

ESTUDOS *IN VIVO* DA FISIOPATOLOGIA DO ENVENENAMENTO POR SERPENTES: CONJUNTO DE ENSAIOS EXPERIMENTAIS PARA COMPREENDER OS MECANISMOS DE TOXICIDADE DE VENENOS

Evaldo Joaquim de Farias Filho¹; Joeliton dos Santos Cavalcante²; Maurício Reis de Araújo³; Cayo Antônio Soares de Almeida⁴

¹Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

E-mail: farias_evaldo@hotmail.com

²Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

E-mail: joeliton.biologia@gmail.com

³Graduando em Farmácia, Faculdade Maurício de Nassau (UNINASSAU).

E-mail: mauricioreis127@gmail.com

⁴Biólogo e coordenador dos Biotérios UFABC, Laboratório de Neurogenética, Universidade Federal do ABC (UFABC).

E-mail: cayo.almeida@butantan.gov.br

Resumo: Os venenos e toxinas ofídicas são substâncias advindas de organismos adaptados que podem causar disfunções a vários níveis em outros organismos. A toxilogia é uma disciplina que representa grande relevância no cenário científico atual, uma vez que confere uma gama de investigações salientes de grande relevância para saúde pública, contribuindo para melhoria do diagnóstico clínico e terapêutica de vítimas de acidentados ofídicos. A descrição dos mecanismos de ação de venenos são melhor compreendidas a partir da investigação destas toxinas em modelos *in vivo*, entretanto os experimentos em animais devem ser realizados com métodos humanitários, com responsabilidade no trato animal em vários aspectos. Tendo em vista a natureza bioquímica e toxicológica que implica no sucesso dos testes *in vitro* que são considerados muitas vezes inviáveis para a Toxinologia, os estudos em animais é indispensável. Dessa forma, o presente estudo objetivou explorar os modelos de conhecimento atuais utilizáveis na experimento animal aplicados a Toxinologia, reunindo um conjunto de testes para avaliação das atividades de venenos ofídicos. As atividades hemorrágicas, miotóxicas, dermonecróticas e desfibrinogênicas de venenos são as mais investigadas, porém existe outros mecanismos e atividades que podem ser investigados, são elas: trombocitopenia, alterações cardiovasculares e lesões renais.

Palavras-chave: Biologia experimental, humanização, modelos *in vivo*, Toxinologia.

INTRODUÇÃO

A síntese de substâncias tóxicas realizado por animais, plantas e microorganismos tem fascinado a humanidade, seja por razões práticas, maliciosas ou por curiosidade. Animais venenosos apresentam uma ampla propagação em todo o reino animal, difundidas entre os principais filos. Em qualquer habitat, há uma intensa competição intra e interespecífica por recursos e em todos os ecossistemas existem organismos considerados venenosos. A produção de substâncias tóxicas realizada por inúmeras espécies consistem em uma das técnicas mais fascinantes de predação ou defesa (JACKSON et al, 2017).

Há muito tempo que estudos da faunística ofídica, bem como classificação, hábitos e atividades têm despertado grande interesse, seja pelo

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

rastejar ondulante, inesperados e as suas toxinas, por muitas vezes fatais, as serpentes causam temor e horror não raro mórbido por parte dos seres humanos (BÔTO, 2016).

A intensificação do estudo de venenos tornou a Toxinologia uma disciplina formalizada, devido à grande necessidade de investigações descritivas dos venenos e toxinas, uma vez que há venenos de várias espécies que são ainda inteiramente ou parcialmente desconhecidos. Porém, a Toxinologia evoluiu para além do trabalho descritivo, passando a incluir aspectos de praticamente todas as áreas da ciência, com o objetivo de elucidar os mecanismos pelos quais ocorrem os processos fisiopatológicos decorrente da ação das toxinas animais (FOX; SERRANO, 2009; MACKESSY, 2016).

A Toxinologia ofídica atualmente tem direcionado seu foco em determinar os mecanismos de ação das toxinas, encontrar formas para neutralizar a toxicidade e os efeitos adversos do envenenamento. Em adição, possibilita o desenvolvimento de ferramentas de investigação específicas úteis para a compreensão dos processos fisiológicos normais a nível celular e molecular, além do desenvolvimento de modelos de novos fármacos (BÔTO, 2016).

Entretanto, como os venenos ofídicos constituem uma mistura complexa de diversos componentes como proteínas, peptídeos e aminoácidos, estes atuam de maneira isolada ou sinérgica, induzem, em caso de acidentes ofídicos ou em modelos experimentais, a uma série de alterações fisiopatológicas que vão desde alterações locais, até efeitos sistêmicos complexos como alterações nos sistemas hemostático, ocasionando incoagulabilidade sanguínea, e distúrbios hemorrágicos (MACKESSY, 2016), sendo de extrema necessidade a adoção de modelos experimentais *in vivo* para tais investigações.

Esta revisão tem como objetivo explorar e reunir o conhecimento atual disponível sobre métodos experimentais utilizados na experimentação animal aplicada a Toxinologia, devido a necessidade de ter-se uma ampla compreensão de métodos que possam ser aplicáveis a essa área, podendo servir de subsidio para delineamento de futuros projetos com experimentação.

METODOLOGIA

O estado da arte apresentado foi realizado durante o período de 18 de abril a 19 de maio de 2018, em sites de periódicos que publicam estudos experimentais na área de toxinologia (Toxicon, Toxins e Plos One). Após verificar as metodologias experimentais *in vivo* utilizadas em comum por 30 artigos diferentes

(não referenciados), procedeu-se a busca dos artigos originais que descrevem as metodologias na plataforma PUBMED.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso dos animais na experimentação obedece a critérios que devem priorizar o bem-estar animal, havendo a adoção de métodos humanitários, existindo responsabilidade no trato animal em todos os aspectos do seu bem-estar: alojamento, nutrição, saúde, assistência médica veterinária, e por fim, eutanásia (LIMA, 2008).

Adicionalmente, a incorporação dos "3Rs" (*reduction, replacement, refinement*), é de grande relevância numa prática experimental que leve à *redução* do número de animais, sua *substituição* (quando possível ou pertinente) e ao *refinamento* das técnicas usadas. Tendo isto em mente, é razoável inferir que a associação do *saber científico* com a implementação dos métodos humanitários levará a conclusões relativamente consensuais, finalizando ou minimizando o desgaste imposto pelo dilema da polarização (GUTIÉRREZ, 2017).

A busca por testes *in vitro* que substituam ensaios *in vivo*, como letalidade e determinação de atividades hemorrágicas, miotóxicas, dermonecroticas e desfibrinogênicas, tem sido difícil devido à natureza bioquímica e toxicológica complexa dos venenos de serpentes, sendo a toxicidade frequentemente determinada por várias toxinas agindo juntas em formas sinérgicas e aditivas causando desconforto e dor as cobaias (GUTIÉRREZ et al., 2017).

Uma consideração importante é o uso de analgesia, principalmente em ensaios toxicológicos com venenos que induzem dor severa associada a danos teciduais quanto estes não consistem no objeto de estudo. O uso profilático dos analgésicos morfina ou tramadol não resultam em alterações nos resultados da investigação de atividades letais, hemorrágicas, miotóxicas, edematogênica e desfibrinogênica (CHÁCON et al., 2015; GUTIÉRREZ; HERRERA, 2014).

Entretanto, há uma necessidade em realizar a validação do método para o uso desses e de outros analgésicos contra diferentes venenos, tanto em termos de seu potencial analgésico, quanto avaliar se eles não afetam os resultados dos testes de toxicidade.

Conjunto de testes para avaliação de atividades de venenos

Atividade edematogênica: Uma característica marcante de alguns envenenamento consiste na formação de edema no local da mordida. Este efeito pode ser reproduzido em laboratório através da injeção de várias doses de veneno por via subcutânea na pata de camundongos ou ratos. Em seguida, em vários intervalos de tempo, o aumento no volume do coxim plantar pressão é aferido. A Mínima Dose Edematogênica (MDE) corresponde à concentração de veneno responsável por induzir um aumento de 30% no volume da pata ou na espessura 1 hora após a injeção (GUTIÉRREZ et al., 1985).

Atividade necrozante: A investigação da dermonecrose é investigada através de uma injeção intradérmica, na região abdominal, de soluções contendo doses com varias concentrações de veneno. Decorrido 72 horas após a injeção, os animais são submetidos à eutanásia, a pele é removida e o tamanho da lesão necrótica é medido. A Dose Mínima Necrosante (DMN) corresponde à dose de veneno que induz uma lesão necrótica de 5 mm de diâmetro (THEAKSTON; REID, 1983).

Atividade coagulante *in vitro*: A atividade procoagulante de venenos investigada *in vitro* geralmente utiliza como modelo experimental plasma citratado ou soluções de fibrinogênio bovino. Utilizando o plasma para realização do ensaio, é possível detectar a presença de toxinas pró-coagulantes, como enzimas semelhantes à trombina e ativadores dos fatores X e protrombina. Ao usar soluções de fibrinogênio, o ensaio detecta apenas enzimas semelhantes à trombina. Trata-se de um ensaio simples que pode ser realizado manualmente ou automatizado, sendo este último realizado em um coagulômetro. Para investigar a atividade coagulante, doses de veneno em diferentes concentrações são adicionadas ao plasma ou ao fibrinogênio, previamente incubados a 37 ° C e o tempo em que ocorre a formação da rede de fibrina (coágulo) é registrado. A atividade é expressa como a Dose Mínima Coagulante - Plasma (DMC-P), ou a Dose Mínima de Coagulante - Fibrinogênio (DMC-F), que corresponde à dose com menor concentração de veneno necessária para coagulação do plasma ou fibrinogênio, em 60 segundos (GENÉ et al., 1989).

Atividade desfibrinogenante: Em geral, venenos de serpentes que induzem a coagulação *in vitro* do plasma são capazes de causar desfibrinogenação *in vivo*.

O quadro de incoagulabilidade sanguínea devido a desfibrinogenação do sangue deve-se ao fato do homem não ser o principal alvo das serpentes, animais de pequeno porte que ao ser envenenados ocorre uma coagulação sanguínea

massiva em segundos, resultando conseqüentemente na obstrução circulatória, seguida de morte rápida. Em seres humanos, devido ao maior volume sanguíneo, a quantidade de veneno inoculada em um acidente ofídico não é suficiente para desencadear os mesmos efeitos que são de esperar, por exemplo, em um rato (ROJNUCKARIN, 2010; VALENTA, 2010).

Esta atividade é avaliada através de uma injeção intravenosa contendo diferentes concentrações de um veneno em camundongos. Após 1 hora é realizado uma punção cardíaca ou coleta pelo plexo venoso orbital, sob anestesia. O sangue obtido é acondicionado em tubos e incubados sob temperatura ambiente e em repouso durante 1 hora. Após o tempo de repouso os tubos são inclinados delicadamente e são observados a presença ou não de um coágulo. A atividade é expressa como Dose Mínima Desfibrinogénica (DMD), que consiste na menor dose de veneno capaz de tornar o sangue incoagulável na triplicata de camundongos (GENÉ et al., 1989).

Atividade hemorrágica: A avaliação da atividade hemorrágica induzida por venenos de serpentes é de grande relevância para a maioria dos estudos que envolvam venenos viperídeos. A atividade hemorrágica, ou Dose Mínima Hemorrágica (DMH) é determinada através da administração da injeção intradérmica contendo diferentes concentrações de veneno de uma determinada espécie na região abdominal ou dorsal dos animais. Geralmente, são utilizados como modelos experimentais para esse ensaio camundongos, que após um período de tempo dado em horas, geralmente 2 h, ocorre a eutanásia dos animais e em seqüência a remoção da pele. O tamanho da lesão hemorrágica no lado interno da amostra de pele é medido, e a atividade hemorrágica é expressa como a dose de veneno que induz uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro (GUTIÉRREZ et al., 1985).

Atividade miotóxica: A miotoxicidade causada por veneno é investigada experimentalmente através de análises histológicas do tecido muscular afetado e quantificação de enzimas liberadas na corrente sanguínea quando ocorre dano muscular. O ensaio amplamente utilizado consiste na quantificação da atividade plasmática da enzima creatina quinase (CK), que é liberada das fibras musculares danificadas na circulação. Várias doses de veneno em diferentes concentrações são injetadas via intramuscular (im) no musculo gastrocnêmio ou músculos da coxa de camundongos. |Após 3 horas , uma amostra de sangue é coletada e a atividade da CK presente no plasma ou soro é determinada. Os resultados são expressos como a Dose Mínima Miotóxica (DMM), que corresponde à concentração de veneno capaz de deflagrar um aumento correspondente a quatro vezes a atividade da CK, em

comparação com os ratos injetados com solução salina (GUTIÉRREZ et al., 2005).

Ensaio de migração celular: Para este experimento, camundongos recebem uma injeção por via intraperitoneal (i.p.) com solução de veneno. Passado 4 horas após a injeção, os camundongos são submetidos à eutanásia e a cavidade peritoneal é lavada com PBS contendo Heparina sódica e o exsudato coletado para a realização da contagem total e diferencial das células. A contagem total e diferencial é feita em câmara de Neubauer após diluição do exsudato em solução de Turk (DACIE; LEWIS, 1991) modificada substituindo - se o corante violeta de genciana pelo violeta de metila. As células são classificadas como polimorfonucleadas ou monucleadas, conforme critérios morfológicos convencionais.

Modelo experimental de agregação plaquetária: Neste ensaio geralmente são utilizadas suspensões de plaquetas lavadas de coelhos obtidas por centrifugação e lavagem (MUSTARD et al., 1989). A avaliação da agregação plaquetária induzida pelo veneno é realizada utilizando o método de Born (1962). Para isso, doses com diferentes concentrações de veneno são adicionados a plaquetas lavadas em agregômetro sob agitação constante e a 37°C, durante 15 minutos. Como parâmetro de comparação, é realizada agregação plaquetária por colágeno.

Além dos ensaios descritos acima, outros experimentos para efeitos toxicológicos de relevância podem ser utilizados. Gutiérrez e colaboradores (2017) destacam:

(a) Alterações cardiovasculares: Alguns modelos experimentais monitoraram os efeitos dos venenos sob a pressão arterial média após a injeção i.v. de venenos. Os incrementos na concentração de ácido láctico no sangue podem ser usados para monitorar o incremento no metabolismo anaeróbico como consequência da redução do fluxo sanguíneo e da isquemia nos tecidos.

(b) Trombocitopenia: Alterações na contagem e função plaquetária. A trombocitopenia pode ser investigada a partir de injeções de várias doses de veneno iv, e após 1 hora é realizada a contagem de plaquetas no sangue. O resultado é expresso como Dose Trombocitopênica₅₀, que corresponde à quantidade de veneno que cause a redução do número de plaquetas circulantes no sangue em 50%.

(c) Lesões renais agudas induzidas por venenos de serpentes, através da avaliação histológica do dano renal, alterações nos parâmetros funcionais do sistema de perfusão renal, e quantificação da concentração de metabólitos no soro, como a creatinina, que são elevados na lesão renal.

CONCLUSÕES

Devido à complexidade bioquímica, toxicológica e imunológica dos venenos de serpentes e seus padrões altamente diversos de variabilidade regional e ontogenética, os modelos experimentais para investigações são baseadas em um conjunto de técnicas *in vivo*. Entretanto, para o uso de modelos *in vivo*, há uma necessidade de humanização por parte dos pesquisadores envolvidos, de forma que sempre adotem a anestesia e incorporem os "3Rs".

REFERÊNCIAS

BORN, G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**, v. 4832, p. 927-929, 1962.

BÔTO, J. R. F. Isolamento e caracterização biológica e bioquímica de um ativador do factor x da coagulação presente no veneno da serpente *Bothrops erythromelas*. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; PEREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A.M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; CHALKIDIS, H.M.; MOURAO, R.H.; FURTADO, M.F.; MOURA-da-SILVA, A.M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Pedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 11, p. 510-527, 2011.

CHACÓN, F.; OVIEDO, A.; ESCALANTE, T.; SOLANO, G.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate in vitro assay. **Toxicon**, v. 93, p. 41-50, 2015.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 7 ed. United States: Churchill Livingstone, 1991.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SMVP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEEBS J**, v.275, n 12, p. 3016-30, 2008.

GENE, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 841-848, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENE, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J. M.; HERRERA, C. The analgesics morphine and tramadol do not alter the acute toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 81, p. 54-57, 2014.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, E.; QUESADA, L.; LEÓN, G.; NÚÑEZ, J.; LAING, G.D.; SASA, M. J.; RENJIFO, NASIDI, A.; WARRELL, D. A. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: an alternative to the antivenom crisis in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 468-475, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; VILLALTA, M.; SÁNCHEZ, A.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; CALVETE, J. J. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. **Toxins**, v. 9, n. 5, p. 163, 2017.

LIMA, W. T. Entendimento humano da experimentação animal. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 26-27, 2008.

JACKSON, T. N.; KOLUDAROV, I.; ALI, S. A.; DOBSON, J.; ZDENEK, C. N.; DASHEVSKY, D.; CIPRIANI, V. Rapid radiations and the race to redundancy: An investigation of the evolution of Australian elapid snake venoms. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 309, 2016.

MACKESSY, S. P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. CRC press, 2016.

MUSTARD, J. F.; KINLOUGH-RATHBONE, R. L.; PACKHAM, M. A. Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing. *In*: HAWIGER, J. (Ed). **Methods Enzymol.** v.169. Academic Press, 1989.

ROJNUCKARIN, P. **Snakebite Induced Coagulopathy and Bleeding Disorders**. In R. M. KINI, K. J. CLEMETSON, F. S. Markland, M. A. MCLANE; T. MORITA (Eds.), *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside* (pp. 699-710). Springer Science & Business Media. 2010.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the world health organization**, v. 61, n. 6, p. 949, 1983.

VALENTA, J. **Snakebite: Therapy and Prevention**. In J. VALENTA (Ed.), *Venomous Snakes: Envenoming, Therapy* (2 ed., pp. 59-84). New York: Nova Science Publishers. 2010.