o perfil histórico dos acidentes ofídicos na RMR, para sabermos se o acidente crotálico foi predominante apenas no período do estudo anterior ou se essa é uma realidade que contraria o perfil do acidente ofídico para o Brasil. Então podemos constatar que o acidente crotálico sempre foi predominante na RMR. E agora nos resta saber se esse perfil é exclusivo da RMR ou trata-se do perfil do estado de Pernambuco, talvez até mesmo do Nordeste, cujos estudos epidemiológicos são escassos, ou melhor, quase inexistentes.
- Os diferentes cDNAs obtidos a partir da glândula de veneno dos viperídeos *Crotalus durissus cascavela*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta* foram clonados com sucesso.
- Utilizando a técnica de PCR em tempo real e a dedução de aminoácidos utilizando ferramentas de bioinformática, foi possível observar que os genes

clonados apresentam alta similaridade a outras metaloproteases consideradas indutoras de apoptose vascular.

- Ainda através da técnica de PCR em tempo real nós pudemos caracterizar e quantificar a expressão diferencial de transcritos por esses homólogos.
- Os genes clonados apresentam significativa importância por fazerem parte de uma relativa minoria, os indutores de apoptose vascular, e apresentarem uma atividade biológica merecedora de todas as atenções, e que pode ser utilizada como ferramenta terapêutica para o controle do câncer.
- Com a proposta de produzir proteínas funcionais a partir de proteínas, subclonamos o gene crotostatin, anteriormente clonado por nós, na proposta de obtermos regiões específicas do gene responsável por atividades biológicas individualizadas.
- Os genes subclonados continham as regiões codificantes para o Domínio Metaloprotease, Domínio Disintegrina, Domínio Rico em Cisteína, Domínios Metaloprotease e disintegrina, e Domínios Disintegrina e Rico em Cisteína.
- Os insertos foram inseridos em vetor de expressão fusionado com GFP para posterior expressão, purificação e caracterização das atividades biológicas.

ANEXOS

Anexo A: Modelo do Boletim para Observação de Accidente Ophidico adaptado de AMARAL (1930) (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

INSTITUTO BUTANTAN
CAIXA POSTAL 05 - S. PAULO

BOLETIM PARA OBSERVAÇÃO DE ACCIDENTE OPHIDICO

Tratamento feito pelo Sr......
Residente em..... *no Estado de*.....
Na pessoa de..... *de*..... *anos de idade.*
Ponto do corpo em que foi mordido:.....

.....

1.º — *Qual o nome da cobra que mordeu?*
R. —

2.º — *Qual o numero de horas decorridas entre a hora em que se deu o accidente e a da 1.ª injecção?*
R. —

3.º — *Qual a qualidade do soro empregado? Quantas empolas?*
R. —

4.º — *Qual o resultado do tratamento? Cura?*
R. —

5.º — *Houve cegueira?*
R. —

6.º — *Houve hemorrhagia?*
R. —

7.º — *Houve paralytia?*
R. —

8.º — *Houve inchação no lugar mordido?*
R. —

9.º — *Em que data occorreu o accidente?*
R. — de de 19.....

Observações:

.....

.....

N. B. — No caso de ter sido applicado em animal, façam-se as alterações necessarias.
O Director do Instituto, desejando colher elementos para a organização da estatística dos accidentes ophidicos tratados pelo soro, pede instantemente ás pessoas que tiverem tido a opportunidade de applicar esse recurso therapeutico, o obsequio de encherem este boletim, devolvendo-o em seguida a este estabelecimento, acompanhado de todos os esclarecimentos que julgarem util accrescentar aos que constam das perguntas acima.

Anexo B: Modelo atual da Ficha de notificação e atendimento do acidente Ofídico do Hospital da Restauração, Recife-PE.



GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO
SECRETARIA DE SAÚDE
FUNDAÇÃO AMAURY DE MEDEIROS – FUSAM
HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO
CENTRO DE ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA



Ficha de Notificação e Atendimento

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE				Pront. HR:			
Data: / /	Hora:	Not. ANVISA:		Rg. Ceatox:			
Nome:							
Nome da Mãe:							
Sexo: () Masculino () Feminino		Nasc. / /	Idade:	() Meses () Ano () Ignorado			
Endereço:				Nº			
Bairro:		Cidade:		UF:			
Tel.	Zona: () Urb. () Rur. () Ig.		Gestante: () Sim () Não de aplica				
Escolaridade: () 1º Grau () 2º Grau () 3º Grau. ()			() Completo () Incompleto () Analfabeto () Ignorado				
Profissão:							
DADOS DO EVENTO		Data do Acidente: / /		Hora:			
ATENDIMENTO		OCORRÊNCIA		CIRCUNSTÂNCIA			
<input type="checkbox"/> Telefônico	<input type="checkbox"/> Hospitalar	<input type="checkbox"/> Intoxicação	<input type="checkbox"/> Acid. Individual	<input type="checkbox"/> Abstinência			
<input type="checkbox"/> Hospital	<input type="checkbox"/> UTI	<input type="checkbox"/> Exposição	<input type="checkbox"/> Acid. Coletivo	<input type="checkbox"/> Abuso			
<input type="checkbox"/> Triagem	<input type="checkbox"/> Sala (vermelho) (laranja)	<input type="checkbox"/> Reação Adversa	<input type="checkbox"/> Acid. Ambient.	<input type="checkbox"/> Ingesta Alimentar			
<input type="checkbox"/> Consultório	<input type="checkbox"/> Sala (amarela) (verde)	<input type="checkbox"/> Diag. diferec.	<input type="checkbox"/> Ocupacional	<input type="checkbox"/> Tentativa de Suicídio			
<input type="checkbox"/> Ambulatório	<input type="checkbox"/> Sala de Nebulização	<input type="checkbox"/> Sind. de Abstin.	<input type="checkbox"/> Uso Terapêutico	<input type="checkbox"/> Tentativa de Aborto			
<input type="checkbox"/> Outros Cits	<input type="checkbox"/> Emerg. Pediátrica	<input type="checkbox"/> Ignorado	<input type="checkbox"/> Prescrição Ina.	<input type="checkbox"/> Uso Indevido			
<input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Clínica Médica	<input type="checkbox"/> Outro	<input type="checkbox"/> Erro na Adm.	<input type="checkbox"/> Ignorado			
<input type="checkbox"/> Residência	<input type="checkbox"/> Corredor	Qual? _____	<input type="checkbox"/> Automédica.	<input type="checkbox"/> Outro			
EXPOSIÇÃO			Endereço:				
Zona	Local		Bairro:	Cidade:	UF:		
<input type="checkbox"/> Urbana	<input type="checkbox"/> Resid.	<input type="checkbox"/> Escola/ Creche	Tempo decorrido da Exp. ()		(Horas) (Min.) (Mês) (Ign)		
<input type="checkbox"/> Rural	<input type="checkbox"/> Amb. Trab.	<input type="checkbox"/> Amb. Ext.	Duração da Exposição ()		(Horas) (Min.) (Mês) (Ign)		
<input type="checkbox"/> Ign.	<input type="checkbox"/> Trajeto Trab.	<input type="checkbox"/> Ignorado	Agente Tóxico				
<input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Serviço Saúde	<input type="checkbox"/> Outro	Animal		Químico		
Via		Tipo		<input type="checkbox"/> Serpente	<input type="checkbox"/> Lagar.	<input type="checkbox"/> Medicam.	<input type="checkbox"/> Cosméticos
<input type="checkbox"/> Cutânea	<input type="checkbox"/> Vaginal	<input type="checkbox"/> Aguda – única		<input type="checkbox"/> Escorpião	<input type="checkbox"/> Aranha	<input type="checkbox"/> Agro. Agr.	<input type="checkbox"/> Metais
<input type="checkbox"/> Oral	<input type="checkbox"/> Morded.	<input type="checkbox"/> Aguda – Repetida		<input type="checkbox"/> Abelha	<input type="checkbox"/> Ictismo	<input type="checkbox"/> Agro. D	<input type="checkbox"/> Drogas Abu
<input type="checkbox"/> Resp.	<input type="checkbox"/> Picada	<input type="checkbox"/> Crônica		<input type="checkbox"/> Formiga	<input type="checkbox"/> Hemip.	<input type="checkbox"/> Prod. Vete	<input type="checkbox"/> Prod. Quím.
<input type="checkbox"/> Parenteral	<input type="checkbox"/> Ocular	<input type="checkbox"/> Aguda sobre única		<input type="checkbox"/> Lacreia	<input type="checkbox"/> Coleop.	<input type="checkbox"/> Raticida	<input type="checkbox"/> Plantas
<input type="checkbox"/> Nasal	<input type="checkbox"/> Retal	<input type="checkbox"/> Ignorado		<input type="checkbox"/> Outro	<input type="checkbox"/> Ignor.	<input type="checkbox"/> Dominoss.	<input type="checkbox"/> Alimentos
<input type="checkbox"/> Ocular	<input type="checkbox"/> Ignor.	<input type="checkbox"/> Outra		Peçonhento () Sim () Não		<input type="checkbox"/> Ignorado	Quantid.
Observações:			Espécie:		Grupo Médico:		
Nome comercial:							

4. ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Artigos Publicados

[Correia, J.M](#) ; [Amorim, M.L.P.](#) ; Santana Neto, P. L. ; [Escobar, JAC](#) ; [Silva, J.F.](#) . Poisoning due to *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) attended at Restauração Hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil: case report. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso) **JCR**, v. 43, p. 336-338, 2010.

Trabalhos apresentados em congressos

Tavares, N.A.C.; [Correia, J.M.](#); Melo, K.M.S.; Sales-Valença, N.S.M.; Guarnieri, M.C.; Prieto-da-Silva, A.R.B.; Rádis-Baptista, G. QUANTITATIVE REAL-TIME PCR REVEALS DIFFERENTIAL EXPRESSION OF VAP1/CROTOSTATIN-LIKE METALLOPROTEASES mRNAS IN VENOM GLANDS. (*enviado*). Congresso Internacional de Toxinologia. 2009.

[J.M. Correia](#), K.M.S. Melo, N.A.C. Tavares, A.R.B. Prieto-da-Silva, G. Rádis-Baptista. IN SILICO STRUCTURAL ANALYSIS OF SIX VAP1/CROTOSTATIN-LIKE cDNA SEQUENCES FROM THE VENOM GLANDS OF SOUTH AMERICAN PIT VIPERS. (*enviado*). Congresso Internacional de Toxinologia. 2009.

Pedro LS Neto, Maria L P Amorim, Américo E Júnior, Gandhi R Baptista, [Juliana M Correia](#). EPIDEMIOLOGIC ASPECTS OF SNAKEBITES ATTENDED AT HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO IN PERNAMBUCO DURING 2000 THE 2007. (*enviado*). Congresso de Medicina Tropical. 2009.

Correia, J. M. ; [Santana Neto, P.L.](#) . Acidentes por Bothrops na Região Metropolitana do Recife-Pernambuco Diferem da Estatística Nacional. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da UFPE, 2009, Recife. Assistência a Saúde, 2009.

Germana. M.M. ; Correia, J. M. ; Silveira, E. ; Porto, T.S. ; Teixeira, M.F.S. ; Porto, A.L.F. . Optimization of Culture Medium for the Fibrinolytic Enzyme Production by *Streptomyces* sp.. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal. Bioprocessos, 2009.

[Santana Neto, P.L.](#) ; Pinho, M.S.S. ; Júnior, AEO ; Correia, J. M. . Perfil Epidemiológico dos Acidentes Ofídicos Causados pelas Famílias Viperidae e Elapidae, no Período de 1992-2008. In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte. Acidentes com Animais Peçonhentos. Belo Horizonte, 2009.

[Escobar, JAC](#) ; Correia, J.C. ; Oliveira Júnior, Américo Ernesto de ; Santana Neto, P. L. ; [Amorim, M.L.P.](#) . Distribuição Geográfica dos Acidentes Ofídicos de Importância Médica no Estado de Pernambuco Atendidos no CEATOX-HR (1992-2009). In: III Simpósio Nordeste de Ciências Biológicas, 2010, Recife. Saúde Pública, 2010.

Santana Neto, P. L. ; Oliveira Júnior, Américo Ernesto de ; [Correia, J.M](#) ; [Amorim, M.L.P.](#) Ofidismo no Estado de Pernambuco (1992-2009); Uma abordagem histórica.. In: III Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica, 2010, Florianópolis. Epidemiologia, 2010. v. 23. p. 52-52.

Participação em congressos

I Encontro de Herpetologia em Pernambuco. 2009. (Encontro).

XVI World Congress of the International Society on Toxinology. 2009. (Congresso).

Co-orientação de Monografia

Maria Clara Rodovalho de Souza e Silva. Expansão geográfica de *Crotalus durissus cascavella* e acidentes crotálicos na zona da mata do estado de Pernambuco, Brasil. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Juliana Mendes Correia.

Palestras proferidas

Desafios e Prioridades da Herpetofauna em Pernambuco. I Encontro de Herpetologia em Pernambuco. 2009.

Orientações em andamento

Pedro Lima de Santana Neto, Aluno da Universidade Católica – Desenvolve projetos sobre epidemiologia dos acidentes ofídicos.

Outros

Alencar, N.T. ; Correia, J. M. ; [Guarnieri, M.C.](#) ; Vasconcelos, T. ; [Rádis-Baptista, G.](#) .
Genes Homólogos de Viperídeos Sul americanos. 2008. (Publicação de genes no GenBank).



Case Report/Relato de Caso

Poisoning due to *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) attended at Restauração Hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil: case report

Envenenamento por *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) atendido no Hospital da Restauração do Recife, Estado de Pernambuco, Brasil: relato de caso

Juliana Mendes Correia¹, Pedro de Lima Santana Neto², Milena Sardou Sabino Pinho², José Afrânio da Silva², Maria Lucineide Porto Amorim² and José Arturo Costa Escobar³

ABSTRACT

Few papers have been published on snake bites caused by *Philodryas olfersii*. We report here the first case identified at the Centro de Assistência Toxicológica do Hospital da Restauração, Recife, State of Pernambuco. This case was described based on medical protocols, interviewing the patient and identifying the animal that caused the bite. The patient presented pain, heat, erythema, edema and ecchymosis, without other laboratory abnormalities or coagulation disorders. The treatment consisted of administration of eight ampoules of antiothropic serum, and post-administration allergic reactions were observed. The importance of bites by opisthophthalm snakes needs to be reconsidered in research and at specialized treatment centers.

Key-words: Snake bite. Toxinology. Colubridae. *Philodryas olfersii*.

RESUMO

Existem poucas publicações de acidentes ofídicos causados pela espécie *Philodryas olfersii*. Relatamos aqui o primeiro caso identificado no Centro de Assistência Toxicológica do Hospital da Restauração, Recife, Estado de Pernambuco. A descrição do caso foi realizada com base nos protocolos médicos, entrevista com o paciente e identificação do animal causador do acidente. O paciente apresentou dor, calor, eritema, edema e equimose, sem outras alterações laboratoriais ou distúrbios da coagulação. O tratamento executado mediante a administração de oito ampolas de soro antiofídico apresentou reações alérgicas pós-administração. A relevância dos acidentes por serpentes opistóglifas deve ser reconsiderada na pesquisa e nos centros de tratamento especializados.

Palavras-chaves: Acidente ofídico. Toxinologia. Colubridae. *Philodryas olfersii*.

INTRODUCTION

The snake *Philodryas olfersii*, Family Dipsadidae, Subfamily Xenodontinae¹, is known as *Cobra-cipó*, *Cobra de São João* or more frequently as the green snake because of its coloration. This species is found in Argentina, Paraguay, Uruguay and Brazil. In Brazil, its range of occurrence goes from the southern to the northeastern region. It is commonly found in open areas like the savanna (*Cerrado*) and arid scrub (*Caatinga*) vegetation zones, but it is more likely to be found in transition zones and in forests. In Pernambuco, these animals are

widely distributed and can be found in all subregions: forest zone (*Zona da Mata*), semi-arid zone (*Agreste*) and arid zone (*Sertão*). It possesses Duvernoy's serum mucosa secretion gland, located in the posterior region of the maxilla. This is characteristic of opisthophthalm snakes and is responsible for synthesis of the toxins involved in snake bite patterns^{2,3}

The clinical characteristics of poisoning episodes caused in humans by this snake include edema, erythema and ecchymosis, regional lymphadenopathy, neurotoxic effects and myotoxic effects. These symptoms are similar to those from bothropic poisoning, but without coagulative disorders. The composition of *Philodryas olfersii* venom is 75-90% proteins, and these mainly cause a fast edematogenic process, hemorrhage and pain^{3,4}. The lethal dose (LD₅₀) observed by Teixeira da Rocha and Furtado was 62.43µg/mouse. Some of these components act in a manner that is biologically similar to that of bothropic venom, but the effects develop faster than in *Bothrops* bites⁴. It might be possible to purify some of these components and use them as tools for studying biochemical cascade models.

Only a few cases of human poisoning caused by *Philodryas* have been described and published in the literature^{2,4,5}. Some cases can be falsely diagnosed or confused as bothropic events because of the similar clinical aspects of the poisoning. Although government policies on treatments for snakebite poisoning encompass bites caused by the genus *Philodryas*, we believe that, given Brazilian healthcare realities in municipalities far from the metropolis, some units in Pernambuco may not be prepared to differentiate *Philodryas* from bothropic bites, or to treat it as a different diagnosis. This may be because of the importance of bothropic events and relative rarity of bites involving *Philodryas*. Some clinical backgrounds without coagulative disturbances that develop fast can only be neutralized and treated with antiothropic serum, as can be seen in the present case.

There are eleven healthcare units in Pernambuco focusing on anti-snake venom serum administration, and these are known as GERES (regional health management centers). Accidents involving poisonous animals throughout the metropolitan region of Recife are attended at the Toxicological Care Center (CEATOX) of Restauração Hospital (GERES I). We observed the presence of patients from municipalities regulated by other GERES centers who were seeking treatment at Restauração Hospital, perhaps because of the referral service of this toxicological center and complications in diagnosing and treating some cases. Few studies characterizing the injuries

1. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, PE. 2. Center of Toxicological Assistance. Recife, PE. 3. Program of Post-Graduation on Cognitive Psychology, Recife, PE.

Address to: Dr. Pedro de Lima Santana. Center of Toxicological Assistance, Restauração Hospital. Av. Agamenon Magalhães s/n, 52010-140, Recife, PE, Brazil. e-mail: biologyscorpion@gmail.com

Received in 06/11/2009

Accepted in 19/02/2010

caused by venomous animals in Pernambuco have been conducted. We are currently developing some research on this topic⁶.

The objective of this report was to present and describe the first confirmed case of poisoning by *Philodryas olfersii* that was treated in the Restauração Hospital, at CEATOX, the main healthcare center for treatment of poisoning in the State of Pernambuco, located in the state capital, Recife.

CASE REPORT

A 17-year-old male patient came to the Restauração Hospital from Curado IV, a neighborhood of the municipality of Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco (8° 6' 46" S, 35° 0' 54" W). He was admitted to the hospital on January 4, 2009, at 1:44 PM, approximately 18 hours after being bitten on his right hand. He reported local pain and edema. The physical examination revealed the presence of erythema, significant edema and ecchymosis in the entire arm (Figures 1A and 1B). No systemic abnormalities were observed. The following laboratory tests

were requested: bleeding time, coagulation time, prothrombin time, fibrinogen, creatine kinase, lactate dehydrogenase, urea, creatinine and urine summary. Upon request from a vascular surgeon, Doppler ultrasonography was also requested. The proposed treatment was intravenous (i.v.) hydration, painkiller if necessary, corticoid (30' before serum administration) and eight vials of antiothropic serum (i.v.). After administration of the specified serum, the patient presented early allergic reactions that progressed to erythematous plaques with itching on his arms, chest and neck, and regressed after corticoid administration. On the next day, there was regression of the edema and ecchymosis in the affected region, laboratory examinations did not present any abnormalities and ultrasound was normal (Figure 1C). The patient was discharged without symptoms on the third day after admission, with just slight edema in his right hand. The animal that caused the bite was properly identified as the species *Philodryas olfersii* by Pinho, M.S.S, at the Venomous Animals and Toxins Laboratory (LAPTx/UFPE), and the specimen was deposited in the scientific collection at CEATOX, as n^o 70 (Figure 1D).



FIGURE 1 - A) Lesion after the snakebite in the present case. The arrow indicates the site of inoculation by the opistoglyph dentition, on the right hand. B) Patient's right hand presenting edema and ecchymosis after poisoning. C) Regression of symptoms after patient's serum therapy. D) *Philodryas olfersii* specimen captured.

DISCUSSION

The present study describes a case of poisoning caused by a snake of the genus *Philodryas*, which is distributed throughout South America and is responsible for most of the accidents caused by opistoglyph snakes^{1,7}.

Some behavioral characteristics probably contribute towards facilitating human contact with these snakes. *Philodryas* has active foraging behavior during the hottest periods of the day, and occasionally this snake visits the backyards and interiors of homes (mainly those next to native vegetation). Its behavior coincides

with people's activity period, thus enlarging the chances of contact between snake and man. The first reaction of the snake when encountering man is to escape, but when threatened, it can attack through bites, thereby inoculating humans with its venom².

Some human accidents caused by this genus have been described^{5,7-9}. Although most of the reports indicate that the poisoning caused by opistoglyph snakes is mild, Salomão and Di Bernardo reported one occurrence of death.

Because of the similarity of pathophysiological background, poisoning caused by *Philodryas* can be identified as or confused with poisoning caused by the bothropic group³⁻⁵. In some cases, antiothropic serum has been administered⁵. The venom of

Philodryas olfersii consists of enzymes that are commonly found in bothropic venom, which are responsible for edematogenic, hyperalgesic and hemorrhagic activities, thereby promoting erythema, ecchymosis and regional lymphadenopathy, with normal coagulation^{4,5}. With greater clinical implications, there could be evolution to compartmental syndrome⁸. These observations explain the presence of pain, heat, erythema and significant edema in this report.

This report shows that intervention policies for snakebite treatment and updated predictions are not clear in relation to all venomous snakes¹⁰. Snakebite treatment centers need to be able to identify, describe, characterize and publicize cases caused by opisthophthalm snakes, thereby clarifying their clinical and epidemiological importance. Lastly, intervention policies need to make it possible to include and recognize these kinds of snakebite occurrences within clinical and toxicological practice.

Concluding, the clinical picture of this case resulting from poisoning by *Philodryas olfersii* regressed successfully following antiotherapeutic serum therapy. The allergenic reaction provoked by intrusive proteins that was observed during serum administration may suggest that there is a need for specific serum therapy in order to diminish the incidence of this reaction in specific treatments. In other words, research on clinical treatments for cases of poisoning due to *Philodryas* venom, in animal models with the specific polyvalent antivenin currently used in Brazil could clarify the question of a possible need for *Philodryas*-specific serum. Again, it should be noted that failure to neutralize toxins, because of the antiotherapeutic serum treatment that is administered in some cases, could compromise the affected region and organs or cause death.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr. Américo Ernesto, Dr^a Cleide Ribeiro and all the nursing team at CEATOX-PE, and to the patient and his family.

REFERENCES

- Zaher H, Graziotin FG, Cadle JE, Murphy RW, Moura-Leite JC, Bonatto SL. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Pap Avulsos Zool* 2009; 11:115-153.
- Cardoso JL, Siqueira-França FOS, Wen FH, Sant'ana-Málaque CM, Haddad JRV. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003.
- Mackessy SP. Biochemistry and pharmacology of Colubrid snake venoms. *J Toxicol-Toxin Rev* 2002; 21:43-83.
- Teixeira da Rocha MM, Furtado MFD. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). *Rev Bras Zool* 2007; 24:410-418.
- Ribeiro LA, Puerto G, Jorge MT. Bites by colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. *Toxicon* 1999; 37:943-948.
- Santana-Neto PL, Porto Amorim ML, E Júnior A, Baptista GH, Correia JM. Epidemiologic aspects of snakebites attended at Hospital da Restauração in Pernambuco during 2000-2007. *In: Resumos do XLV Congresso Brasileiro de Medicina Tropical*. Recife; 2009. p. 85.
- Prado-Franceschi J, Hyslop S. South American colubrid envenomations. *J Toxicol-Toxin Rev* 2002; 21:117-158.
- Oliveira DAJ, Marinho Segundo LMB, Lucena STM, Amorim AG, Cunha TB, De Lucena KDT. Acidente ofídico por *Philodryas olfersii*: Relato de caso clínico. *In: V Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios-Rio*. 2007; 10:252.
- Salomão EL, Di-Bernardo M. *Philodryas olfersii*: uma cobra comum que mata, caso registrado na área da 8ª Delegacia Regional de Saúde. *Arq Soc Zool do Brasil* 1995; 14-16: 21.
- Fundação Nacional da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Ministério da Saúde, Brasília; 2001.