

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA INTOXICAÇÃO
EXPERIMENTAL COM VENENO DE *Crotalus durissus*
terrificus E *Bothropoides jararaca* EM RATOS WISTAR
TRATADOS COM SOROTERAPIA E *Mikania glomerata*.

YUDNEY PEREIRA DA MOTTA

Botucatu - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA INTOXICAÇÃO
EXPERIMENTAL COM VENENO DE *Crotalus durissus*
terrificus E *Bothropoides jararaca* EM RATOS WISTAR
TRATADOS COM SOROTERAPIA E *Mikania glomerata*.

YUDNEY PEREIRA DA MOTTA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título
de Doutor.

Orientadora: Prof^a Adj. Michiko Sakate

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Motta, Yudney Pereira da.

Quantificação de citocinas na intoxicação experimental com veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothropoides jararaca* em ratos Wistar tratados com soroterapia e *Mikania glomerata* / Yudney Pereira da Motta. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Michiko Sakate

Capes: 50501089

1. Toxicologia veterinária – Estudos experimentais. 2. Serpente peçonhenta.
3. Jararaca (Cobra) – Veneno. 4. Plantas medicinais.

Palavras-chave: *Bothropoides jararaca*; Citocina; *Crotalus durissus terrificus*; Intoxicação experimental; *Mikania glomerata*; Ratos Wistar.

Nome do Autor: Yudney Pereira da Motta

Título: QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL COM VENENO DE *Crotalus durissus terrificus* E *Bothropoides jararaca* EM RATOS WISTAR TRATADOS COM SOROTERAPIA E *Mikania glomerata*.

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Adjunta Michiko Sakate
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Professora Adjunta Regina Kiomi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Professora Assistente Doutora Maria Lucia Gomes Lourenço
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Professora Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IBB – UNESP – Botucatu

Professora Doutora Rosa Maria Barilli Nogueira
Membro
Departamento de Clínica Medica Veterinária
FCA – UNOESTE – Presidente Prudente

Data da Defesa: 25 de Novembro de 2011.



Dedico este trabalho a minha mãe Maria Neide Franzini da Motta, minha melhor amiga e a meu pai Deraldo Pereira da Motta.

*Aquele que duvida e não investiga
torna-se não só infeliz, mas também
injusto.*

Blaise Pascal (1623 – 1662)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado saúde, coragem e por ter colocado pessoas maravilhosas, na minha vida, que me ajudaram a seguir o meu caminho e superar todas as dificuldades.

À Prof.^a Adj. Michiko Sakate pelo exemplo profissional, confiança, orientação e bom humor constante.

À prof.^a Dr.^a Rosa Maria Barilli Nogueira pela amizade, incentivo, confiança e atenção dispensada em todos os momentos da realização deste trabalho.

À prof.^a Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli pela ajuda e a disponibilidade para a realização deste trabalho.

A Izabel Cristina Castro (Cristininha) e Marlene Dias Camargo pela amizade, ensinamentos e experiências de vida trocadas nesses anos de pós-graduação.

À minha mãe pelo amor incondicional e incentivo em todos os dias da minha vida.

Ao meu pai que pelos puxões de orelha me fez um homem de caráter e me incentivou a chegar aqui.

Ao filho João Gabriel que com seu olhar me dá forças para continuar.

Aos meus irmãos (Yury Motta e Anna Amélia) que com seus exemplos de vida me ajudaram a ser mais forte e a superar as dificuldades.

Aos meus cunhados (Vivian Daniele e Cássio Oishi) pelo amor com que acolheram a minha família como sua.

Aos professores do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ-Botucatu, em especial a Dra. Maria Lucia e Dr. Luis Henrique pela amizade e ajuda durante a pós-graduação.

À Erika Nakaira e Renata pela ajuda na realização das dosagens e principalmente a Erika pela ajuda nas discussões dos resultados.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, em especial aos funcionários José Roberto de Lalla Júnior, Denise A. Fioravante Garcia, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel e Patrícia Luciane de Souza Ramos .

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para realização do projeto.

À Universidade do Oeste Paulista pela ajuda financeira para realização da presente pesquisa.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) de Botucatu, pela doação dos venenos das serpentes *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*.

Aos funcionários do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE pela ajuda na realização deste experimento.

Aos funcionários da Divisão de Biblioteca e Documentação da UNESP – Campus de Botucatu, em especial Meire, pela presteza no atendimento e pela orientação quanto às bibliografia e confecção da ficha catalográfica.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação da FMVZ-UNESP – Botucatu, pela solidariedade e atenção.

À CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro durante o meu doutorado.

Aos Amigos e colegas de trabalho da UNICENTRO-PR pela compreensão e ajuda durante a reta final, em especial ao Dr. Jayme Augusto Perez e Dr. Adriano Carrasco.

Aos amigos de Presidente Prudente, que me acompanharam em toda essa caminhada, em especial a Dani Marini, Fábio, Hugo, Maikon, André, Mariana, Matheus, Marlon, Luis Leite, Luciano, Carlos Henrique, Adriana e muitos outros que com certeza estão torcendo por mim.

À comunidade Maristela e em especial ao Padre Tuty e Astromar Miranda que me ajudaram a entender que a verdadeira força vem do alto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Valores médios e desvio padrão de TNF- α no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	38
Quadro 2	Valores médios e desvio padrão de TNF- α no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	38
Quadro 3	Valores médios e desvio padrão de interleucina 10 (IL-10) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	39
Quadro 4	Valores médios e desvio padrão de interleucina 10 (IL-10) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	39
Quadro 5	Valores médios e desvio padrão de interleucina 6 (IL-6) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	40
Quadro 6	Valores médios e desvio padrão de interleucina 6 (IL-6) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	40

Quadro 7	Valores médios e desvio padrão de interferon gama (IFN- γ) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	41
Quadro 8	Valores médios e desvio padrão de interferon gama (IFN- γ) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	42
Quadro 9	Valores médios e desvio padrão de interleucina 1 β (IL-1 β) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação	43
Quadro 10	Valores médios e desvio padrão de interleucina 1 β (IL-1 β) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação	43
Quadro 11	Valores médios e desvio padrão de TNF- α no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação	44
Quadro 12	Valores médios e desvio padrão de TNF- α no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação	45

Quadro 13	Valores médios e desvio padrão de IL-10 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	45
Quadro 14	Valores médios e desvio padrão de IL-10 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	46
Quadro 15	Valores médios e desvio padrão de IL-6 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	47
Quadro 16	Valores médios e desvio padrão de IL-6 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	47
Quadro 17	Valores médios e desvio padrão de IFN – γ no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	48
Quadro 18	Valores médios e desvio padrão de IFN – γ no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	49

Quadro 19	Valores médios e desvio padrão de IL-1 β no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	50
Quadro 20	Valores médios e desvio padrão de IL-1 β no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Acidentes ofídicos ocorridos no Brasil, 1987 a 2008	02
Figura 2	Serpente do gênero <i>Crotalus</i> , mostrando a presença de fosseta loreal, globo ocular pequeno e olhos em fenda. (Jofre Oliveira).....	09
Figura 3	Serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> , presença de guizo, característico nessa espécie. (Jofre Oliveira).....	09
Figura 4	Valores médios e desvio padrão de TNF- α na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação	52
Figura 5	Valores médios e desvio padrão de TNF- α na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	53
Figura 6	Valores médios e desvio padrão de IL-10 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	54
Figura 7	Valores médios e desvio padrão de IL-10 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	55
Figura 8	Valores médios e desvio padrão de IL- 6 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e <i>Mikania glomerata</i> (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.	56

- Figura 9** Valores médios e desvio padrão de IL-6 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação. **57**
- Figura 10** Valores médios e desvio padrão de IFN- γ na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno Crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação. **58**
- Figura 11** Valores médios e desvio padrão de IFN- γ na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação. **59**
- Figura 12** Valores médios e desvio padrão de IL-1 β na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação. **60**
- Figura 13** Valores médios e desvio padrão de IL-1 β na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação. **61**

SUMÁRIO

RESUMO	_____	Pág. Xx
ABSTRACT	_____	Pág. Xxi
1 – INTRODUÇÃO	_____	Pág. 2
2 – REVISÃO DE LITERATURA	_____	Pág. 7
2.1 – CARACTERÍSTICAS DAS SERPENTES	_____	Pág. 7
2.2 – ACIDENTES OFIDICO	_____	Pág.10
2.2.1 – ACIDENTE BOTRÓPICO	_____	Pág. 11
2.2.2 – ACIDENTE CROTÁLICO	_____	Pág. 16
2.3 – DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DOS ACIDENTES OFIDICOS	_____	Pág. 19
2.4 - CITOCINAS	_____	Pág. 23
2.5 – <i>Mikania glomerata</i> “GUACO”	_____	Pág. 26
3 – OBJETIVOS	_____	Pág. 29
4 – MATERIAL E MÉTODOS	_____	Pág. 31
4.1 – LOCAL	_____	Pág. 31
4.2 – ANIMAIS	_____	Pág. 31
4.2.1 – MANEJO DOS ANIMAIS	_____	Pág. 31
4.3 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	_____	Pág. 32
4.4 – INOCULAÇÃO DOS VENENOS CROÁLICO E BOTRÓPICO, SOROTERAPIAE TRATAMENTO COM EXTRATO DA PLANTA	_____	Pág. 33
4.5 HOMOGENATO PROVENIENTE DA MUSCULATURA DA PATA	_____	Pág. 34
4.6 – CULTIVO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS	_____	Pág. 34
4.7 – COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE PARA QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	_____	Pág.35
4.8 – DOSAGENS DE CITOCINAS	_____	Pág. 35
4.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	_____	Pág. 35

5 – RESULTADOS	Pág. 37
5.1 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO	Pág. 37
5.1.1 – FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA	Pág. 37
5.1.2 –INTERLEUCINA 10	Pág. 38
5.1.3 INTERLEUCINA 6	Pág. 39
5.1.4 INTERFERON GAMA	Pág. 41
5.1.5 INTERLEUCINA 1 β	Pág. 42
5.2 – DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS NO HOMOGENATO DA MUSCULATURA DA PATA	Pág. 44
5.2.1 – FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA	Pág. 44
5.2.2 –INTERLEUCINA 10	Pág. 45
5.2.3 INTERLEUCINA 6	Pág. 46
5.2.4 INTERFERON GAMA	Pág. 48
5.2.5 INTERLEUCINA 1 β	Pág. 49
5.3 – DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS NA CULTURA DE CELULAS ESPLÊNICAS	Pág. 51
5.3.1 – FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA	Pág. 51
5.3.2 –INTERLEUCINA 10	Pág. 53
5.3.3 INTERLEUCINA 6	Pág. 55
5.3.4 INTERFERON GAMA	Pág. 57
5.3.5 INTERLEUCINA 1 β	Pág. 59
6 - DISCUSSÃO	Pág. 63
6.0 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	Pág. 63
6.1 – QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO	Pág. 64
6.2 – QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO HOMOGENATO	Pág. 67
6.3 – QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA CULTURA DE CELULAS ESPLÊNICAS	Pág. 69
7 – CONCLUSÃO	Pág. 77
8 – ANEXO	Pág. 91
9 – TRABALHOS CIENTÍFICOS	Pág. 93

MOTTA, Y.P. Quantificação de citocinas na intoxicação experimental com veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothropoides jararaca* em ratos wistar tratados com soroterapia e *Mikania glomerata*. Botucatu, 2011. 150p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente projeto teve como objetivo quantificar os níveis de citocinas moduladoras da inflamação, entre estas TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10 e INF- γ e comparar o efeito do tratamento convencional com o efeito do tratamento complementado com extrato da planta *Mikania glomerata* na intoxicação experimental por *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*. Foram usados ratos *Wistar* divididos em 5 grupos: C – controle, VC - veneno crotálico + soro antifídico, VB – veneno botrópico + soro antiofídico, VCM - veneno crotálico + soro antiofídico + *Mikania glomerata* e VBM - veneno botrópico + soro antiofídico + *Mikania glomerata*. As citocinas foram quantificadas no soro, homogenato da pata e na cultura de células esplênicas, pelo teste de ELISA em três momentos (M1- 30 minutos, M2- seis horas e M3- 24 horas após a inoculação do veneno). O veneno botrópico mostrou um potencial para estimular as citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 β , TNF- α quando essas foram quantificadas no soro, no sobrenadante do homogenato da pata e nas culturas de células esplênicas. O tratamento com extrato da planta teve como principal efeito o retardo ou uma menor produção dessas citocinas. Os animais que receberam o veneno crotálico demonstraram principalmente um aumento ou diminuição de algumas citocinas como IL-10, IL-6 e IFN- γ quando quantificadas no soro, homogenato da pata e cultura de células esplênicas. O extrato da planta teve ação anti-inflamatória causando diminuição das citocinas inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias. Assim pode-se concluir que os acidentes ofídicos são capazes de causar liberação de citocinas provocando lesões teciduais e a planta mostrou-se eficiente para diminuição de algumas dessas citocinas.

Palavras-chave: *Mikania glomerata*, *Bothropoides jararaca*, *Crotalus durissus terrificus*, ratos *Wistar*, citocinas.

MOTTA, Y.P. Cytokine quantification in experimental intoxication using *Crotalus durissus terrificus* and *Bothropoides jararaca* venom in Wistar rats treated with serotherapy and *Mikania glomerata*. Botucatu, 2011. 150p. Thesis (Doctoral degree) – Veterinary Medicine and Animal Science School, Botucatu Campus, São Paulo State University.

ABSTRACT

This experiment aimed to quantify the pro-inflammatory cytokine levels, including TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 as well as the anti-inflammatory ones such as IL-10 and INF- γ . It was also our objective to compare the effect of the conventional treatment to the treatment complemented with *Mikania glomerata* plant in the experimental intoxication using *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venom. Wistar rats were randomly divided into 5 groups: C – control, VC – *Crotalus* venom + antivenom serum, VB – Bothrops venom + antivenom, VCM - *Crotalus* venom + antivenom + *Mikania glomerata* and VBM - Bothrops venom + antivenom + *Mikania glomerata*. Cytokines were quantified in the serum, paw homogenates, and spleen cell culture by ELISA test in three different moments (M1- 30 minutes, M2- 6 hours and M3- 24 hours after venom injection). Bothrops venom showed an ability to stimulate inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β , and TNF- α , when they were quantified in the serum, paw homogenate supernatant and spleen cell cultures. The plant extract, it was responsible for a delay or even a lowering in the cytokine production. The animals that received *Crotalus* venom displayed an increase or decrease of certain cytokines such as IL-10, IL-6 and INF- γ when they were quantified in the serum, paw homogenate and spleen cell cultures. The plant extract, in this case, had an anti-inflammatory effect diminishing the inflammatory cytokines and increasing the anti-inflammatory ones. Therefore, it can be said that snakebites are capable of triggering the release of cytokines that will lead to tissue damage and the plant proved to be efficient in diminishing some of those cytokines.

Keywords: *Mikania glomerata*, *Bothropoides jararaca*, *Crotalus durissus terrificus*, Wistar rats, cytokines.

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública em países tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam (PINHO & PEREIRA, 2001).

O número de notificações de ofidismo tem aumentado consideravelmente desde 2001, alcançando o maior índice em 2005 (Figura 1). Desde então vem apresentando decréscimo, com registro de 26.156 acidentes em 2008, correspondendo à incidência de 13,8 casos por 100.000 habitantes no Brasil, a menor desde 2005 (BRASIL, 2008).

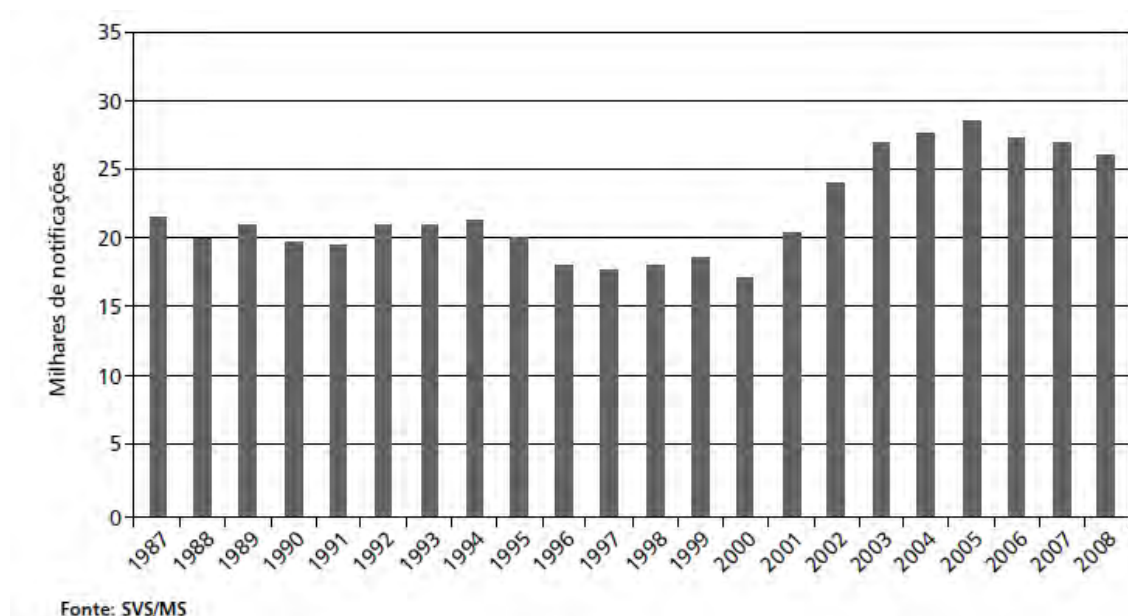


Figura 1. Acidentes ofídicos ocorridos no Brasil no período de 1987 a 2008.

Assim, dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas, verifica-se o predomínio do acidente botrópico, que corresponde a 87,5% dos casos ofídicos notificados no país, seguidos pelo crotálico 9,2%, laquético 2,7% e elapídico 0,6%, com pequenas variações de acordo com a região e distribuição geográficas das serpentes (BRASIL, 2005).

As serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus durissus* e *Lachesis* possuem dentes inoculadores de veneno bem desenvolvidos (solenóglifos) e fosseta loreal (órgão termorreceptor), caracterizando-as como peçonhentas. As serpentes do gênero *Micrurus* são uma exceção, pois, apesar de serem peçonhentas, não apresentam fosseta loreal e possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos (proteróglifos) (PINHO & PEREIRA, 2001 e BRASIL, 1998).

O gênero *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca, etc..) representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em todo território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis*). A espécie *Bothropoides jararaca* é predominante no Brasil, sendo encontrada no sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2005, WEN *et al.*, 2002, FENWICK *et al.*, 2009). O veneno botrópico possui ações coagulante, proteolítica e vasculotóxica (OLIVEIRA *et al.*, 2003). É uma mistura complexa de metaloproteinases (toxinas hemorrágicas - jararagina), fosfolipase A₂ (miotoxina), serino-proteases (enzimas tipo trombina) e peptídeos que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina (CLISSA, 2002).

A serpente *Crotalus durissus* é considerada de grande importância devido ao quadro clínico grave que provoca, na maioria das vezes fatal quando o tratamento específico não é instituído rapidamente (BARRAVIERA, 1990; BICUDO, 1994, NOGUEIRA E SAKATE, 2006). O veneno crotálico é considerado de maior toxicidade em relação ao gênero *Bothrops* (BELLUOMINI, 1984) e possui três ações principais: neurotóxica (VITAL BRAZIL, 1972; 1980), miotóxica (AZEVEDO MARQUES *et al.*, 1985) e coagulante (AMARAL *et al.*, 1988) além de uma ação hemolítica “in vitro” (ROSENFELD *et al.*, 1960-62). O veneno de *Crotalus* induz uma série complexa de eventos inflamatórios concomitantes, com considerável lesão tecidual (BONTA *et al.*, 1978, HIRANO *et al.*, 1990). Entretanto, os conhecimentos sobre a patogenia dessa resposta inflamatória ainda são limitados (SANGIORGIO *et al.*, 2008).

As citocinas possuem um papel de grande relevância na regulação de mecanismos inflamatórios e têm se mostrado como possíveis agentes endógenos pró-inflamatórios liberados em resposta aos acidentes ofídicos (LOMONTE et al., 1993; BARRAVIERA et al., 1995, PETRICEVICH et al., 2000).

A produção de citocinas tem sido descrita em modelos experimentais e em vítimas de acidentes botrópicos e crotálicos (LOMONTE et al., 1993; BARRAVIEIRA et al. 1995; BARROS et al. 1998 e PETRICEVICH et al.,2000). Porém, poucas evidências sobre o envolvimento direto das citocinas na inflamação ocasionada pela intoxicação crotálica estão disponíveis na literatura. Uma melhor compreensão da resposta inflamatória que ocorre nos acidentes ofídicos pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para auxiliar na recuperação desses pacientes (ÁVILA-AGÜERO et al., 2001a).

O tratamento preconizado para neutralizar a ação dos venenos botrópico e crotálico é por meio da soroterapia sendo o soro bivalente antibotrópico-crotálico o mais facilmente encontrado e utilizado em medicina veterinária. Mesmo sendo o tratamento recomendado, ainda apresenta algumas desvantagens, como: (1) limitado ou nenhum acesso ao soro antiofídico na zona rural de países em desenvolvimento onde a maioria dos acidentes acontece; (2) variações significantes na composição do veneno e reatividade antigênica devido a diversidades de serpentes, o que pode causar limitações durante a soroterapia; (3) reações adversas em pacientes devido à infusão de proteínas animais; e (4) efetividade limitada para proteger os efeitos deletérios no local da picada. Assim, a procura contínua e identificação de novas combinações que possam ser úteis como terapia alternativa ou terapias complementares para a intoxicação por veneno de serpente é uma tarefa pertinente (SOARES et al., 2005).

Em muitos países, extratos vegetais têm sido tradicionalmente utilizados no tratamento de acidentes ofídicos (MORS,1991). O extrato de plantas com propriedades antiofídicas é muitas vezes a única opção em comunidades sem acesso à soroterapia. A planta *Mikania glomerata* (guaco) tem se mostrado

eficaz na neutralização de muitos dos efeitos tóxicos dos venenos botrópico e crotálico (MAIORANO et al.,2005).

Os extratos vegetais constituem uma alternativa para tratamento de ofidismo, e exibem uma diversidade grande de combinações químicas com várias atividades farmacológicas de interesse médico-científico. Um número grande de extratos mostrou boas atividades antivenenos (SOARES et al., 2004).

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DAS SERPENTES

As serpentes fazem parte de um grupo de répteis que, segundo Bellairs e Underwood (1951), surgiram como formas aquáticas e em seguida emergiram para a terra. As serpentes são encontradas em quase todo o globo terrestre sendo mais frequentes nas regiões tropicais e sub-tropicais por serem pecilotérmicas (JIM & SAKATE, 1994).

As serpentes podem ser aquáticas ou terrestres, existindo ainda espécies anfíbias. Entre as terrestres, há aquelas que vivem sobre árvores (dendrícolas), as que habitam a superfície do solo e as de vida subterrânea. Das que vivem sobre o solo, ganham destaque as dos grupos crotálico, botrópico e laquélico. Deve se assinalar que as do grupo botrópico podem ser eventualmente encontradas em árvores. Os ofídios peçonhentos são mais encontrados nos campos ou em áreas cultivadas do que no interior de florestas, nas quais há escassez de pequenos roedores, especialmente ratos (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006).

De modo geral, pode-se dizer que as serpentes do grupo crotálico preferem locais mais secos e pedregosos, enquanto as do grupo botrópico ocorrem, com maior frequência, em áreas mais úmidas, como banhados, beiras de rios e lagoas. Em nosso meio, constata-se um fenômeno bastante interessante. Nas matas ou áreas não-devastadas pelo homem, encontram-se aproximadamente 80 % de serpentes não-peçonhentas e 20 % de peçonhentas. Nas áreas dedicadas às atividades agropecuárias, ocorre uma inversão devida à presença de roedores, e registram-se nesses locais, 80 % de serpentes peçonhentas e 20 % de não-peçonhentas. As serpentes do grupo elapídico preferem vida subterrânea (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006).

As serpentes do gênero *Crotalus* encontradas no Brasil, apresentam características que são observadas também em outras serpentes peçonhentas da família *Viperidae*, como crânio triangular, globo ocular pequeno, pupila na forma de fenda e um par de fosseta loreal (Figura 2) situado entre as narinas e os olhos. A referida fosseta funciona como detector térmico muito sensível, captando as vibrações do ar e por meio desse órgão, a serpente percebe a presença de sua presa (NOBLE & SCHMIDT, 1937). Possuem escamas na cabeça e dentição do tipo solenóglifo (JORGE & RIBEIRO, 1990; BARRAVIERA, 1994a). Possuem, na extremidade da cauda, guizo ou chocalho (Figura 3) característico em forma de gomos ou anéis que estão relacionados ao número de mudas de pele (BELLUOMINI, 1984).

As serpentes do gênero *Crotalus* (*C*) estão representadas, no Brasil, por uma única espécie, a *Crotalus durissus* (*C.d.*) e distribuídas em seis subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, *C. d. collilineatus* (Figura 2), *C. d. cascavella*, *C. d. ruruima*, *C. d. marajoensis* e *C. d. trigonicus* (SAKATE, 2002).

A *Crotalus durissus terrificus* é encontrada desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais sendo conhecida popularmente como cascavel, cascavel quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá e outras denominações populares (SAKATE, 2002).

As serpentes do gênero *Crotalus* encontram-se, de modo geral, em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas, encostas de morro, cerrados e raramente na faixa litorânea ou nas florestas úmidas (JORGE & RIBEIRO, 1992; JIM & SAKATE, 1994).

As serpentes antes conhecidas por *Bothrops jararaca* receberam uma nova nomenclatura e passaram a ser denominadas *Bothropoides jararaca* e estas serpentes estão distribuídas na região sul e sudeste do Brasil (BRASIL, 1998, WEN *et al.*, 2002, FENWICK *et al.*, 2009).



Figura 2. Serpente *Bothropoides*, mostrando a presença de fosseta loreal, globo ocular pequeno e olhos em fenda. (foto: Jofre Oliveira)



Figura 3. Serpente *Crotalus durissus terrificus*, presença de guizo, característico nesta espécie. (foto: Jofre Oliveira)

Identificar o animal causador do acidente ofídico é procedimento importante na medida em que possibilita a dispensa imediata da maioria dos pacientes picados por serpentes não peçonhentas, viabiliza o reconhecimento das espécies de importância médica a nível regional e auxilia na escolha mais precisa do antiveneno a ser administrado (BRASIL, 1998).

2.2 ACIDENTE OFÍDICO

Quanto à epidemiologia em humanos, os acidentes ofídicos apresentam, no Brasil, um perfil constante nos últimos 100 anos. Os acidentes ofídicos apresentam sazonalidade, com maior frequência no início e no final do ano. Há maior prevalência em pessoas do sexo masculino, trabalhadores rurais e na faixa etária produtiva de 15 a 45 anos. Os locais mais atingidos são os membros inferiores (BOCHNER & STRUCHINER 2003).

Entre os anos de 1988 a 1997, nos estados de São Paulo e Paraná, a incidência anual dos acidentes ofídicos variou de 4,32 a 10,57 casos por 100 mil habitantes, com queda ao longo do período, tanto dos acidentes botrópicos (88%) como dos crotálicos (11%). Os acidentes elapídicos foram raros (1%) em São Paulo e ausentes no Paraná. As áreas de maior risco para os acidentes foram coincidentes com as áreas de distribuição das serpentes, destacando-se, para os acidentes botrópicos, as regiões de Registro e Sorocaba em São Paulo e União da Vitória no sul do Paraná e, para os acidentes crotálicos, Bauru e Presidente Prudente em São Paulo, Cascavel e Ivaiporã no Paraná (WEN et al, 2002).

No Brasil, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, os acidentes ofídicos notificados ao Ministério da Saúde somaram 81.611 casos, o que representou uma média de 20.000 casos/ano. A maioria das notificações procedeu das regiões Sudeste e Sul. Das 81.611 notificações analisadas, 90,5% dos acidentes foram provocados por serpentes do gênero *Bothrops*, 7,7% do gênero *Crotalus*, 1,4% do gênero *Lachesis* e 0,4% do gênero

Micrurus. A análise sobre a letalidade mostrou que o maior índice desta recai sobre acidentes crotálicos. (BRASIL, 1998; 2005).

Na veterinária, encontram-se dados referentes à investigação e ao levantamento epidemiológico por parte de algumas Instituições brasileiras. Assim, em um estudo retrospectivo dos dados dos prontuários de atendimento no período de 1972 a 1989 junto ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu, computaram-se 149 acidentes ofídicos, sendo 128 causados por *Bothrops*, 11 por *Crotalus* e 10 sem identificação. Dentre os acidentes, 103 ocorreram em cães, 22 em equinos, 17 em bovinos, quatro em caprinos, dois em felinos e um em suíno (BICUDO, 1994).

Desde 1986, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a notificação dos acidentes ofídicos humanos, e com base nos índices observados desde então, a análise estatística revela que os acidentes crotálico estão em segundo lugar quanto ao número de acidentes ocorrido, mas em primeiro lugar com relação ao índice de letalidade (BRASIL 2005).

RIBEIRO & JORGE (1997) observaram que a porcentagem de óbitos nos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* tem um baixo índice (0,3%) no estado de São Paulo e em todo o Brasil (0,5%). Embora o óbito seja a consequência mais temida, a amputação ocorre com uma frequência duas vezes maior que a de óbitos, sendo um evento bastante indesejável.

2.2.1 Acidente Botrópico

Introdução

Dentre as serpentes que causam o acidente botrópico, as mais conhecidas são: *Bothropoides neuwiedi* encontrada em todo o território nacional, exceto na região norte do país; *Bothropoides jararaca* distribuída na região sul e sudeste; *Bothrops jararacussu*, encontrada no cerrado da região

central e em florestas tropicais do sudeste e *Rhinocerophis alternatus*, distribuída aos sul e sudeste do país (BRASIL, 2001, WEN *et al.*, 2002, FENWICK *et al.*, 2009).

O veneno botrópico possui ações coagulante, proteolítica e vasculotóxica (OLIVEIRA *et al.*, 2003). É uma mistura complexa de metaloproteinases (toxinas hemorrágicas - jararagina), fosfolipase A₂ (miotoxina), serino-proteases (enzimas tipo trombina) e peptídeos que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina (CLISSA, 2002).

Quadro clínico

Os sinais clínicos do acidente por serpentes peçonhentas, do gênero *Bothrops*, podem ser divididos conforme a ação do seu veneno. Sabendo que o veneno tem uma ação local importante e também uma ação sistêmica, os sinais clínicos são divididos em dois grupos: sinais clínicos locais ou focais e sistêmicos (TAKAHIRA, 1999; SANTORO *et al.*, 2008; MOTTA *et al.* 2007; MOTTA *et al.*, 2009).

a) Sinais clínicos locais

O veneno botrópico, após a inoculação, promove ação citotóxica local, liberando substâncias farmacologicamente ativas (bradicinina, serotonina), além de mediadores da resposta inflamatória, agindo posteriormente em músculos e rins, não alcançando, neste último órgão, concentrações maiores do que em músculos. Os efeitos clínicos causados pelo veneno incluem edema, eritema, petéquias, dor, pústulas, equimoses, bolhas, hemorragias e necrose local (CASTRO, 2006).

Dos três tipos de ações principais do veneno botrópico, a atividade “**proteolítica**” é de importância fundamental para a caracterização clínica do acidente. Causada por frações bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas que atuam de maneira complexa e interrelacionada, a chamada atividade proteolítica constitui-se em resposta inflamatória aguda,

responsável pelas alterações que ocorrem no local da picada e proximidade deste. A dor costuma ser imediata e de intensidade variável no local da inoculação do veneno, estendendo-se para todo o membro nas horas seguintes. O eritema e o edema locais, flogístico e endurecido, podem-se tornar regional e atingir a raiz do membro. Equimoses, bolhas e necrose podem aparecer em horas, dependendo da gravidade do envenenamento (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003, VIERA *et al.*, 2004; SPADACCI-MORENA *et al.* 2006).

As citocinas pró-inflamatórias possuem um papel fundamental na regulação da inflamação. Assim, conhecer o perfil das citocinas liberadas durante o envenenamento botrópico pode nos levar a uma modulação desta resposta no sentido de minimizar os efeitos locais causados pelo envenenamento. Esta modulação da resposta inflamatória poderia então ser utilizada visando o tratamento do envenenamento, uma vez que o soro antiofídico não se mostra totalmente eficiente na neutralização destes efeitos. Dados da literatura sobre a detecção de citocinas em soro de pacientes acidentados por *Bothrops* são bastante escassos, entretanto Barravieira *et al.* (1995), analisando oito pacientes acidentados, detectaram a presença de IL-6 em seis pacientes (com níveis variando de 7 a 116 pg/mL de soro) e de IL-8 em um único paciente (2088 pg/mL).

O soro foi avaliado também para a presença do TNF- α e IL-1 β , porém estas duas citocinas não foram encontradas. Barravieira *et al.* (1995) sugerem que as reações de fase aguda provocadas pelo aumento de IL-6 na corrente sanguínea de pacientes envenenados por *Bothrops* sejam responsáveis pela patogênese da síndrome da resposta inflamatória sistêmica observada nos envenenamentos.

O aumento de IL-6 sérico também foi observado em camundongos experimentalmente inoculados com o veneno total de *B. asper* ou com uma fosfolipase miotóxica isolada do mesmo veneno (LOMONTE *et al.*, 1993). Estes autores sugerem que linfócitos e macrófagos não sejam os responsáveis pela indução do aumento nos níveis séricos de IL-6 após o envenenamento de

camundongos com o veneno de *B. asper* e sim as células endoteliais, uma vez que o veneno possui efeitos drásticos na integridade dos vasos sanguíneos, sendo o dano causado nas células endoteliais e a mionecrose considerados como um estímulo para esta liberação. Os autores atribuíram este efeito à fosfolipase miotóxica deste veneno. Apesar da importância da IL-1 β e do TNF- α no processo inflamatório, não foi detectado qualquer aumento destas citocinas no soro de animais experimentalmente inoculados com o veneno de *B. asper* (LOMONTE *et al.* 1993) e pouco se sabe sobre a liberação local destes mediadores provocada pela ação dos venenos botrópicos.

b) Sinais clínicos sistêmicos

O evento hemorrágico ocorre pela ação direta do veneno botrópico sobre a parede dos vasos, causando desde um aumento na permeabilidade – pela destruição da membrana basal – até a sua ruptura provocando o sangramento. A hemorragia é dependente da quantidade de veneno inoculada, podendo ocorrer até mesmo distalmente do local da picada. As frações hemorrágicas foram identificadas e denominadas de hemorraginas (CASTRO, 2006). No que se refere à degradação enzimática da membrana basal, sabe-se que as toxinas hemorrágicas, em geral, representadas pelas metaloproteinases, possuem uma afinidade específica por proteínas presentes na matriz extracelular, como por exemplo, o colágeno tipo IV e a laminina, e os degradam. A destruição da membrana basal e da matriz extracelular provoca um conseqüente descolamento e lise das células endoteliais dos capilares, resultando na morte destas células e no extravasamento de plasma e de células sanguíneas para o tecido conectivo, caracterizado como hemorragia *per rhexis*. Sendo assim, pode apresentar hemorragias em diversas localidades como: gengivas (gengivorragias) hematúria, epistaxe, hematomas, hematêmese e hemorragias genitais (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

O veneno botrópico pode causar alterações funcionais renais, como diminuição da filtração glomerular, da diurese e do fluxo plasmático renal. A diminuição dos níveis de fibrinogênio e hematócrito e a presença de hemólise intravascular são bem marcantes. O aumento do lactato desidrogenase (LDH) plasmático e da hemoglobina livre também é observado, ficando evidenciada a

deposição massiva de fibrina nos capilares glomerulares e da hemólise intravascular como os fatores mais importantes na etiopatogenia da insuficiência renal aguda (IRA) por acidente botrópico (BURDMANN *et al.*, 1993). Além disso, a ação proteolítica e a atividade da fosfolipase A₂ do veneno botrópico podem ser responsáveis por muitos dos efeitos deletérios no epitélio renal. A atividade proteolítica do veneno pode ter importante efeito citotóxico em muitos tipos celulares, e pode contribuir diretamente ou indiretamente para a nefrotoxicidade do veneno (BOER-LIMA *et al.*, 1999)

As alterações hemostáticas encontradas no acidente botrópico estão relacionadas principalmente com as plaquetas e fatores de coagulação. As alterações de coagulação sanguínea ocorrem devido ao veneno botrópico possuir uma fração “tipo trombina”, capaz de converter o fibrinogênio diretamente em fibrina, levando o doente a uma afibrinogenemia. O consumo do fibrinogênio pode resultar em aumento no tempo de coagulação e incoagulabilidade sanguínea (MARKLAND, 1998) A hemólise intravascular é confirmada pela diminuição do hematócrito e um aumento de desidrogenase láctica e hemoglobina livre (BURDMANN *et al.*, 1993).

Os acidentes botrópicos podem provocar várias alterações laboratoriais, como resultado da ativação de fatores de coagulação e, classicamente, observam-se consumo desses fatores e fibrinólise secundária, que podem ser avaliados pelos testes de tempo de coagulação (TC), tempo de protrombina (TP), tempo de protrombina parcial ativado (TTPA), tempo de coagulação ativado (TCA) e aumento de produtos de degradação do fibrinogênio/fibrina (PDF) (TAKAHIRA, 1999).

Pode ser observado um leucograma de estresse, que é caracterizado pela leucocitose com neutrofilia, linfopenia e eosinopenia, em acidentes botrópicos. A ocorrência de trombocitopenia com hemorragias sistêmicas espontâneas depende particularmente do veneno envolvido, especialmente se as plaquetas são também inativadas, mas sabe-se que trombocitopenia em adição a tempo de coagulação prolongado pode provocar maior risco à

ocorrência de hemorragias. A aplicação do antiveneno restabelece prontamente o número de plaquetas em pacientes com hemorragias locais e sistêmicas (SANTORO *et al.*, 2008).

As citocinas pró-inflamatórias possuem um papel fundamental na regulação da inflamação. Assim, conhecer o perfil das citocinas liberadas durante o envenenamento botrópico pode nos levar a uma modulação desta resposta no sentido de minimizar os efeitos locais causados pelo envenenamento. Esta modulação da resposta inflamatória poderia então ser utilizada visando o tratamento do envenenamento, uma vez que o soro antiofídico não se mostra totalmente eficiente na neutralização destes efeitos (ÁVILA-AGÜERO *et al.*, 2001, CLISSA 2002).

2.2.2 Acidente Crotálico

Quadro Clínico

Os sinais clínicos do acidente crotálico são decorrentes da ação das principais frações do veneno crotálico, ou seja, neurotóxica, coagulante e hemolítica, miotóxica sistêmica e nefrotóxica (MAGALHÃES *et al.*, 1986; AZEVEDO MARQUES *et al.*, 1985).

Os efeitos provocados pelo veneno crotálico podem ser locais e sistêmicos, e no local da picada, podem ser observados discreto edema e dor, o que causa desconforto e inquietação no animal. Os efeitos sistêmicos são neurotóxicos, coagulantes, miotóxico, nefrotóxico e hepatotóxico (NISHIOKA *et al.*, 2000).

Efeitos neurotóxicos são caracterizados por transtornos de locomoção como ataxia e fasciculações; apatia, decúbito, seditação, flacidez da musculatura da face, ptose palpebral, ptose mandibular, midríase responsiva à luz, oftalmoplegia, disfagia, dificuldade de fonação além de sialorréia, vômitos e

diarréia. Paralisia respiratória pode ocorrer como complicação de quadros graves (BARRAVIERA & PERAÇOLI 1994; AZEVEDO MARQUES *et al.*, 1985).

O efeito miotóxico ocorre em consequência da rabdomiólise, destruição muscular generalizada que leva à liberação de mioglobina e mioglobinúria como resultado, e confere uma cor escura (cor de “coca-cola”) à urina (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Devido à ação miotóxica, pode ser encontrado aumento precoce de creatino-quinase (CK) quatro a oito horas após o acidente e aumento de aspartato aminotransferase (AST) e desidrogenase láctica (LDH) nas primeiras 24 horas (HUDELSON & HUDELSON, 1995).

Alterações renais ocorrem pela ação direta do veneno sobre os túbulos renais e em decorrência da mioglobinúria secundária à rabdomiólise e além disso, desidratação, hipotensão arterial, acidose metabólica e choque podem contribuir para a instalação da lesão renal. Após a instalação das alterações renais, oligúria e anúria com elevação dos níveis de uréia, creatinina, ácido úrico, fósforo e potássio séricos podem aparecer levando o paciente à morte por insuficiência renal aguda com necrose tubular (MAGALHÃES *et al.*, 1986).

As alterações hemostáticas estão relacionadas principalmente com redução do número de plaquetas, aumento no tempo de coagulação e incoagulabilidade sanguínea devido à fração do “*tipo trombina*”, capaz de converter o fibrinogênio diretamente em fibrina, e o doente apresenta uma diminuição do fibrinogênio ou afibrinogenemia (NOGUEIRA & SAKATE, 2006).

Os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada podem estar aumentados, e pode haver comprometimento de outros fatores da cascata de coagulação como os fatores I, II, V, VII e X, pois a tromboplastina tecidual, em presença de cálcio, é a ativadora que desencadeia o sistema extrínseco da coagulação e o fator XII ativa outros fatores do sistema intrínseco (VIII, IX e XI), bem como os que são comuns às duas vias. Mesmo com as alterações de

coagulação, não é observado quadro de sangramentos importantes (BARRAVIERA, 1990).

Alguns autores relatam incoagulabilidade sanguínea, em 100% dos animais estudados, seis horas após a intoxicação por veneno crotálico, com uma média de recuperação de seis horas após a soroterapia (NOGUEIRA & SAKATE, 2006).

No hemograma, é observada diminuição do número de eritrócitos, hemoglobina e volume globular, possivelmente pela ação hemolítica do veneno, e aumento no número de leucócitos e neutrófilos (COSTA *et al.*, 1989).

Observa-se uma resposta inflamatória aguda, provavelmente na tentativa de remover o agente agressor (veneno), no entanto, esta reação provoca também danos teciduais com a liberação de citocinas interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) além do interferon gama (IFN- γ) e IL-10. As citocinas IL-1 e TNF- α são consideradas “citocinas alarmes”, ou iniciadoras, e induzem células locais como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais a liberarem a segunda onda de citocinas que amplificam o sinal inflamatório (SANGIORGIO *et al.*, 2008).

Clinicamente, em resposta a esta fase aguda, podem ser observados taquicardia, taquipnéia, hipotermia ou hipertermia, leucocitose e distúrbios de coagulação (NOGUEIRA *et al.*, 2007a).

Alguns autores relatam hepatotoxicidade pelo aumento de alanino-aminotransferase (ALT) nas primeiras 24 a 48h após o acidente crotálico. Nos achados da hemogasometria, pode ser observado um quadro de acidose respiratória com aumento dos valores de pCO₂ e diminuição do pH sanguíneo ou acidose metabólica (NOGUEIRA *et al.*, 2007b).

Alterações no traçado eletrocardiográfico sugestivo de hipóxia do miocárdio ou arritmia sinusal podem ocorrer. No mielograma, a medula pode

apresentar-se com hipocelularidade seis a 12 horas após a intoxicação e pode ocorrer depressão da eritropoiese e granulopoieses intensificadas com aumento da relação mielóide:eritróide (M:E), que na análise conjunta com o sangue periférico determina um quadro inflamatório caracterizado, no hemograma, pelo aumento no número de leucócitos e neutrófilos segmentados. Um quadro de hipoplasia megacariocítica, seis horas após a intoxicação, em cães, foi relatado (NOGUEIRA *et al.* 2007b; SANGIORGIO, *et al.*, 2008a)

Barraviera *et al.* (1995) demonstraram o aumento de mucoproteínas, proteína C reativa, diminuição de proteínas séricas e albumina e aumento de IL-1, IL-6 e IL-8, principalmente em acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*.

2.3 Diagnóstico e tratamento dos acidentes ofídicos

O diagnóstico do ofidismo é baseado nos sinais clínicos apresentados pelo animal, exames laboratoriais e reconhecimento do gênero da serpente (CARDOSO *et al.*, 2003).

O único tratamento eficaz para neutralizar a ação do veneno botrópico ou do veneno crotálico é por meio da soroterapia polivalente, como o soro antiofídico antibotrópico-crotálico (SABC), soroterapia específica antibotrópica (SAB) ou soroterapia específica anticrotálico (SAC). Como o objetivo do tratamento é neutralizar a maior quantidade possível do veneno circulante, independentemente do peso do animal, o soro deve ser administrado o mais precocemente possível após o acidente, e pequenos e grandes animais devem receber a mesma dose desses. Na medicina veterinária, é mais facilmente encontrado e utilizado o soro polivalente (BRASIL, 2005).

O tratamento é baseado na quantidade de veneno inoculada no animal. No caso de veneno botrópico, a quantidade de veneno a ser neutralizada é de pelo menos 100 mg e no caso de veneno crotálico, a quantidade deve ser

suficiente para neutralizar pelo menos 50 mg do veneno. O soro antiofídico comercial é padronizado para que 1 mL do soro neutralize 2 mg do veneno botrópico e 1 mg do veneno crotálico, então a mínima quantidade de soro antiofídico a ser administrada no caso de acidente ofídico (crotálico e botrópico) é de 50 mL independente do tamanho do animal acidentado. A dose do soro antiofídico pode variar conforme a gravidade do acidente, de 5 a 15 ampolas, no acidente botrópico ou crotálico (BRASIL, 2005; FERREIRA JR & BARRAVIERA, 2004).

Atualmente, a via intravenosa é a recomendada para a administração do antiveneno, pois quanto mais rápida a absorção do soro, maior será a quantidade de veneno neutralizada. As vias subcutânea e intramuscular podem ser consideradas quando houver o impedimento do uso da via intravenosa. Se após 12 horas do tratamento inicial, o animal não demonstrar melhora do quadro (incoagulabilidade sanguínea), deve-se repetir a soroterapia com soro antiofídico, aplicando-se pelo menos a metade da dose inicial deste soro (SAKATE *et al.*, 2008).

As reações à soroterapia, de modo geral, podem ser classificadas em precoces (RP) e tardias (RT). As reações precoces, também denominadas de imediatas, geralmente ocorrem durante a infusão do antiveneno ou nas duas horas subsequentes, e são subdivididas em três tipos: anafiláticas, anafilactóides e pirogênicas. Os sinais e sintomas frequentemente observados são urticária, prurido, tremores, dispnéia, tosse e náuseas (BRASIL, 2005).

Fatores como dose do antiveneno usada, via de administração, velocidade de infusão, qualidade de purificação e sensibilização prévia com algum tipo de soro heterólogo podem favorecer o aparecimento de reações precoces (BRASIL, 2005).

As reações precoces (RP) à soroterapia podem ser prevenidas com a administração prévia de antagonistas H₁ e H₂ como a dextroclorfeniramina,

prometazina, cimetidina, ranitidina e corticosteróides como a hidrocortisona, 10 a 15 minutos antes da administração do soro (SAKATE *et al.*, 2008).

O tratamento das RP consiste na suspensão imediata e temporária da infusão do soro antiveneno e tratamento sintomático destas reações com adrenalina por via intravenosa (IV), hidrocortisona IV, difenidramina IV ou intramuscular (IM) e expansão da volemia por meio de fluidoterapia. Caso ocorra insuficiência respiratória, entubar o paciente, manter oxigenação adequada e usar drogas broncodilatadoras por via IV (CARDOSO *et al.*, 2003).

As reações tardias (RT), conhecidas como “doença do soro”, manifestam-se por exantema pruriginoso, febre, artralgia, linfadenomegalia, urticária, articulações edemaciadas, vermelhas e doloridas, ocorrendo geralmente entre cinco a 24 dias após o contato com o soro heterólogo em humanos, porém, não existem relatos sobre isso em cães (BARRAVIERA, 1994).

Além do tratamento específico com o antiveneno, outros procedimentos são de fundamental importância para o restabelecimento do paciente acometido por veneno ofídico. O tratamento geral no acidente botrópico inclui correções hidreletrolíticas (quadro de acidose), preservação da função renal e prevenção da instalação de insuficiência renal aguda, além da manutenção do acesso vascular (FERREIRA JR & BARRAVIERA, 2004).

O animal que sofreu o envenenamento deve ser observado, por no mínimo, 72 horas e mantê-lo em lugar silencioso e confortável. Pode ser induzida a diurese em caso de oligúria com o uso de manitol 20% (0,25 a 0,5 g/kg) e se necessário, o uso de diuréticos como a furosemida na dose de 2 a 4 mg/kg. O uso de antibióticos é recomendado, por veneno botrópico causar lesões extensas no local da picada, além de, pela picada da serpente, alguns microorganismos patogênicos, presentes no local, podem invadir a circulação (FERREIRA JR & BARRAVIERA, 2004). Além da soroterapia, é indicada a hidratação adequada, visando à estabilização da volemia, às correções da

desidratação e do quadro de acidose, à preservação da função renal e impedir a instalação de insuficiência renal aguda, além de manutenção do acesso vascular. A fluidoterapia pode ser realizada com o uso de ringer lactato ou solução de NaCl a 0,9%, associada ao bicarbonato (BARRAVIERA, 1994a; NOGUEIRA & SAKATE, 2006).

O uso de bicarbonato de sódio a 8,5%, diluído em solução de NaCl a 0,9%, na dose de 2 a 4 mEq/kg é indicado, via intravenosa em infusão contínua, para que o pH urinário seja mantido acima de 6,5, pois a urina ácida potencializa a precipitação intratubular de mioglobina. O bicarbonato também corrige o quadro de acidose e protege o estômago, do aparecimento de gastrite aguda (SANGIORGIO *et al.*, 2008).

Nos casos em que a expansão de volume não resultar em produção de urina, pode ser utilizada solução de manitol a 10 a 20%, podendo repetir a dose se for necessário. Caso persista a oligúria, indica-se o uso de diuréticos de alça como a furosemida por via intravenosa. A dopamina, ou a associação de dopamina em infusão contínua e furosemida em *bolus*, pode ser utilizada como última tentativa na reversão da oligúria (SAKATE *et al.*, 2008).

Devido ao quadro de anorexia, dificuldade de mastigação, paralisia dos músculos faciais e depressão muito grave no acidente crotálico, há a necessidade da realização da nutrição parenteral ou enteral com alimento líquido ou pastoso, até que o animal se recupere e volte a se alimentar normalmente, além do oferecimento constante de água em pequenas quantidades para evitar o ressecamento da mucosa oral. Devido à paralisia do globo ocular, a aplicação de colírio ou solução fisiológica na córnea ajuda a evitar o ressecamento e aparecimento de úlceras (SAKATE *et al.*, 2008).

Alguns outros tratamentos ainda estão em discussão como o uso de heparina, reposição de fatores de coagulação, plasmaférese e extratos vegetais como os da *Mikania glomerata* (MAIORANO *et al.*, 2005).

Outros procedimentos como o uso de torniquete, incisão no local, sucção e uso de produtos químicos são contra-indicados no acidente botrópico, pois podem agravar o quadro clínico do animal (FERREIRA JR & BARRAVIERA, 2004).

O prognóstico do acidente ofídico é altamente dependente da gravidade do envenenamento, local da picada e resposta individual do animal acidentado. A busca mais rápida pelo veterinário e a opção por tratamento precoce podem alcançar um melhor resultado (PETERSON, 2006).

Fatores como idade, peso, condições gerais do organismo, quantidade de veneno inoculada, número de picadas, local atingido, tempo decorrido do acidente até o atendimento e início do tratamento podem interferir na gravidade do acidente ofídico (SAKATE *et al.*, 2008).

No caso de acidente crotálico, o prognóstico pode ser favorável nos animais atendidos nas primeiras seis horas após a picada. Nos acidentes graves, o prognóstico está vinculado à existência ou não de insuficiência renal, sendo reservado quando há necrose tubular aguda (SAKATE *et al.*, 2008).

2.4 CITOCINAS

As citocinas são importantes na sinalização entre as células, à medida que a reação inflamatória se desenvolve. Nas etapas iniciais, citocinas como IL-1 e IL-6 podem ser liberadas das células do tecido em que está ocorrendo a reação inflamatória. Os linfócitos e as células mononucleares que chegam ao sítio da inflamação podem se tornar ativados pelo antígeno e, então, podem liberar suas próprias citocinas (IL-1, TNF, IL-10, INF- γ e outras), que aumentam ainda mais a migração celular pelas suas ações sobre o endotélio local (SARTIM, 2010).

As citocinas são polipeptídeos produzidos principalmente por linfócitos ativados e macrófagos, que modulam a função de outros tipos celulares. Estão

envolvidas nas respostas imunológicas, apoptose, hematopoiese e apresentam efeitos importantes na resposta inflamatória, sendo a IL-1, TNF- α , IL-6 e a IL-8 as principais mediadoras da inflamação. A liberação destas citocinas pode ser estimulada por endotoxinas, imunocomplexos, toxinas, trauma físico, dano tóxico direto nas células produtoras de citocinas, inibição de sua produção ou liberação, entre outros processos. Exercem seus efeitos de três diferentes maneiras: atuando sobre a própria célula que a produz (efeito autócrino), sobre células vizinhas (efeito parácrino), ou a nível sistêmico (efeito endócrino), sendo suas principais células alvo as células endoteliais, leucócitos e fibroblastos. A IL-1, TNF- α e IL-6 estimulam respostas sistêmicas de fase aguda associadas à infecção ou agressão, causando sinais clínicos como hipertermia e apatia, além de provocarem a liberação de neutrófilos, hormônio adrenocorticotrófico e corticosteróides para a circulação (HOUSE, 1999; CONTRAN, 2000, CAMPLESI, 2010).

A concentração sérica de citocinas é baixa ou indetectável em indivíduos saudáveis, sendo sua produção estimulada durante a invasão por microrganismos patogênicos ao hospedeiro ou em situações que comprometem a homeostase (NETEA *et. al.*, 2003). Como estes mediadores inflamatórios são liberados apenas na presença de um estímulo e por possuírem uma meia-vida curta, quando liberados, sua função se limita à atividade biológica que possuem, como, por exemplo, a comunicação entre as células. A síntese das citocinas é um evento autolimitado, portanto, elas não são estocadas permanentemente; quando ocorre o estímulo, as citocinas são sintetizadas e liberadas, sendo que após a resolução do processo ativador, a concentração sérica diminui a níveis baixos ou indetectáveis (ABBAS & LITCHTMAN, 2005).

A IL-1 e o TNF- α são considerados “citocinas alarmes”, ou iniciadoras, e induzem as células locais como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais a secretarem uma segunda sequência de citocinas que amplificam a reação inflamatória (BARRAVIEIRA, 1994b).

O TNF- α é um potente agente pró-inflamatório produzido primariamente por monócitos ativados e macrófagos. Entre outras atividades, o TNF- α pode induzir a diferenciação de macrófagos, degranulação de neutrófilos, liberação de leucotrienos e estimular a migração leucocitária para o local da lesão (VASSALI, 1992; ULLOA & TRACEY, 2005). Durante o processo inflamatório, o nível sérico de TNF- α eleva-se durante os primeiros 30 a 90 minutos após a exposição ao antígeno, com pico entre três e quatro horas (COHEN, 2002). Induz, ainda, a liberação de praticamente todos os mediadores da inflamação, como IL-1, IL-6, IL-8 e metabólitos do ácido araquidônico, além de estimular sua própria síntese e liberação a partir de macrófagos (MOURA-DA-SILVA, 1996). Existem duas formas de IL-1, a IL-1 α e a IL-1 β , com atividades biológicas bastante semelhantes, localizadas em genes distintos (DINARELLO, 1998). A IL-1 induz a liberação de histamina por mastócitos no foco inflamatório. A histamina, por sua vez, induz uma imediata vasodilatação e aumenta a permeabilidade vascular (FEGHALI & WRIGHT, 1997).

A IL-6 é produzida por uma variedade de células, incluindo fagócitos mononucleares, células T e fibroblastos (HIRANO, 1990). A IL-6, assim como a IL-1 e o TNF- α induzem a produção de proteínas da fase aguda pelo fígado. Estas proteínas fornecem um aumento na proteção contra microorganismos e modificam a resposta inflamatória por agirem sobre o tráfego celular e a liberação de mediadores (SUFFREDINI *et al.*, 1999). A IL-6 também apresenta um efeito regulatório, envolvendo a inibição da produção do TNF- α , agindo como um *feedback* negativo que limita a resposta inflamatória aguda (GADIENT & PATTERSON, 1999).

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, produzida por macrófagos e monócitos e capaz de diminuir a produção de IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 por meio da degradação de RNAm (OSWALD *et al.*, 1992; BOGDAN *et al.*, 1992; OBERHOLZER *et al.*, 2002). Atua por meio de retroalimentação negativa, ou seja, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

2.5 *Mikania glomerata* (“GUACO”)

Mikania glomerata é conhecida vulgarmente como coração-de-jesus, guaco-cheiroso, cipó-caatinga e erva-de-cobra e *Mikania laevigata* como guaco-de-casa e guaco-do-mato (OLIVEIRA Et al., 1984). Estas espécies são utilizadas popularmente por suas propriedades antiespasmódica, excitantes, sudoríferas, antisifilíticas, antiasmáticas, anti-inflamatórias, tônica, depurativa, antipirética, antiofídicas, picadas de escorpião, artrite, reumatismo e nevralgias, expectorante, balsâmico, eczema pruriginoso, estimulante do apetite, no tratamento da gripe e doenças respiratórias em geral, além de ser indicadas para inflamações da garganta, utilizando-se as folhas cozidas para gargarejo (NEVES & SÁ, 1991; MAIORANO et al., 2005).

Ainda como uso etnofarmacológico, estudos clínicos observacionais demonstraram que *M. glomerata* possui atividade antimalárica (BOTSARIS, 2007).

Diversos autores atribuem o efeito farmacológico do guaco à cumarina (VENEZIANI et al., 1999), sendo estas descritas com diversas atividades terapêuticas importantes, tais como, anti-inflamatória, imunossupressora, hipolipidêmico, relaxante vascular, anticoagulante, hipotensora, espasmolítica, antioxidante, antiofídica, inibição da replicação do vírus HIV-1, entre outros (HOULT & PAYÁ, 1996).

Maiorano et al. (2005) observaram a capacidade do extrato aquoso de *Mikania glomerata* em inibir as atividades farmacológicas e enzimáticas dos venenos crotálico e botrópico in vitro. A atividade da fosfolipase A2 (PLA2) induzida pelo veneno crotálico foi inibida completamente, já no veneno botrópico essa inibição não foi observada. O extrato mostrou-se efetivo, também, para a redução na formação de edema e também teve efeitos anti-hemorrágicos.

Objetivos

3 - OBJETIVOS

Face à escassez de maiores informações a respeito dos efeitos dos venenos botrópico e crotálico sobre a liberação de citocinas e frente à necessidade de prevenção das complicações locais e sistêmicas no tratamento bem sucedido dos acidentes ofídicos, este trabalho teve por objetivos:

Comparar as respostas inflamatórias local e sistêmica induzidas pelos venenos botrópico e crotálico por meio da quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em ratos *Wistar* intoxicados experimentalmente com veneno botrópico ou crotálico submetidos ao tratamento com soro antiofídico e extrato aquoso de *Mikania glomerata*.

Avaliar as propriedades anti-inflamatórias da planta *Mikania glomerata* nestes acidentes ofídicos.

Material e métodos

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O projeto foi realizado no Biotério de Experimentação da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente – SP, no Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ-UNESP, Campus de Botucatu e no laboratório de imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – UNESP, Botucatu – SP

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos e aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu (Anexo).

4.2 - Animais

Foram utilizados 90 ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 150 a 300g, com 45 dias de vida, clinicamente saudáveis, provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE de Presidente Prudente-SP.

4.2.1 – Manejo dos Animais

Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas com grades de aço cromado e com lotação de um animal por gaiola por um período de três a sete dias antes do início do experimento no biotério de experimentação, no Biotério central da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. O ambiente teve controle de luz (ciclo de 12 horas) e de temperatura constante (25°C), umidade do ar de 55-65% e tempo de exaustão de 10 trocas de ar da sala/hora. Água filtrada e ração comercial seca (PURINA®) foram fornecidas ad libitum.

4.3 - Delineamento Experimental

4.3.1 - Grupos experimentais

Os animais foram divididos primeiramente em dois grupos: veneno crotálico (VC) e veneno botrópico (VB) e cada grupo foi dividido em três subgrupos com 18 animais em cada. Para o subgrupo controle (C) do VC e o controle do VB foram repetidos os mesmos resultados.

- Grupo VC:
 - C – controle
 - VC – veneno crotálico + soro antiofídico
 - VCM – veneno crotálico + soro antiofídico + *Mikania glomerata*

- Grupo VB:
 - C – controle
 - VB – veneno botrópico + soro antiofídico
 - VBM – veneno botrópico + soro antiofídico + *Mikania glomerata*

4.3.2 - Momentos de avaliação

Cada subgrupo foi dividido em três momentos de avaliação sendo que foram utilizados 6 animais por momento.

- M1 – 30 minutos após a inoculação do veneno botrópico ou crotálico;
- M2 – Seis horas após a inoculação do veneno botrópico ou crotálico;
- M3 – 24 horas após a inoculação do veneno botrópico ou crotálico;

Obs: O soro antiofídico foi administrado seis horas após a inoculação do veneno e o extrato da planta foi administrado a cada duas horas após a inoculação do veneno totalizando três administrações completadas no momento M2.

4.4 - Inoculação dos venenos crotálico e botrópico, soroterapia e tratamento com *Mikania glomerata*.

Inoculação dos venenos crotálico e botrópico

Os venenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Bothropoides jararaca* foram fornecidos pelo CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Botucatu.

Os venenos diluídos em solução salina estéril na concentração de 5 mg/mL foram administrados por via subcutânea no terço médio da face lateral do membro posterior esquerdo com seringa descartável de 1 mL e agulha hipodérmica 13x4,5 na dose de 10mg/kg (dose determinada em experimento piloto).

Soroterapia

A soroterapia foi realizada como o soro antiofídico Botrópico-Crotálico (Vencofarma®) por via intraperitoneal, seis horas após a inoculação do veneno.

Tratamento com extrato de *Mikania glomerata*

O extrato aquoso de *Mikania glomerata* a 10% foi obtido no Departamento de Farmacologia da FAI - Faculdades Adamantinenses Integradas e a planta foi validada pela Faculdade de Agronomia da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE e identificada e registrada com o número 16838 no Departamento de Botânica da UNESP (BOTU) – Botucatu-SP.

O extrato foi administrado por gavagem na dose de 1 mL a cada duas horas após a inoculação do veneno até a aplicação do soro.

4.5 - Homogenato proveniente da musculatura da pata

Para se avaliar a produção de citocinas, *in vivo*, foram utilizados grupos de 6 ratos para cada momento. Os venenos botrópico e crotálico foram inoculados na musculatura da pata esquerda. O grupo controle recebeu solução salina nas mesmas condições. A cada momento, após a inoculação do veneno, os animais foram eutanasiados com tiopental na dose de 100 mg/kg. A musculatura da pata esquerda foi seccionada com auxílio de um *punch* com diâmetro de 8 mm e transferida para um tubo *ependorf* contendo 200 µL de PBS. O tecido foi picotado com uma tesoura e posteriormente homogeneizado com uma haste de vidro no próprio tubo *ependorf*. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 1200 rpm durante 6 minutos e o sobrenadante congelado a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

4.6 - Cultivo de células esplênicas

Um fragmento do baço dos ratos previamente inoculados com o veneno botrópico ou crotálico foi coletado assepticamente, usando capela de fluxo laminar, materiais estéreis e antissepsia do rato, nos diferentes momentos (item 4.3.2) e macerado em 500µL de meio de cultura RPMI 1640 com auxílio

de uma agulha 25X7. A suspensão celular foi transferida para tubos de ensaio e centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm. O sedimento celular foi homogeneizado com 1mL de meio completo (RPMI contendo gentamicina 40mg/mL, L-glutamina 200mM, soro fetal bovino 10% e HEPES 25mM) e a concentração celular foi acertada para 4×10^6 células/mL.

Culturas contendo 0,5 mL (2×10^6 células) foram colocadas em placas de fundo plano e estimuladas com lipopolissacarídeo (10µg/mL de cultura) ou concanavalin-A (5 µg/mL de cultura), de acordo com a citocina avaliada. Após 48 horas de incubação a 37°C sob tensão constante de 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem das citocinas.

4.7 - Coleta de amostras de sangue para quantificação de citocinas

Diferentes períodos (item 4.3.2) de tempo após a inoculação do veneno, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico na dose de 50 mg/kg, por via intraperitoneal, e o sangue foi colhido pela punção cardíaca usando coleta a vácuo (Vacutainer Systems®). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos e os soros estocados a -20°C para posterior dosagem das citocinas.

4.8 - Dosagem de citocinas

Para a quantificação das citocinas no sobrenadante do homogenato da pata, cultura de células esplênicas e do soro dos animais utilizados nesse experimento foi utilizado o teste de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) usando o Kit comercial da R&D Systems (Minneapolis, Minn, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 - Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para amostras dependentes, empregando-se o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego, Califórnia, USA, 2000. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%

Resultados

5. Resultados

5.1. Determinação de citocinas no soro de ratos submetidos à intoxicação experimental com venenos crotálico e botrópico

As citocinas foram avaliadas 30min, 6h e 24h no soro dos animais que foram inoculados com venenos crotálico ou botrópico e tratados com soro anti-ofídico crotálico (VC) ou botrópico (VB) e, nos animais inoculados com veneno e tratados com soro anti-ofídico crotálico e extrato de *M. glomerata* (VCM) ou tratados com soro anti-ofídico botrópico e extrato de *M. glomerata* (VBM). Foram também avaliados animais normais, não inoculados com veneno, que constituiram o grupo controle (C).

5.1.1. Fator de necrose tumoral-alfa

Os níveis de TNF- α foram semelhantes entre os momentos de avaliação nos grupos controle (C), veneno crotálico (VC) e veneno botrópico (VB), não havendo diferença estatística entre eles. No grupo de veneno botrópico + *M. glomerata* (VBM), os níveis de TNF- α foram mais elevados no momento M3 em comparação com M1 e M2 do mesmo grupo.

Na avaliação entre grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os mesmos momentos nos grupos que receberam veneno crotálico (quadro 1). Entretanto, nos grupos que receberam veneno botrópico, os valores de TNF- α foram significativamente maiores no grupo VBM (quadro 2). Assim, a inoculação de veneno botrópico e tratamento com soro anti-ofídico + *M. glomerata* induziu maior produção de TNF- α após 24h de tratamento dos animais em comparação aos demais grupos e momentos.

Quadro 1 – Valores médios e desvio padrão de TNF- α no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	3,075 (0,241) Aa	3,332 (0,299) Aa	3.336 (0,269) Aa
6 horas (M2)	3,033 (0,195) Aa	3,104 (0,130) Aa	2,905 (0,061) Aa
24 horas (M3)	3,236 (0,154) Aa	3,284 (0,203) Aa	3,303 (0,250) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

Quadro 2 – Valores médios e desvio padrão de TNF- α no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	3,075 (0,241) Aa	3,179 (0,259) Aa	3,159 (0,239) Ba
6 horas (M2)	3,033 (0,195) Aa	3,194 (0,135) Aa	2,961 (0,161) Ba
24 horas (M3)	3,236 (0,154) Ab	3,448 (0,057) Ab	5,642 (1,926) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

5.1.2. Interleucina-10

Os níveis séricos de IL-10 foram semelhantes nos diferentes momentos de avaliação dos grupos C, VC, VB e VBM (Quadros 3 e 4). Nos animais VCM houve diminuição significativa de IL-10 no momento M3 em relação ao M1. Esses resultados mostram que o tratamento com soro-antiofídico e extrato de

M. glomerata levou à menor produção de IL-10 nos animais inoculados com veneno crotálico.

Quadro 3 – Valores médios e desvio padrão de interleucina 10 (IL-10) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	17,832 (2,240) Aa	23,134 (4,287) Aa	23,134 (4,287) Aa
6 horas (M2)	18,998 (1,684) Aa	20,335 (0,919) Aa	19,612 (1,719)ABa
24 horas (M3)	22,335 (1,866) Aa	20,722 (0,742) Aa	16,598 (0,547) Bb

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

Quadro 4 – Valores médios e desvio padrão de interleucina 10 (IL-10) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	17,832 (2,240) Aa	21,335 (2,970) Aa	21,335 (2,970) Aa
6 horas (M2)	18,998 (1,684) Aa	20,612 (2,488) Aa	19,222 (0,956) Aa
24 horas (M3)	22,335 (1,866) Aa	21,557 (1,811) Aa	19,112 (3,593) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

5.1.3. Interleucina-6

Os quadros 5 e 6 mostram os valores de IL-6 no soro dos animais dos grupos estudados. O tratamento com veneno crotálico e soro antiofídico (VC)

levou à diminuição estatisticamente significativa dos níveis dessa citocina no período M3 (Quadro 5). Não houve diferença significativa entre os momentos de avaliação dos demais grupos: C e VCM. No grupo VB, a concentração de IL-6 no momento M3 foi significativamente maior do que nos períodos M1 e M2 e, no grupo VBM, os valores detectados no momento M2 foram estatisticamente diferentes dos momentos M1 e M3 (Quadro 6).

Quadro 5 – Valores médios e desvio padrão de interleucina 6 (IL-6) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	57,292 (3,925)Aa	73,785 (14,893) Aa	74,560 (14,507)Aa
6 horas (M2)	56,944 (2,882)Ab	64,815 (3,191) ABa	65,972 (3,511) Aa
24 horas (M3)	57,870 (2,714)Aa	56,906 (5,829) Ba	71,759 (10,481) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

Quadro 6 – Valores médios e desvio padrão de interleucina 6 (IL-6) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	57,292 (3,925)Aa	62,500 (5,510) Ca	62,237 (5,311) Ba
6 horas (M2)	56,944 (2,882)Ab	81,019 (5,575)Bb	208,06 (106,90) Aa
24 horas (M3)	57,870 (2,714)Ab	260,17 (80,193)Aa	65,972 (7,429) Bb

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

5.1.4. Interferon-gama

Não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de IFN- γ entre os diferentes momentos de avaliação no soro dos animais dos grupos C, VC e VB. No grupo VCM, os valores de IFN- γ foram significativamente mais elevados no momento M3 em comparação com M1 e M2, e em comparação com os grupos C e VC, avaliados no mesmo período (Quadro 7). Resultados semelhantes foram observados na análise dos resultados do grupo VBM (Quadro 8). Os níveis da citocina também foram significativamente maiores no momento M3, quando comparado com M1 e M2 e com os valores detectados nos grupos C e VB no momento M3. Em conjunto, esses resultados mostram que o tratamento com *M. glomerata* induz a produção de níveis elevados de IFN- γ .

Quadro 7 – Valores médios e desvio padrão de interferon gama (IFN- γ) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	20,399 (4,238) Aa	23,980 (2,291) Aa	20,399 (4,238) Ba
6 horas (M2)	20,920 (1,692) Aa	22,280 (2,291) Aa	25,434 (2,872) Ba
24 horas (M3)	24,479 (2,349) Ab	21,918 (1,1018) Ab	220,53 (61,717) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

Quadro 8 – Valores médios e desvio padrão de interferon gama (IFN- γ) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	20,399 (4,238) Aa	24,089 (3,640)Aa	24,089 (3,640)Ba
6 horas (M2)	20,920 (1,692) Aa	24,913 (2,095)Aa	25,463 (2,291)Ba
24 horas (M3)	24,479 (2,349) Ab	31,250 (3,508)Ab	121,77 (9,649)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

5.1.5. Interleucina-1 β

Não houve diferença estatisticamente significativa desta variável entre todos os momentos dos grupos controle e dos que receberam veneno crotálico (Quadro 9).

A análise do grupo tratado com veneno botrópico + soro antibotrópico (VB) mostra valores de IL-1 β significativamente mais elevados nos períodos M2 e M3 em comparação com M1. Resultados semelhantes foram observados no grupo VBM e sugerem que o veneno botrópico induz a produção de níveis elevados de IL-1 β nos animais inoculados em comparação com os controles.

Quadro 9 – Valores médios e desvio padrão de interleucina 1 β (IL-1 β) no soro de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	17,771 (4,434)Aa	22,278 (5,550)Aa	22,278 (5,550)Aa
6 horas (M2)	22,322 (4,215)Aa	21,749 (4,524)Aa	21,406 (4,713)Aa
24 horas (M3)	17,960 (1,429)Aa	19,918 (2,032)Aa	23,901 (11,060)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

Quadro 10 – Valores médios e desvio padrão de interleucina 1 β (IL-1 β) no soro de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/ml) segundo grupos e momentos de avaliação

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	17,771 (4,434)Aa	15,473 (3,369)Ba	16,531 (4,4091)Ba
6 horas (M2)	22,322 (4,215)Aa	29,052 (9,240)Aa	25,755 (5,925)Aa
24 horas (M3)	17,960 (1,429)Ab	25,873 (3,578)Aa	24,597 (4,290)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

5.2. Determinação de citocinas no homogenato da musculatura da pata de ratos submetidos à intoxicação experimental com venenos crotálico e botrópico

5.2.1. Fator de necrose tumoral-alfa (TNF α)

A análise da concentração de TNF- α no local de inoculação do veneno crotálico mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre todos os momentos dos grupos que receberam veneno crotálico, nem entre os grupos C, VC e VCM (Quadro 11).

Nos grupos inoculados com veneno botrópico (Quadro 12), os valores de TNF- α dos grupos VB foram significativamente mais elevados em comparação com o grupo C nos momentos M1 e M2. No grupo VBM, a concentração da citocina foi semelhante a do grupo VB e significativamente maior que a observada no grupo C nos momentos M1 e M3. Esses resultados mostram que o veneno botrópico induz a produção de TNF- α no local de inoculação.

Quadro 11 – Valores médios e desvio padrão de TNF- α no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	6,325 (0,386)Aa	6,325 (0,719)Aa	6,410 (0,769)Aa
6 horas (M2)	6,774 (0,188) Aa	6,496 (0,805)Aa	6,218 (0,434)Aa
24 horas (M3)	6,539 (0,303)Aa	5,748 (0,318)Aa	5,974 (0,146)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

Quadro 12 – Valores médios e desvio padrão de TNF- α no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	6,325 (0,386)Ab	8,419 (1,645)Aa	8,333 (1,825)Aa
6 horas (M2)	6,774 (0,188) Ab	9,124 (1,431)Aa	7,500 (0,972)Aab
24 horas (M3)	6,539 (0,303)Ab	7,735 (1,140)Aab	9,436 (3,761)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

5.2.2. Interleucina-10

Os quadros 13 e 14 mostram que não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos níveis de IL-10 entre os momentos de avaliação dos grupos, nem entre os grupos que foram inoculados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico ou com extrato de *M. glomerata*.

Quadro 13 – Valores médios e desvio padrão de IL-10 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	26,280 (1,587)Aa	24,558 (1,719) Aa	24,448 (0,701)Aa
6 horas (M2)	27,364 (0,716) Aa	24,877 (0,419) Aa	24,239 (1,250) Aa
24 horas (M3)	25,642 (0,684) Aa	26,727 (1,719) Aa	24,713 (1,513) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

Quadro 14 – Valores médios e desvio padrão de IL-10 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	26,280 (1,587)Aa	29,086 (3,013) Aa	29,086 (3,103) Aa
6 horas (M2)	27,364 (0,716) Aa	27,173 (1,512) Aa	27,045 (1,273) Aa
24 horas (M3)	25,642 (0,684) Aa	28,768 (4,010) Aa	26,599 (2,022)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

5.2.3. Interleucina-6

A produção de IL-6 no local de inoculação do veneno crotálico foi significativamente mais elevada nos grupos VC e VCM em relação ao grupo controle nos períodos M1 e M2. A concentração mais elevada de IL-6 observada no momento M2 dos grupos VC e VCM mostrou significância estatística em comparação com os momentos M1 e M3 desses grupos (Quadro 15).

Nos grupos que receberam veneno botrópico, houve diferença estatística com relação à produção local de IL-6 nos grupos VB e VBM em comparação com o grupo controle em todos os momentos analisados. A análise dos grupos VB e VBM mostrou que os níveis de IL-6 foram significativamente mais elevados a partir do momento M2, mantendo-se em M3, em comparação com M1. Esses resultados obtidos sugerem que ambos os venenos induzem síntese precoce de IL-6 no local de inoculação, sendo a produção da citocina sustentada em períodos mais tardios, no caso do veneno botrópico. Não houve diferença significativa entre os resultados dos grupos VB e VBM nos diferentes momentos estudados.

Quadro 15 – Valores médios e desvio padrão de IL-6 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	55,749 (6,726) Aa	70,023 (5,890) Ba	70,858 (5,556) Ba
6 horas (M2)	56,327 (2,155) Ab	438,68 (177,23) Aa	586,36 (84,281) Aa
24 horas (M3)	59,221 (3,902) Aa	63,272 (4,781) Ba	64,961 (6,392) Ba

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

Quadro 16 – Valores médios e desvio padrão de IL-6 no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	55,749 (6,726) Ab	84,876 (18,678) Ba	85,376 (18,226) Ba
6 horas (M2)	56,327 (2,155) Ab	1534,0 (216,53) Aa	1298,6 (268,12) Aa
24 horas (M3)	59,221 (3,902) Ab	1680,0 (515,65) Aa	1239,2 (535,25) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

5.2.4. Interferon-gama (IFN- γ)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos dentro dos grupos C, VC e VB. Nos grupos VCM e VBM, os valores de IFN- γ foram significativamente menores em relação ao momento M1 (Quadros 17 e 18).

Na comparação entre os grupos, houve produção significativamente menor da citocina no local de inoculação do veneno crotálico, nos grupos VC e VCM em comparação com o grupo C, nos momentos M2 e M3 (quadro 17). Entre os momentos dos grupos que receberam veneno botrópico (quadro 18), houve diferença estatística entre o momento M2 do grupo VBM comparado com o mesmo momento dos grupos C e VB. No momento M3, o valor da citocina foi significativamente menor nos grupos VB e VBM em relação ao grupo C.

Quadro 17 – Valores médios e desvio padrão de IFN – γ no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	33,275 (2,874)Aa	29,586 (2,098)Aa	29,586 (2,098)Aa
6 horas (M2)	32,480 (1,587)Aa	28,284 (1,766)Ab	26,404 (0,576)Bb
24 horas (M3)	33,774 (5,587)Aa	28,140 (1,328)Ab	27,001 (1,824)Bb

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

Quadro 18 – Valores médios e desvio padrão de IFN – γ no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	33,275 (2,874)Aa	31,322 (3,0)Aa	31,334 (3,014)Aa
6 horas (M2)	32,480 (1,587)Aa	30,888 (3,615)Aa	26,910 (2,213)Bb
24 horas (M3)	33,774 (5,587)Aa	27,778 (2,017)Ab	26,982 (1,829)Bb

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ($p < 0,05$)

5.2.4. Interleucina-1 beta (IL-1 β)

A produção de IL-1 β no local de inoculação do veneno crotálico não mostrou diferença significativa entre os grupos, nem entre os momentos. A semelhança entre os resultados dos grupos C, VC e VCM sugere que o veneno não estimulou a produção dessa citocina (quadro 19).

Nos grupos inoculados com veneno botrópico verificou-se concentração significativamente maior nos momentos M2 e M3 nos grupos VB e M3 no grupo VBM em comparação com o grupo C e com o momento M1 (quadro 20). Esses resultados indicam que o veneno botrópico é capaz de estimular a síntese de IL-1 β no local de inoculação.

Quadro 19 – Valores médios e desvio padrão de IL-1 β no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos	11,327 (1,669)Aa	10,699 (0,365) Aa	10,699 (0,365)Aa
6 horas	11,013 (0,472) Aa	11,842 (1,210) Aa	12,864 (2,082) Aa
24 horas	10,580 (0,670)Aa	11,421 (1,096)Aa	12,575 (0,769)Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

Quadro 20 – Valores médios e desvio padrão de IL-1 β no homogenato da pata de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/ml) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos	11,327 (1,669)Aa	11,421 (1,096) Ba	11,421 (1,096)Ba
6 horas	11,013 (0,472) Ab	79,861 (11,638) Aa	15.484 (3.401)Bb
24 horas	10,580 (0,670) Ab	96,657 (29,303) Aa	106,01 (64,019) Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. (p<0,05)

5.3. Determinação de citocinas por células esplênicas de ratos submetidos à intoxicação experimental com venenos botrópico e crotálico

Células esplênicas de ratos inoculados ou não com venenos botrópico ou crotálico e tratados com soro anti-ofídico ou soro anti-ofídico e extrato de *M. glomerata* foram avaliadas quanto à capacidade de produção basal ou estimulada de diferentes citocinas. Os esplenócitos foram estimulados ou não com Concanavalina A (Con-A) ou Lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS).

5.3.1. Fator de necrose tumoral-alfa

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os momentos dentro dos grupos C, VC, VCM, VB e VBM quanto à produção basal de TNF- α pelas células esplênicas não estimuladas (Figuras 4 e 5).

Quando as células foram estimuladas com Con-A, verifica-se que os animais do grupo VC apresentaram capacidade significativamente diminuída de produção da citocina em comparação com o grupo VCM em todos os momentos de avaliação. Essa menor capacidade mostrou significância estatística quando comparada à produção basal, não estimulada, sugerindo um efeito supressor do veneno crotálico sobre a capacidade de produção de TNF- α . Os resultados sugerem que o tratamento com *M. glomerata* restaura a capacidade de produção de TNF- α pelas células dos animais inoculados com veneno crotálico. O estímulo com LPS induziu a produção da citocina em todos os grupos e momentos avaliados. Os resultados foram significativamente mais elevados em comparação com a produção basal de TNF- α nos diferentes grupos (Figura 4).

Nos animais inoculados com veneno botrópico (Figura 5), a capacidade de produção de TNF- α pelas células esplênicas estimuladas com Con-A foi significativamente diminuída nos períodos M2 e M3 em comparação com o momento M1, sugerindo um efeito inibidor do veneno sobre a capacidade de produção da citocina. No grupo VBM, não se observou essa menor capacidade de produção de TNF- α nos momentos M1 e M2, cujos valores foram

significativamente mais elevados em comparação aos obtidos no grupo VB, nos mesmos períodos e em relação ao momento M3 no grupo VBM.

A capacidade de produção de TNF- α pelas células esplênicas estimuladas por LPS não mostrou diferença significativa entre os momentos estudados e entre os grupos C, VB e VBM.

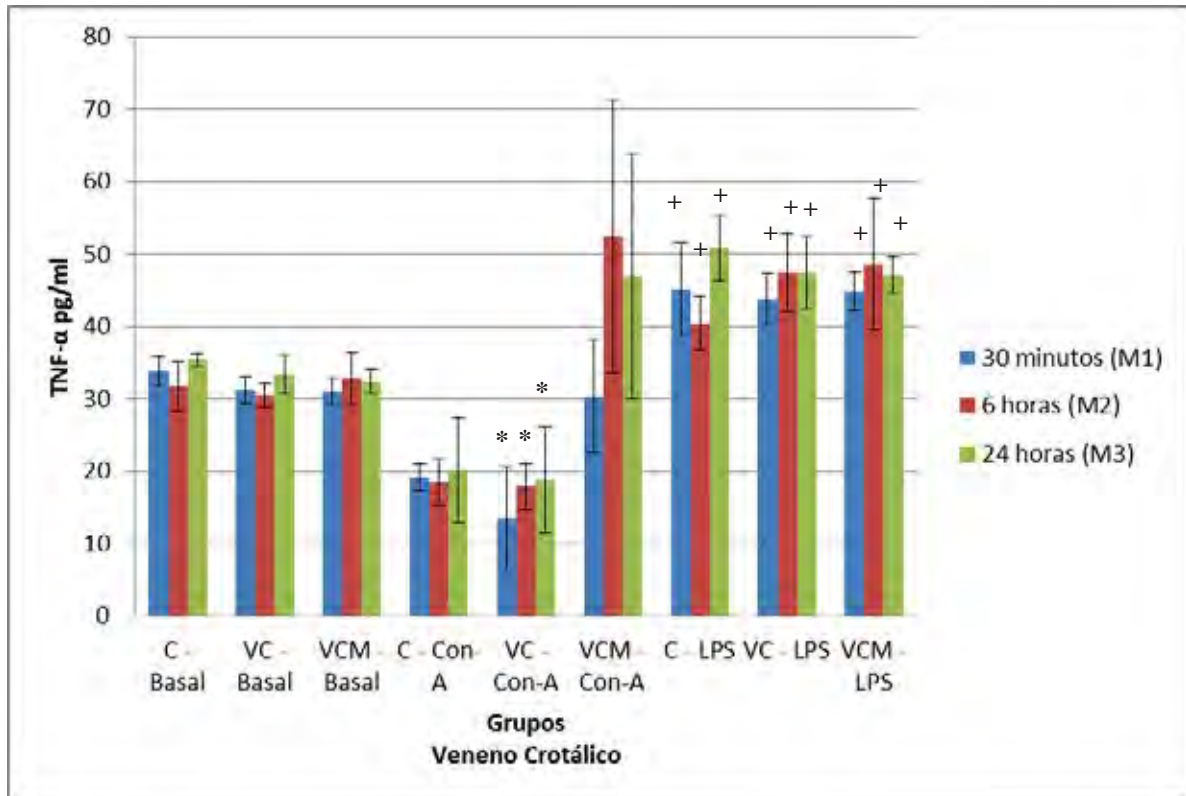


Figura 4. Valores médios e desvio padrão de TNF- α na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

* ($p < 0,05$) vs VCM-Con-A, VC-Basal; + ($p < 0,05$) vs C-Basal, VC-Basal, VCM-Basal (ANOVA)

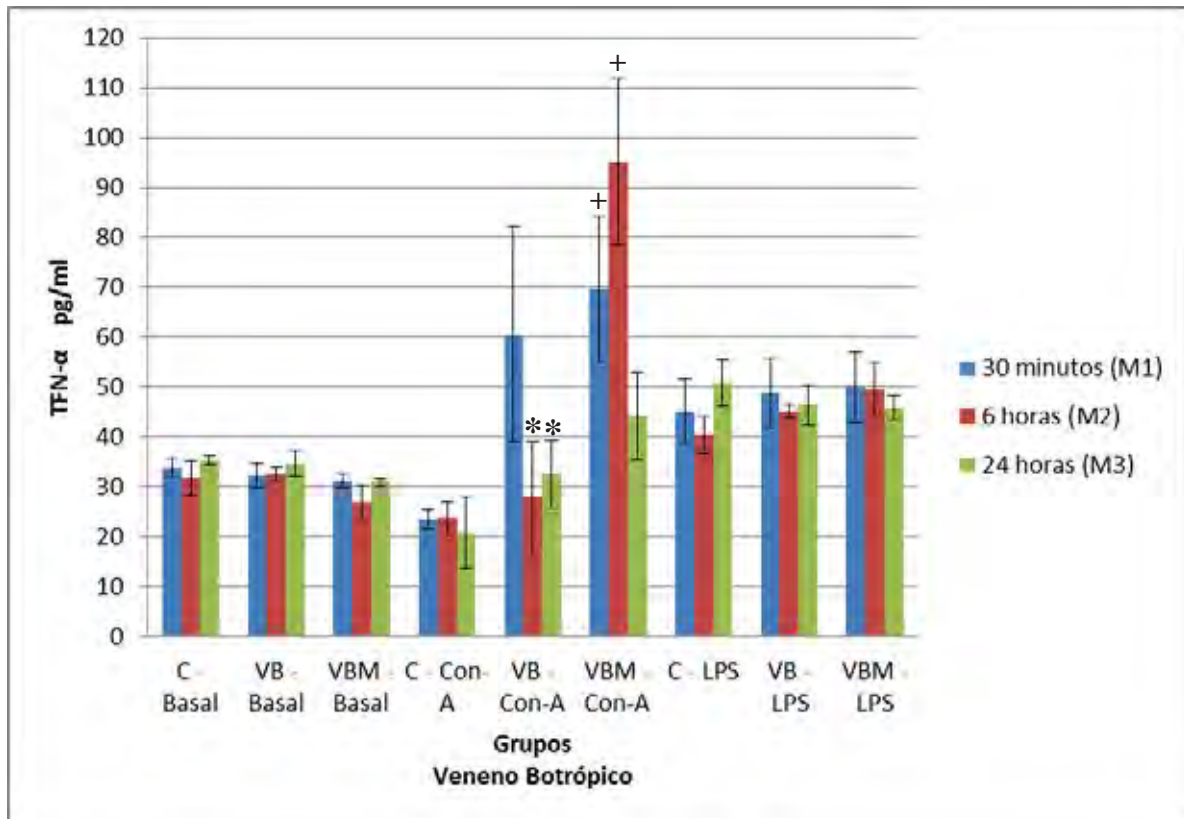


Figura 5. Valores médios e desvio padrão de TNF- α na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

* ($p < 0,05$) vs M1; + ($p < 0,05$) vs VB-Con-A (M1, M2); VBM-Con-A (M3) (ANOVA)

5.3.2. Interleucina-10

A análise da produção basal de IL-10 pelas células esplênicas de animais controle e inoculados com veneno crotálico mostra que o grupo VC apresenta valores significativamente mais elevados de IL-10 no momento M2 em comparação aos grupos C e VCM no mesmo período. No grupo VCM, o tratamento com *M. glomerata* levou à inibição da produção de IL-10, cujos valores foram significativamente menores nos períodos M2 e M3 em comparação com o momento M1 e com os resultados dos grupos C e VC no momento M3.

Quando as células foram estimuladas com Con-A houve produção elevada de IL-10 em relação à produção basal em todos os grupos C, VC e VCM, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos e entre os momentos estudados. (Figura 6). O tratamento das células com LPS

não estimulou a produção de IL-10 sendo os resultados semelhantes aos da produção basal das células dos diferentes grupos estudados. Apenas no grupo VCM, os valores foram significativamente menores nos momentos M2 e M3 em comparação com o período M1.

No grupo dos animais que receberam veneno botrópico, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados quando as células foram estimuladas com Con-A nos momentos dentro dos grupos C, VB e VBM (figura 7), sendo esses resultados mais elevados em comparação com a produção basal dos mesmos grupos. A produção basal de IL-10 pelas células esplênicas foi significativamente menor nos momentos M2 dos grupos VB-basal e VBM-basal. Após estímulo com LPS, observou-se diferença significativa entre os grupos C-LPS, VB-LPS e VBM-LPS em todos os momentos, sendo os valores dos dois últimos grupos significativamente menores do que o grupo C-LPS.

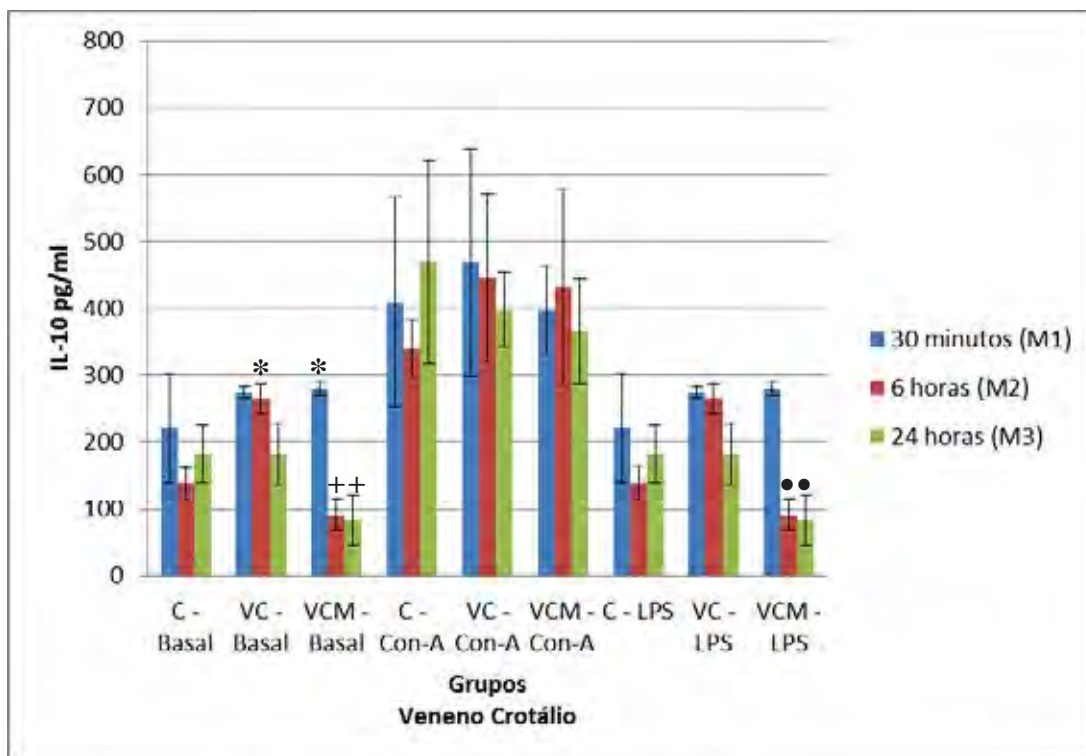


Figura 6. Valores médios e desvio padrão de IL-10 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

* ($p < 0,05$) vs C-Basal (M2), VCM-Basal (M2); +($p < 0,05$) vs VCM-Basal (M1), C-Basal (M3);

•($p < 0,05$) vs VCM-LPS (M1) (ANOVA)

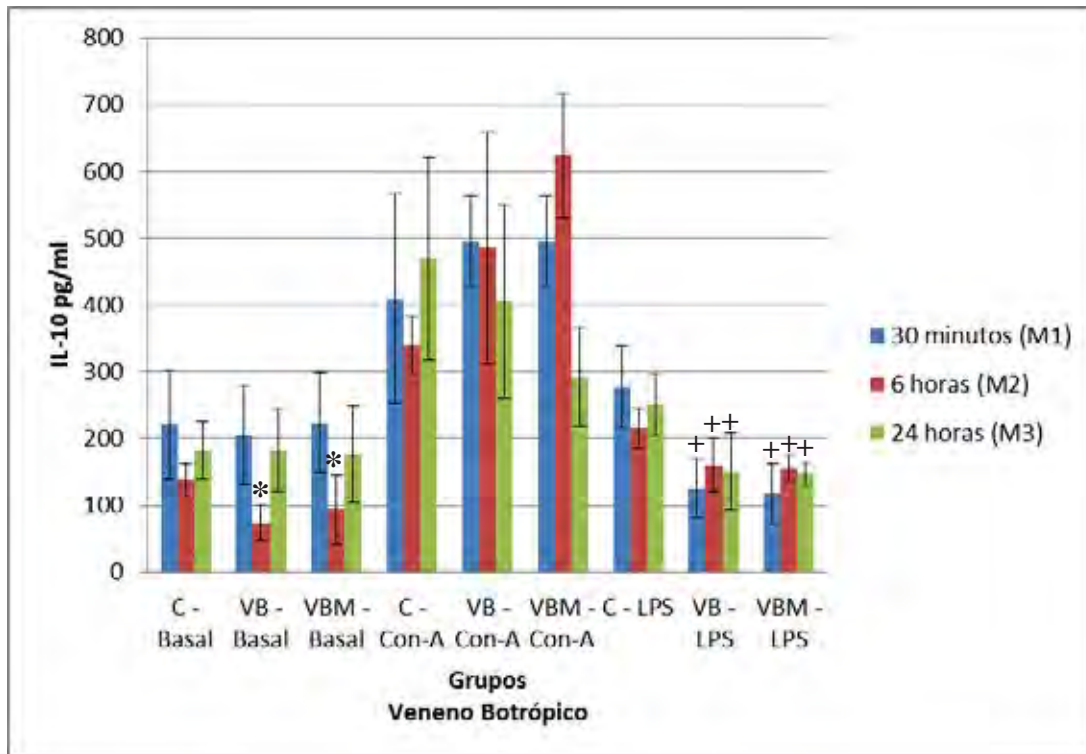


Figura 7. Valores médios e desvio padrão de IL-10 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

*($p < 0,05$) vs VB-Basal (M1, M3); VBM-Basal (M1, M3); +(p<0,05) vs C-LPS (M1, M2, M3) (ANOVA)

5.3.3. Interleucina-6

Não houve diferença significativa entre os grupos e momentos com relação à produção basal ou estimulada com Con-A por células esplênicas de animais dos grupos C, VC, VCM, VB e VBM.

Após estímulo com LPS, as células esplênicas dos grupos VC e VCM e VB e VBM produziram níveis mais elevados de IL-6 no período M2 em comparação com o grupo C-LPS no mesmo momento (Figuras 8 e 9). Esses resultados sugerem que a inoculação dos venenos crotálico e botrópico não afetou a capacidade de produção de IL-6 pelas células. A comparação entre os momentos no grupo VB mostrou produção significativamente mais elevada da citocina no período M3 em comparação com M1 e M2. No grupo VBM, os níveis de IL-6 produzidos em M2 e M3 foram significativamente maiores que

em M1 e menores no momento M3 em comparação com VB, sugerindo efeito anti-inflamatório do extrato de *M. glomerata* nesse período (Figura 9).

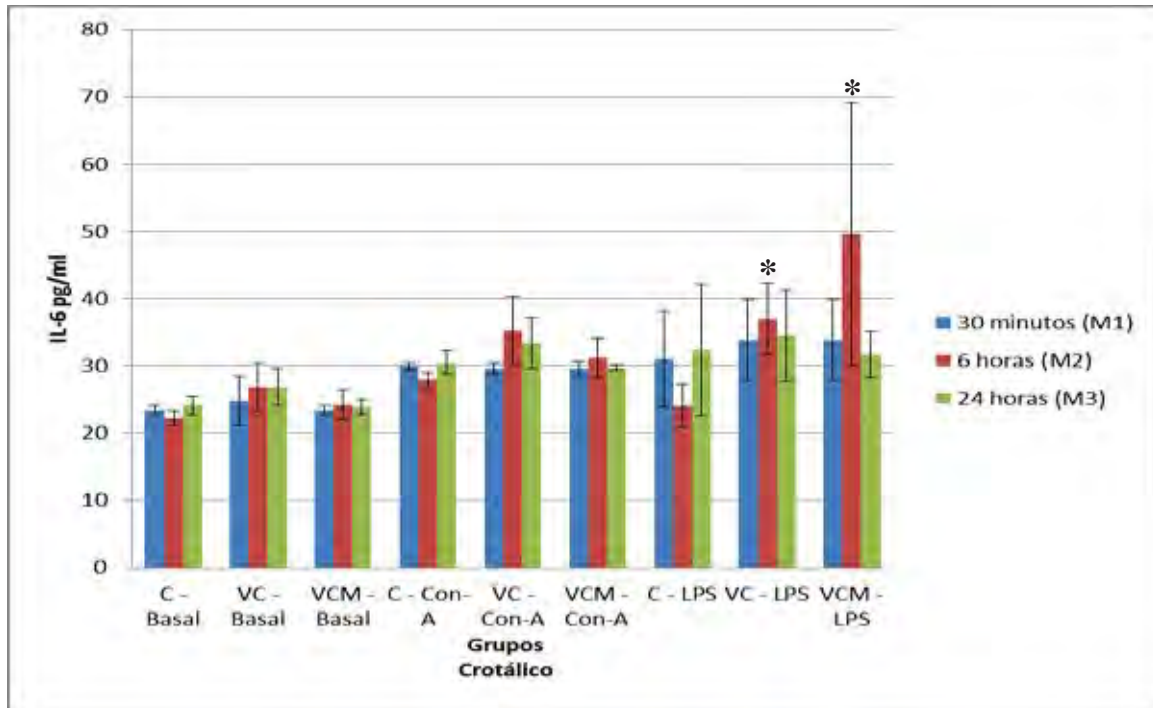


Figura 8. Valores médios e desvio padrão de IL- 6 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

*(p,0,05) vs C-LPS (M2) (ANOVA)

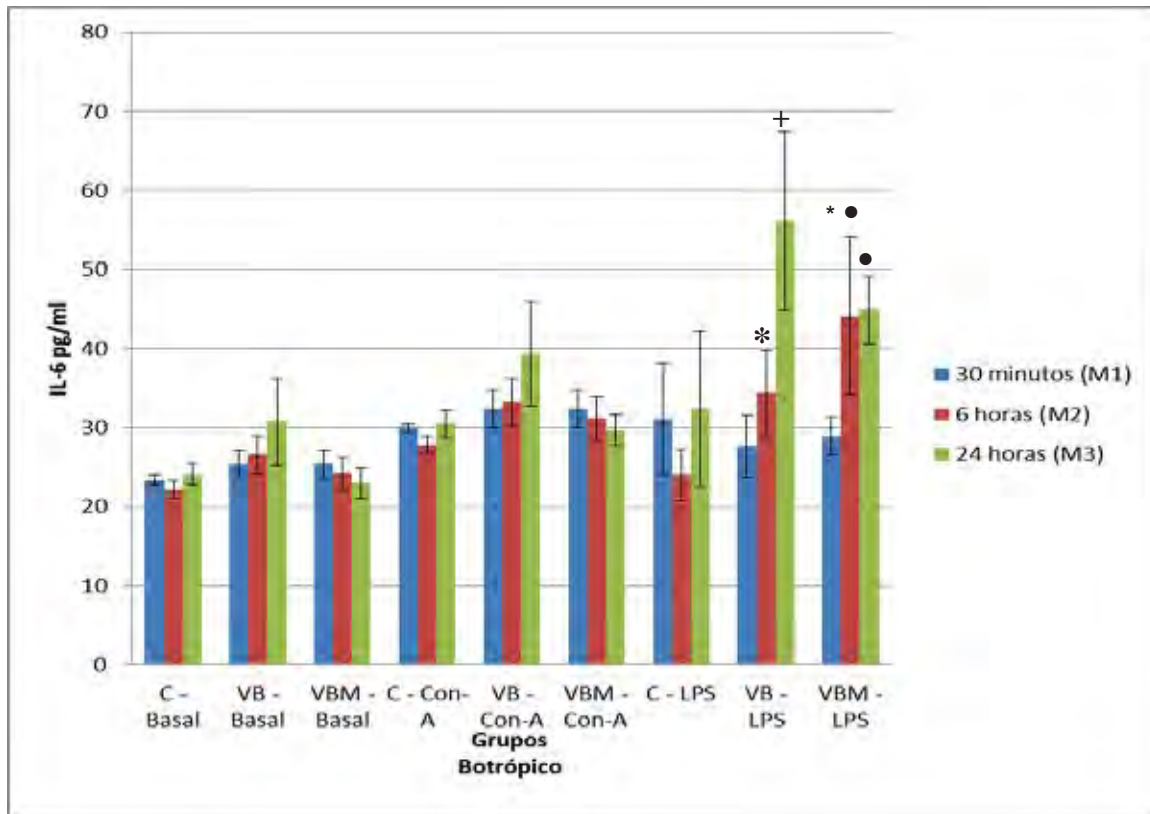


Figura 9. Valores médios e desvio padrão de IL-6 na cultura de células esplênicas de ratos intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

*($p < 0,05$) vs C-LPS (M2); +($p < 0,05$) vs VB-LPS (M1, M2); VBM-LPS (M3); •($p < 0,05$) vs VBM-LPS (M1) (ANOVA)

5.3.5. Interferon-gamma

Tanto a produção basal de IFN- γ quanto à estimulada por LPS foi detectada em níveis baixos, não havendo diferença significativa entre os grupos C, VC, VCM, VB e VBM nos diferentes momentos de avaliação. Apenas as células esplênicas estimuladas com Con-A produziram altas concentrações da citocina, sendo os resultados significativamente mais elevados do que seus respectivos controles de produção basal. A comparação entre os grupos e momentos quando do estímulo com Con-A não mostrou diferença significativa, indicando que a intoxicação com os venenos crotálico e botrópico e os tratamentos com soro anti-ofídico e extrato de *M. glomerata* não interferiram na capacidade de produção de IFN- γ pelas células esplênicas (Figuras 10 e 11).

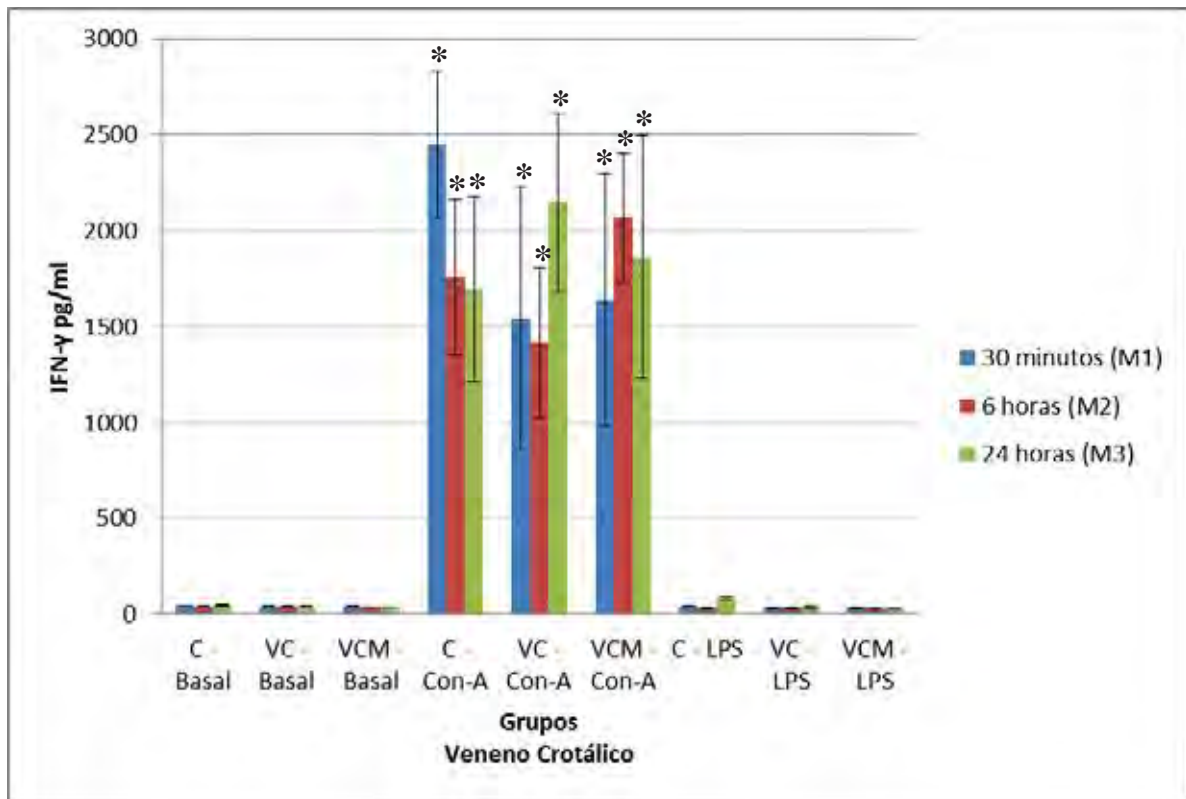


Figura 10. Valores médios e desvio padrão de IFN- γ na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

*($p < 0,05$) vs C-Basal, VC-Basal, VCM-Basal (ANOVA)

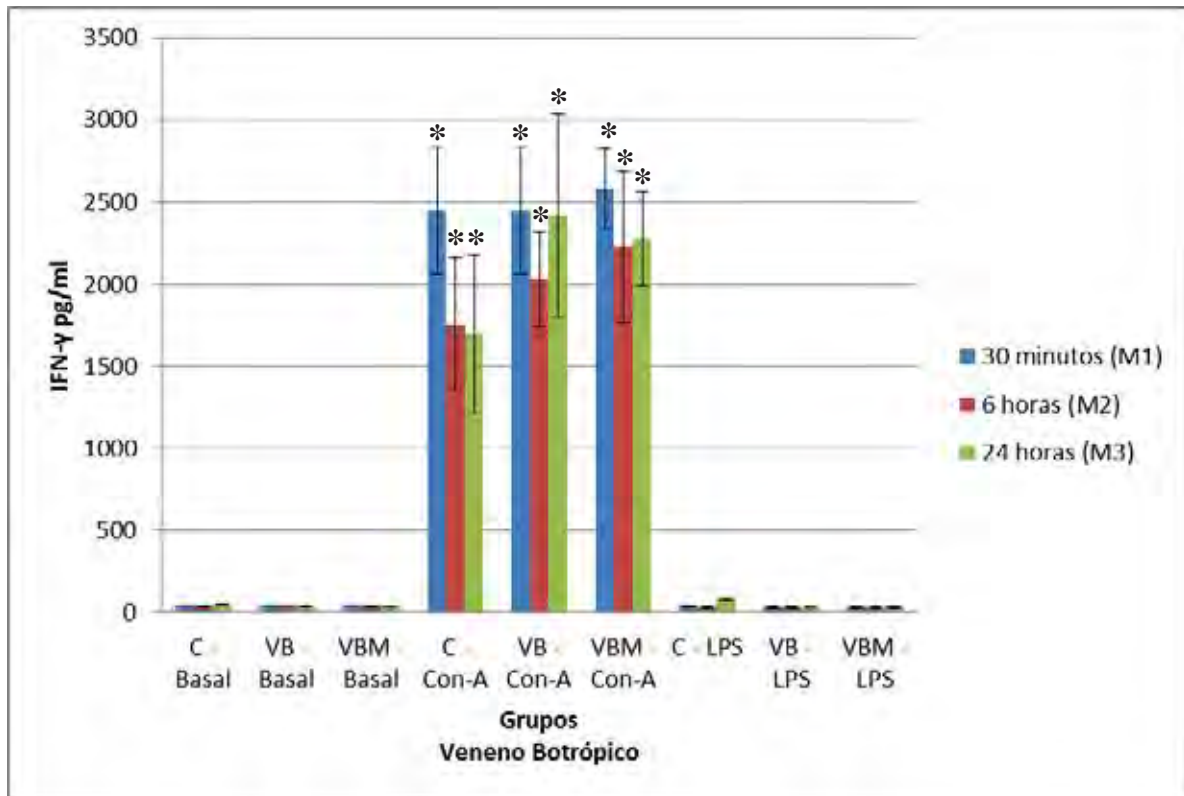


Figura 11. Valores médios e desvio padrão de IFN- γ na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

*($p < 0,05$) vs C-Basal, VC-Basal, VCM-Basal (ANOVA)

5.3.4. Interleucina-1 beta

A produção de IL-1 β por células esplênicas mostrou não haver diferença significativa entre os grupos e momentos com relação à produção basal ou estimulada com Con-A nos animais dos grupos C, VCM, VB e VBM. Apenas nos animais do grupo VC, a produção basal de IL-1 β foi significativamente maior no momento M2 em comparação com M1 e em relação ao grupo VCM no período M2 (Figura 12).

Quando as células foram estimuladas por LPS, tanto os animais dos grupos C como VC, VCM, VB e VBM apresentaram capacidade de produção de IL-1 β em comparação com as células não estimuladas (Basal) (Figuras 12 e 13). Os

valores da citocina produzida pelas células do grupo VC foram significativamente menores no momento M3 em comparação com M1 e M2. No período M2, esses valores foram mais elevados em comparação com M2 do grupo C-LPS. No grupo VCM, a capacidade de produção de IL-1 β foi significativamente maior em comparação com o grupo VC no momento M3. Nos grupos que receberam veneno botrópico (VB e VBM), a produção de IL-1 β foi significativamente menor no momento M2 em comparação com M1 e M3. Nestes dois grupos, a capacidade de produção da citocina retornou a valores elevados no momento M3. Entretanto, os níveis de IL-1 β foram significativamente menores no grupo VBM (Figura 10).

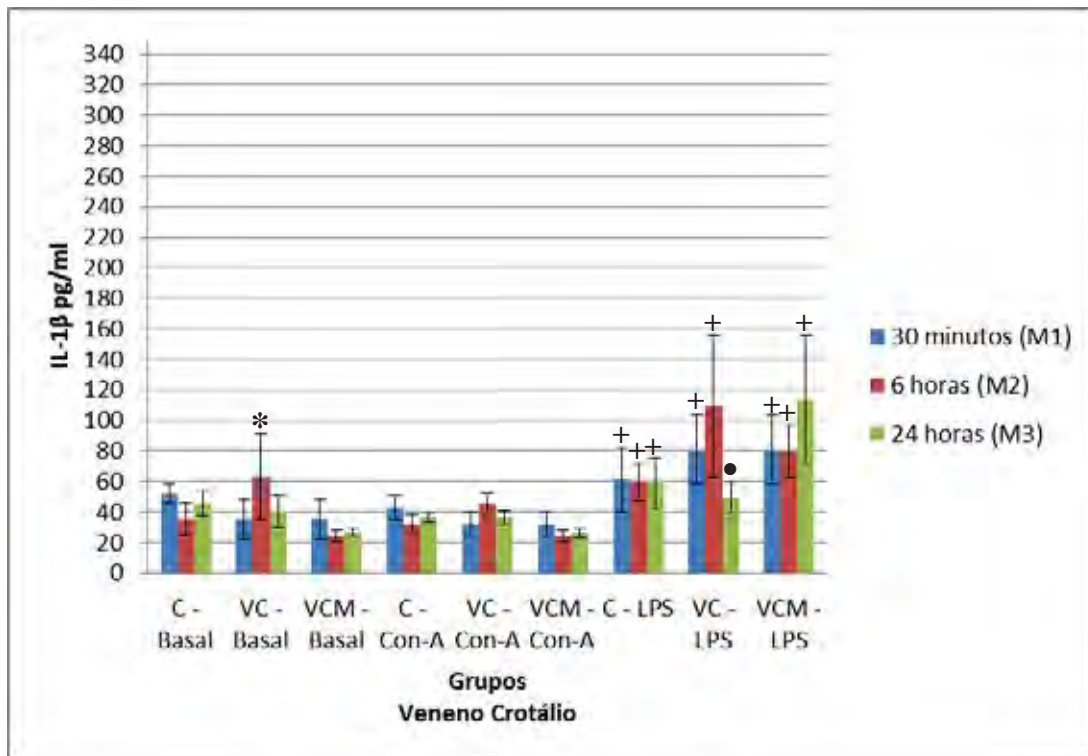


Figura 12. Valores médios e desvio padrão de IL-1 β na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

* (p<0,05) vs C-Basal (M1,M2); VCM-basal (M2); + (p<0,05) vs C-Basal, VC-Basal, VCM-Basal; vs C-LPS (M2); • (p<0,05) vs VC-LPS (M1,M2); VCM-LPS (M3) (ANOVA)

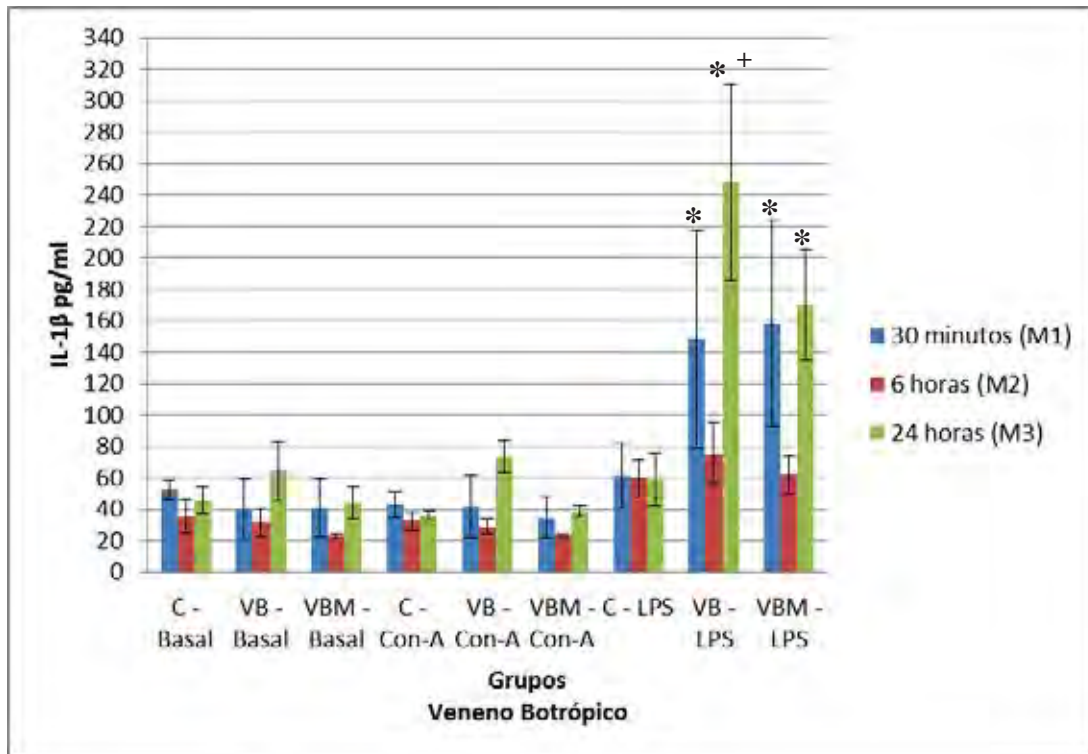


Figura 13. Valores médios e desvio padrão de IL-1 β na cultura de células esplênicas de ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

*($p < 0,05$) vs VB-LPS (M2); VBM-LPS (M2); +($p < 0,05$) vs VBM-LPS (M3) (ANOVA)

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.0 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo teve como objetivo quantificar as citocinas na intoxicação experimental pelos venenos botrópico e crotálico, como também a ação do extrato de *Mikania glomerata* como tratamento complementar nos casos de acidentes ofídicos causados por serpentes dos gêneros *Bothropoides* e *Crotalus*.

A dose do veneno (botrópico ou crotálico) foi encontrada por meio de um experimento piloto onde foram testadas várias doses do veneno até ser encontrada aquela em que os animais apresentavam alterações clínicas compatíveis com a intoxicação e sem o óbito após 24 horas da inoculação do veneno. Assim, a dose usada, neste estudo, foi de 10 mg/kg de peso vivo para ambos venenos.

O tratamento foi preconizado com a ajuda de um experimento piloto. O volume do extrato de *Mikania glomerata* foi de 3 mL de extrato a 10%, sendo administrado 1 mL, por *gavage*, a cada duas horas após a inoculação do veneno (botrópico ou crotálico). A soroterapia foi realizada após 6 horas da aplicação do veneno usando o soro comercial antibotrópico-crotálico (Vencofarma®) e a dose foi estipulada pela dose neutralizante tendo em vista a quantidade de veneno em mg inoculada em cada animal, sendo que 1 mL do soro neutraliza 2 mg do veneno botrópico e 1 mg do veneno crotálico (FERREIRA JUNIOR & BARRAVIERA, 2004).

A resposta de fase aguda é uma reação do organismo normal à lesão tecidual que se caracteriza por várias respostas do organismo a essa injúria como: agregação plaquetária, formação de coágulos, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e acúmulo e ativação de granulócitos e células mononucleares e liberação de citocinas (HEINRICH *et al.*, 1990; BILATE,

2007). As principais citocinas liberadas em resposta à injúria tecidual são as IL-1, IL-6, TNF e interferons (HEINRICH *et al.*, 1990).

O conhecimento do papel patogênico das citocinas e quimiocinas produzidas e liberadas nos acidentes ofídicos fez com que se pudesse entender melhor a resposta do organismo frente às diferentes intoxicações por serpentes peçonhentas.

6.1 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO SORO

Não houve alterações significantes na quantidade de TNF- α presente no soro, o que também foi observado em soro de pacientes humanos que sofreram picadas por serpentes *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* mesmo sendo comprovada a sua produção no local da picada (LOMENTE *et al.* 1993, BARRAVIERA *et al.*, 1995 CARNEIRO *et al.*, 2002).

O animais experimentalmente intoxicados com o veneno botrópico e tratados com o extrato de *M. glomerata* tiveram uma maior produção de TNF- α após 24 horas da inoculação, o que caracteriza o estímulo sistêmico da planta na produção dessa interleucina pró-inflamatória o que deve ser melhor investigado pois a planta tem um potencial anti-inflamatório sendo que era esperada uma redução na quantificação desta citocina (GASPARETTO *et al.*, 2010).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e a sua produção por macrófagos e monócitos faz com que haja a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004, OBERHOLZER *et al.*, 2002, SITPRIJA e SUTEPARAK, 2008). Sua liberação já foi observada em alguns trabalhos e em pacientes que sofreram intoxicação por veneno das serpentes *Bothrops* e *Crotalus durissus* (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004,).

Nesse trabalho, não houve alterações significantes na produção de IL-10 quando quantificadas no soro de ratos Wistar intoxicados pelos venenos de

Bothropoides jararaca. Os animais que receberam o veneno crotálico e tratados com soro anti-ofídico e *M. glomerata* apresentaram uma menor produção dessa citocina após 24 horas da inoculação do veneno, o que diretamente pode estar relacionada com a ação anti-inflamatória do veneno crotálico e do extrato de *M. glomerata* (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004, MOTTA *et al.*, 2009, LUNA *et al.*, 2011b).

Os valores de IL-6 nos animais que receberam o veneno crotálico e apenas com o tratamento com soroterapia tiveram um valor menor após 24 horas da inoculação quando comparados com o momento M1 do mesmo grupo e o momento M3 do grupo controle, o que pode estar relacionado com a ação anti-inflamatória do veneno, a qual já foi relatada por alguns autores, levando a uma menor produção desta citocina pró-inflamatória (SOUZA E SILVA *et al.* 1996, RANGEL-SANTOS *et al.* 2004).

O aumento da IL-6 em pacientes ou animais intoxicados pelas serpentes do gênero *Bothropoides* após 6 horas do acidente ou inoculação como foi observado nesse trabalho, concorda com a literatura onde existem relatos desse aumento em pacientes ou animais de experimentação intoxicados com veneno botrópico (LOMENTE *et al.* 1993, ÁVILA-AGUERO *et al.*, 2001b, LAING *et al.* 2003; ESCOCARD *et al.* 2006; LUNA *et al.*, 2011a; LUNA *et al.*, 2011b).

O aumento dos níveis de IL-6 em resposta à inoculação do veneno foi associado com o início da regeneração muscular. O efeito desta citocina provoca migração de neutrófilos para os tecidos, ativando a maturação destes e regula as moléculas de adesão das células endoteliais envolvidas na adesão de leucócitos ao endotélio (SUWA *et al.*, 2002; TEXEIRA *et al.*, 2009). No momento M3 do grupo que recebeu o tratamento complementar com o extrato da planta, foi observada a volta à normalidade da IL-6 quando comparado com o grupo controle, o que pode estar relacionado com o potencial anti-inflamatório do extrato de *Mikania glomerata* (HOLETZ *et al.* 2002, MAIORANO *et al.* 2005, MOTTA *et al.* 2009).

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória presente principalmente quando há lesão de músculo esquelético e que promove a regeneração das fibras musculares (CHENG *et al.*, 2008). O grupo intoxicado com veneno crotálico e tratado com soro antiofídico e *Mikania glomerata* apresentou um aumento marcante do IFN- γ no momento 24 horas após a inoculação do veneno. O mesmo aconteceu com o grupo que recebeu o veneno botrópico e tratado com soro antiofídico e *Mikania glomerata*, o que leva a acreditar que o extrato da planta aumenta a produção de IFN- γ sendo mais eficaz para a regeneração das fibras musculares após os acidentes ofídicos por esses gêneros de serpentes.

Motta (2008) e Floriano *et al.* (2009) observaram, por meio de exame histopatológico da musculatura do local da inoculação do veneno, redução da gravidade das lesões de animais tratados com o extrato de *Mikania glomerata*.

Muitos autores relatam o aumento da concentração de IL-1 β após o acidente ofídico ou em intoxicações experimentais. Neste trabalho, só foi observado o aumento após a inoculação do veneno botrópico, o que pode ser explicado pelo maior efeito deste veneno no local da inoculação ou picada. O veneno botrópico tem uma ação proteolítica e causa degeneração, necrose e infiltrado inflamatório principalmente de células polimorfonucleares levando assim à produção de citocinas e estas posteriormente são encontradas nos soros (HEINRICH *et al.*, 1990; LAING *et al.*, 2003; MOTTA, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Esse aumento só foi percebido após 6 horas da inoculação o que pode ser explicado pela produção da IL-1 β no local da inoculação que posteriormente alcançou a corrente sanguínea e foi detectada no soro já que as ações vasculotóxica e proteolítica do veneno fazem com que ocorra um menor suporte sanguíneo no local da picada (MOTTA *et al.* 2009).

6.2 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO HOMOGENATO DA PATA.

Inicialmente, postulou-se que a produção de TNF- α era exclusivamente executada por monócitos e macrófagos quando estimulados adequadamente. Recentemente, as expressões gênica e proteica de TNF- α no músculo esquelético foram caracterizadas em humanos, em um estudo que demonstrou, pela primeira vez, a presença desta citocina na ausência de monócitos infiltrados ou macrófagos. Isso indicou que a própria fibra muscular esquelética pode produzi-la, e assim esta poderia atuar de maneira autócrina e parácrina, em quantidade suficiente para mediar uma série de alterações morfológicas e funcionais no tecido (BARRAVIERA *et al.*, 1995; SPATE & SCHULZE, 2004).

O TNF- α teve um aumento somente nos animais que receberam o veneno botrópico, não tendo diferença estatística entre os tratamentos. Os animais acidentados ou intoxicados pelo veneno botrópico têm uma grande alteração no local da picada ou inoculação o que é percebido quando avaliado clinicamente ou por meio de exames histopatológicos onde se encontram alterações como necrose, congestão, hemorragia, edema e infiltração de células polimorfonucleares o que faz com que esse tipo de acidente possa levar uma maior liberação de citocinas pró-inflamatória no local (BARRAVIERA *et al.*, 1995; MOTTA, 2008).

Nos animais intoxicados pelo veneno crotálico, não foram encontrados níveis de TNF- α superiores aos animais do grupo controle o que pode estar relacionado à ação anti-inflamatória do veneno crotálico (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004).

Não foram encontradas diferenças significantes de IL-10 entre os grupos e momentos de ratos Wistar inoculados com o veneno botrópico ou crotálico. A produção de IL-10 é estimulada pelas citocinas pro-inflamatórias (IL-1 e IFN) e a ausência dessa citocina pode ser devida ao tempo insuficiente para o estímulo da produção local de IL-10 (LUNA *et al.*, 2011b).

A IL-6 esteve aumentada nos animais intoxicados com veneno botrópico e também nos animais intoxicados pelo veneno crotálico, o que já era esperado pela reação inflamatória no local da inoculação. Os animais que receberam veneno crotálico tiveram um aumento após seis horas, voltando aos níveis basais após 24 horas da inoculação, o que pode ser explicado pelo veneno crotálico não ter ações locais evidentes como no veneno botrópico (NOGUEIRA *et al* 2007b; NOGUEIRA e SAKATE, 2006; MOTTA, 2008; FLORIANO *et al.*, 2009).

Nos animais intoxicados pelo veneno botrópico, teve um aumento da IL-6 após 6 horas da inoculação mantendo esses valores até após 24 horas da inoculação, pois a reação inflamatória no local da inoculação é maior quando comparada com a do veneno crotálico (BARRAVIERA *et al*, 1995; MOTTA, 2008) Em comparação com o tratamento convencional, soro antiofídico polivalente e o extrato aquoso de *Mikania glomerata* não foram capazes de reduzir a produção dessa citocina no local da inoculação e concorda com Motta (2008) e Soares *et al.* (2005) que mostram que a terapia sistêmica não provoca muitos efeitos benéficos para as alterações locais como ocorrem nos animais acidentados com o veneno botrópico, pois animais intoxicados pelo veneno botrópico apresentam alterações na circulação sanguínea no local da picada dificultando a ação da terapêutica sistêmica.

Os animais intoxicados com o veneno crotálico tiveram uma menor produção de IFN- γ no homogenato da pata e sugere uma ação anti-inflamatória do veneno crotálico (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004). Os animais que foram intoxicados pelo veneno botrópico e receberam extrato de *Mikania glomerata* e soro antiofídico polivalente apresentaram uma queda na produção de IFN- γ , o que não foi observada quando esta foi quantificada no soro. Este fato pode estar relacionado com a ação anti-inflamatória do extrato da planta (*Mikania glomerata*) no local da inoculação (MAIORANO *et al.*, 2005, MOTTA, 2008).

A interleucina 1 β é a responsável junto ao TNF- α pela indução da resposta aguda à agressão tecidual (LAING *et al.*, 2003). Nos animais

intoxicados experimentalmente pelo veneno crotálico, não houve alteração na produção de IL-1 β no homogenato da pata, o que se pode sugerir uma ação anti-inflamatória do veneno crotálico e seu pequeno efeito no local da inoculação (BARRAVIERA, 1994b; BARRAVIERA *et al.*, 1995; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004).

Os animais que foram intoxicados pelo veneno botrópico apresentaram um aumento da produção de IL-1 β , o que pode estar relacionado com a ação proteolítica do veneno botrópico (ZAMUNER *et al.*, 2005; MOTTA, 2008). Os animais que receberam o tratamento convencional apresentaram este aumento seis horas (M2) e 24 horas (M3) após a inoculação e os animais que receberam extrato de *Mikania glomerata* e soro antiofídico polivalente apresentaram um aumento estatisticamente significativo apenas no momento M3. Este fato pode estar diretamente relacionado com a ação do extrato da planta que já mostrou, em alguns estudos, ter um potencial anti-inflamatório e assim reduz a produção de IL-1 β pois esta é uma das citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela resposta aguda frente a uma agressão tecidual (MOTTA, 2008; MAIORANO *et al.*, 2005).

6.3 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NA CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS BASAL E ESTIMULADAS COM CONCAVALINA A (CONA) E LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).

A habilidade dos linfócitos em responder a ligantes particulares *in vitro* faz da linfoproliferação uma ferramenta útil para o estudo da imunidade mediada por células (TAYLOR *et al.* 2004). Várias moléculas têm sido utilizadas como substitutas para o estímulo antígeno específico para células B e T. Entre as mais utilizadas estão as lectinas ou mitógenos. Os mitógenos são qualquer substância capaz de induzir divisão celular por mitose, também denominada de transformação blástica. Entre os mitógenos podem ser encontrados os produtos bacterianos como lipossacarídeo (LPS) que estimula preferencialmente células B. As lectinas são substâncias derivadas de plantas

que estimulam preferencialmente células T e entre elas está a Concanavalina A (Con-A) (ASHRAF et al., 2003)

Pelo fato de os linfócitos proliferarem, preferencialmente, em resposta a determinados antígenos, medidas de proliferação têm sido amplamente aplicadas na Imunologia Clínica. Ensaios de linfoproliferação são utilizados para descrever anormalidades associadas a toxinas, imunodeficiências congênitas, câncer, envelhecimento, doenças infecciosas, desnutrição, estresse, choque e doenças autoimunes bem como na pesquisa terapêutica de tais desordens (ASHRAF et al., 2003).

As culturas das células esplênicas dos animais do grupo VC no momento M2 que receberam o estímulo de Con-A foram estatisticamente menores ($p < 0,05$) do que o mesmo momento no grupo VCM, o que demonstra a ação da planta neutralizando a ação do veneno crotálico. Como este veneno tem uma ação anti-inflamatória e quando ele for inibido, pode-se avaliar uma produção superior de TNF- α (HOULT E PAYA, 1996; RANGEL-SANTO *et al.*, 2004; MAIORANO *et al.*, 2005).

A cultura de células esplênicas dos animais intoxicados com veneno botrópico apresentam um aumento na produção de TNF- α quando estimulada com CON-A. O grupo VB teve um aumento na produção de TNF- α no momento M1 enquanto o VBM teve o aumento na produção de TNF- α no momento M1 e M2. Os animais tratados com soro antiofídico e o extrato da planta *Mikania glomerata* começaram a receber o extrato da planta após duas horas da intoxicação totalizando três doses no momento M2. A ação da planta pode ter feito essa diferença sendo que o momento M2 do grupo VBM foi maior que no grupo que não recebeu o extrato da planta (VB). A planta possui como principal princípio ativo, a cumarina, que tem um potencial antiofídico fazendo a inibição de algumas substâncias encontradas no veneno botrópico (HOULT & PAYA, 1996; MAIORANO *et al.*, 2005, SOARES *et al.*, 2005).

O estímulo com Con-A foi efetivo para o aumento de produção de IL-10 quando usado para estimular a cultura de células esplênicas de animais intoxicados experimentalmente tanto com o veneno crotálico quanto com o veneno botrópico (ASHRAF et al., 2003). Quando avaliada a citocina anti-inflamatória IL-10 no sobrenadante da cultura de células esplênicas sem nenhum estímulo, foi observado que houve um valor estatisticamente menor no grupo que recebeu veneno crotálico e o tratamento com o extrato da planta *Mikania glomerata* no momento M2 e M3 quando comparado com o momento M1. Este fato significa uma maior ação anti-inflamatória tanto do veneno crotálico, com já foi relatada, como também da ação do extrato de *Mikania glomerata* (RANGEL-SANTO et al., 2004).

Os animais que receberam o veneno botrópico apresentaram uma menor produção de IL-10 em culturas que não receberam o estímulo de Con-A no momento M2 quando comparados com os momentos M1 e M3, o que pode ser explicado pela ação do veneno possuir efeito local maior do que os efeitos sistêmicos, assim, após 6 horas (M2), os animais estavam apenas sob a influência do extrato de *Mikania glomerata* onde ela acabou modulando a resposta da IL-10 nos animais que foram intoxicados com o veneno botrópico (SUYENAGA et al., 2002; MAIORANO et al., 2005).

Mesmo tendo uma ação anti-inflamatória, o veneno crotálico não foi eficaz em diminuir a produção de IL-6 e o tratamento com *Mikania glomerata*, que já foi relatada ter uma ação anti-inflamatória, não foi eficaz para impedir que fosse produzida essa citocina que age principalmente na fase aguda da inflamação (HOULT & PAYDT, 1996; RANGEL-SANTO et al., 2004).

Os animais que receberam o veneno botrópico e o tratamento com o extrato da planta mostraram uma menor significância em relação à produção de IL-6, o que pode estar relacionado à ação da planta que possui um potencial anti-inflamatória e assim, reduziu a produção dessa citocina que está relacionada à resposta inflamatória aguda (HEINRICH et al., 1990; EITNER et al., 1997; MAIORANO et al., 2005; ZAMUNER et al., 2005).

Nos animais que receberam o veneno botrópico, as cultura de células esplênicas estimuladas com LPS apresentaram um menor valor da IL-6 no momento M3 do grupo que foi tratado com o extrato de *M. glomerata*, o que pode representar um efeito do extrato sobre a ação do veneno levando a uma menor produção de IL-6 após 24 horas da inoculação, concordando assim com a ação das substâncias encontradas no extrato de *M. glomerata* (HOULT & PAYA, 1996; ZAMUNER et al., 2005; MAIORANO et al., 2005; SARTIM, 2010).

O IFN- γ quando dosado em culturas de células esplênicas sem estímulos apresentou uma queda em seus valores quando comparados os momentos em todos os grupos e subgrupos e isso pode ter influência do estresse desses animais, pois o IFN- γ tem sua produção alterada na presença de cortisol e este é liberado em situações de estresse (MEYER & SILVA, 1999).

A produção de IFN- γ induzida por Con-A permite avaliar a capacidade geral de produção desta citocina, pois esta lectina se liga às glicoproteínas da superfície dos linfócitos T, ativando-os de forma policlonal (PELIZON et al., 2007). Assim, tanto no grupo de animais que foram intoxicados com o veneno botrópico quanto com o crotálico e que a cultura de células esplênicas foram estimuladas com Con-A apresentaram um aumento na produção dessa citocina e quando avaliados os diferentes tratamentos, não houve diferença entre eles.

Os níveis basais de IL-1 β quantificados no sobrenadante das culturas de células esplênicas não se mostraram alterados em nenhum dos grupos experimentais quando comparados com o grupo controle e o mesmo ocorreu com as culturas que tiveram o estímulo com Con-A. Nas culturas de células esplênicas que receberam o estímulo de LPS, a produção de IL-1 β foi alterada mostrando uma maior produção, pois, TNF e LPS fazem a indução da produção da IL-1 β . Mesmo assim, as quantidades de IL-1 β não foram de relevância já que tem baixos níveis de células especializadas na expressão de IL-1 β na cultura de células esplênicas (MOREIRA, 2006, SARTIM, 2010).

Condições

7 – Conclusões

a) Veneno Botrópico + soro antiofídico (VB)

- a. Sem estímulo de produção de TNF- α quando quantificado no soro.
- b. Sem estímulo de produção de IL-10 quando quantificado no soro.
- c. Estimula produção de IL-6 quando quantificado no soro.
- d. Estimula a produção de IL-1 β quando quantificado no soro.
- e. Estimula produção de TNF- α local quando quantificado no homogenato.
- f. Não estimula produção de IL-10 local quando quantificado no homogenato.
- g. Estimula produção de IL-6 quando quantificado no homogenato.
- h. Estimula produção de IL-1 β quando quantificado na cultura de células esplênicas.
- i. Con-A estimula produção de TNF- α e IFN- γ
- j. LPS estimula produção de IL-6 e IL1 β

b) Veneno botrópico + soro antiofídico + *Mikania glomerata* (VBM)

- a. Estimula produção de TNF- α quando quantificado no soro.
- b. Diminui a produção de IL-6 quando quantificado no soro.
- c. Estimula a produção de IFN- γ quando quantificado no soro.
- d. Retarda a produção de IL1- β quando quantificado no homogenato.
- e. Diminui a produção de TNF- α quando quantificado na cultura de células esplênicas.

c) Veneno crotálico + soro antiofídico (VC)

- a. Não estimula produção de TNF- α quando quantificado no soro.

- b. Diminui a produção de IL-6 quando quantificado no soro e no homogenato. Diminui a produção de IFN- γ quando quantificado na cultura de células esplênicas.
- c. Con-A estimula a produção de TNF- α , IL-10 e IFN- γ

d) Veneno crotálico + soro antiofídico + *Mikania glomerata* (VCM)

- a. Aumenta a produção de IL-10 apenas 24 horas após a inoculação.
- b. Aumenta a produção de IFN- γ

Referências

8 – Referências¹

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia celular e molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 576p.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; PEDROSA, T.M.G.O.A.; DA SILVA, O.A.; PEDROSO, E.R.P. Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 30, p.288-292, 1988.

ASHRAF, M.T.; KHAN, R.H. Mitogenic lectins. *Med. Sci. Monitor*, v. 9, p. 265-269, 2003.

ÁVILA-AGÜERO, M. L. PARÍS, M.M.; HU, S.; PETERSON, P.K.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; FAINGEZICHT, I. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr. Emerg. Care*, v.17, n. 6, p.425-429, 2001a.

AVILA-AGÜERO, M.L.; PARÍS, M.M.; HU, S.; PETERSON, P.K.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; FAINGEZICHT, I. Snakebite Study Group. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr. Emerg. Care.*, v. 17, p. 425-429, 2001b.

AZEVEDO MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, v.23, p.631-636, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. *Medicina*, v.36, p.480-489, 2003

BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B.; TARKKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 1, p. 1-11, 1995.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bras. Med.*, v.64, p.14-20, 1990.
- BARRAVIERA, B. As reações da fase aguda nos acidentes ofídicos. In: _____. *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: EPUC, 1994b. p.91-96.
- BARRAVIERA, B.; PERAÇOLI, M.T.S. Soroterapia heteróloga. In: BARRAVIERA, B. *Venenos Animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: EPUC, 1994a. p.361-372.
- BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with Bothrops atrox venom. *Mediat. Inflamm.*, v. 7, p. 339-346, 1998.
- BELLAIRS, A.D.A.; UNDERWOOD, G. The origin of snakes. *Biol. Rev.*, v.26, p.193-237, 1951.
- BELLUOMINI, H.E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, v.12, p.82-96, 1984.
- BICUDO, P.L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In: BARRAVIERA, B. *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p.375-387.
- BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas Reumatol. Clin.*, v. 8, n.2, 2007.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cad. Saúde Pública*, v. 19, n.1, p. 7- 16, 2003.
- BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Histologic and functional renal alterations caused by Bothrops moojeni snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 61, n.5, p. 698-706, 1999.
- BOGDAN, C.; PAIK, J.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. *J. Biol. Chem.*, v.32, p.23302-23308, 1992.

BONTA, I.L.; VARGAFTIG, B.B.; BOHM, G.M., Snake venoms as a experimental tool to induce and study models of micro-vessel damage. In: _____. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin: Springer, 1978, p.629-683.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de diagnósticos e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, 1998, 131p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de diagnósticos e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. 3ed. Brasília, 2005, 131p.

BRASIL. Secretaria de vigilância em saúde – SVS. Casos de acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Brasília, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_mes_2008.ppd> Acesso em: 20 mar. 2009.

BURDMANN, E.A.; WORONIK, V.; PRADO, E.B.A.; ABDULKADER, R.C.; SALDANHA, L.B.; BARRETO, O.C.O.; MARCONDES, M. Snake-bite induced acute renal failure: an experimental model. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.48, n.1, p.82-88, 1993.

CAMPLESI, A.C. Uso de antiinflamatórios COX-2 seletivos em ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar. 2010 20f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S; HADDAD, JR.V. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier/FAPESP, 2003.

CARNEIRO, A.S.; RIBEIRO, O.R.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.H.K.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O.M.; STAROBINASET, N. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*, v.40, p. 1571–1579, 2002.

CASTRO, I. Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal. *O Mundo da Saúde*, v. 30, n.4, p.644-653, 2006.

- CHENG, M.; NGUYEN, M.; FANTUZZI, G.; KOH, T.J. Endogenous interferon- γ is required for efficient skeletal muscle regeneration *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* v. 294, n.5, p.1183-1191, 2008.
- CLISSA, P.B. *Caracterização do efeito da jararagina sobre a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino*. 2002. 110f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, v.420, n.6917, p.885-891, 2002.
- CONTRAN, R.S. Patologia celular II: adaptações, acúmulos intracelulares e envelhecimento celular. In:_____. *Robbins. Patologia estrutural e funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2000. p.37-38.
- COSTA, P.L.; DE LIMA, G.E.; LAURE, C.J. Rattlesnake venom: Action upon erythrocytes and leucocytes of rats. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, v. 39, p.359-73. 1989
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1. In: THOMSON, A. *The cytokine handbook*. 3. ed. California: Academic Press, 1998, p.35-72.
- EITNER, F.; WESTERHUIS, R.; BURG, M.; WEINHOLD, B.; GRONE, H.J.; OSTENDORF, T.; RUTHER, U.; KOCH, K.M.; REES, A.J.; FLOEGE, J. Role of interleukin-6 in mediating mesangial cell proliferation and matrix production in vivo. *Kidney Int.* v.51, p.69-78, 1997.
- ESCOCARD, R.C.M.; KANASHIRO, M.M.; PETRETSKI, J.H.; AZEVEDO-SILVA, J.; QUEIROZ DE CARVALHO, E.C.; DA SILVA W.D.; KIPNIS, T.L. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiology*, v.211, p. 37–46, 2006.
- FEGHALI, C.A.; WRIGHT, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosc.*; v. 2, p. 2-26, 1997.

- FENWICK, A.M.; GUTBERLET, JR.R.L.; JENNAFER, A.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. v.156, p.617–40, 2009.
- FERREIRA JUNIOR, R.S.; BARRAVIERA, B. Management of venomous snakebites in dogs and cats in Brazil. *J. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v.10, n.2, p.112-132, 2004.
- FLORIANO, R.S.; NOGUEIRA, R. B.; SAKATE, M.; LAPOSY, C.B.; MOTTA, Y. P.; SANGIORGIO, F.; DAVID, H.; NABAS, J.M. Effect of Mikania glomerata leaf aqueous extract associated with anti-snake venom serum on experimental *Crotalus durissus terrificus* envenomation in rats. *Inter. J. Trop. Biol. Conserv.* v. 57, n.4, p.929-937, 2009.
- GADIANT, R.A.; PATTERSON, P.H. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells*, v. 17, p. 127-137, 1999.
- GASPARETTO, J.C.; CAMPOS, F.R.; BUDEL, J.M.; PONTAROLO, R. Mikania glomerata Spreng. and M. laevigata Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: Agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.20, p.627-640, 2010.
- GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, v. 82, p. 841-850, 2000.
- HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.*, v.265, p.621–636, 1990.
- HIRANO, T. The biology of interleukin-6. *Chem. Immunol.*, v. 51, p.153-182, 1992.
- HIRANO, T.; AKIRA, S.; KISHIMOTO, T. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol.Today*, v.11, p.443-449, 1990.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L., SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, p.1027–1031, 2002.

HOULT, J. R. S.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* v. 27, p. 713–722, 1996

HOPKINS, S.J. The pathophysiological role of cytokines. *Leg. Med.*, v.5, p45–57, 2003.

HOUSE, R.V. Theory and practice of cytokine assessment in immunotoxicology. *Methods*, v.19, p. 17-27, 1999.

HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments-Part II. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.17, p.1035- 1040, 1995.

JIM, J.; SAKATE, M. Biologia das serpentes. In: BARRAVIERA, B. *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p.109-134.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.36, p.66-77, 1992.

LAING, G.D.; CLISSA, P.B.; THEAKSTON, R.D.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; TAYLOR, M.J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *Eur. J. Immunol.*, v.33, n.12, p. 3458-3463, 2003.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of oedema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, v.17, p. 93–105, 1992.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, v.17, p.93-105, 1993.

- LUNA, K.P.O.; DA SILVA, M.B.; PEREIRA, V.R.A. Clinical and immunological aspects of envenomations by *Bothrops* snakes. *The Journal of Venomous Anim. Toxins includ. Trop. Dis.* v.17, n. 2, p.130-141. 2011a
- LUNA, K.P.O.; MELO, C.M.L.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, A.O.; PEREIRA, V.R.A. *Bothrops erythromelas* snake venom induces a proinflammatory response in mice splenocytes. *Int J Interf Cytok Mediator Res.*, n.3 p.9-18, 2011b.
- MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F.; REZENDE, N.A.D.; AMARAL, C.F.S. Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.28, p.228-233, 1986.
- MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.; COUTO, L.B.; GOMESD, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA, P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J. Ethnopharmacol.*, v.102, p.364–370, 2005.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, v.36, n.12, p.1749-1800, 1998.
- MEYER, T.N.; SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. *Rev. Assoc. Med. Bras.*; v.45, n.2, p.181-188, 1999.
- MORS, W.B. Plants active against snake bite. *Econ. Med. Plant Res.*, v.5, p.352–382, 1991.
- MOTTA, Y.P. Aspectos clínico, laboratorial e histopatológico da intoxicação experimental pelos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar tratados com antiveneno e *Mikania glomerata*. 2008. 238f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Botucatu, 2008.
- MOTTA, Y.P.; SAKATE, M.; NOGUEIRA, R.M.B.; FLORIANO, R.S.; LAPOSY, C.B.L.; SANCHES, O.; CAMPRESI, A.C. Avaliações clínica, laboratorial e histopatológica da intoxicação experimental por veneno da serpente *Bothrops jararaca* em ratos wistar e tratados com antiveneno e *Mikania glomerata*. *Rev. Bras. Toxicol.*, v.20. p.87, 2009.

- MOTTA, Y.P.; SAKATE, M.; NOGUEIRA, R.M.B.; SANCHES, O.C.; SANGIORGIO, F.; FUKUI, R.; DAVID, H. Avaliação histopatológicas do rim e da musculatura em ratos wistar intoxicados experimentalmente com venenos botrópico e crotálico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 15. 2007, Búzios. *Rev. Bras. Toxicol.*, v.20. p.87, 2007.
- MOURA DA SILVA, A.M.; LAING, G.D.; PAINE, M.J.; DENNISON, J.M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur. J. Immunol.*, v.26, n.9, p.2000-2005, 1996.
- MOREIRA, P.R.S. *Efeito do estresse crônico na Linfoproliferação e produção in vitro de IFN-gama e IL-10 por células do baço e timo de ratos hipotireoidianos*. 2006. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.
- NALON, M.A.; RÚBIO, G.B.G.; DA SILVA, E.M.; LEITE, J.C.M.; Influências das alterações ambientais na epidemiologia dos acidentes ofídicos e na distribuição geográfica das serpentes de importância médica nos estados de São Paulo e Paraná, 1988-1997. *Inf. Epidemiol. SUS*, v.11, n.1, p.45-47, 2002.
- NETEA, M.G.; VAN DER MEER, A.W.M.; DEUREN, M.V.; KULLBERG, B.J. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.*, v.24, n.5, p.254-258, 2003.
- NEVES, L.J.; SÁ, M.F.A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais *Mikania glomerata* Spreng. *Rev. Bras. Farm.*, v.71, n.2, p.42-47, 1991.
- NISHIOKA, A.S.; JORGE, M.T.; SILVEIRA, P.V.P. South American rattlesnake bite and soft-tissue infection: report of a case. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33, n.4, p.401-402, 2000.
- NOBLE, G.K.; SCHMIDT, A. The structure function on the facial and labial pits of snakes. *Proc. Am. Philos. Soc.*, v.77, p.263-288, 1937.
- NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M. Clinical and hematological alterations in dogs during experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom and treated with antiophidic serum. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v.12, n.2, p.285-296, 2006.

- NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M.; SANGIORGIO, F.; LAPOSY, C.B.; MELERO, M. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum-Part I: clinical evaluation, hematology and myelogram. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v.13, n.4, p.800-810, 2007a.
- NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M.; SANGIORGIO, F.; LAPOSY, C.B.; TOSTES, R.A. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum-Part II: laboratory aspects, electrocardiogram and histopathology. *J. venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v.13, n.4 p.811-810, 2007b.
- OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Interleukin 10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an antiinflammatory drugs. *Crit. Care Med.*,v.30, p.58-63, 2002.
- OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, v.20, n.2, p.169-183, 1984.
- OLIVEIRA, R.B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE. M.T. Fatores associados à incoagulabilidade sangüínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* (Risk factors associated with coagulation abnormalities in *Bothrops* envenoming). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.36, n.6, p.657-663, 2003.
- OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia* v.61, n.2, 2011.
- OSWALD, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; JAMES, S.L IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.*, v.148, p.3578-3582, 1992.
- PELIZON, A.C.; DENADAI, B.; SCHIAVON, E.V.; MARTINS, D.R.; ZORZELLA, S.F.G.1; SARTORI, A. Produção deficiente de citocinas Th1 em camundongos BALB/c jovens. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.2, p.171-176, 2007.

- PETERSON, M.E. Snake bite: North American Pit Vipers In: PETERSON, M.E.; TALCOTT, P.A. *Small animal toxicology*. 2.ed. St. Louis: Saunders/Elsevier, 2006. p.1017-1038.
- PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ, J.M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*, v. 38, p. 1253-1266, 2000.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.47, n.1, p. 2-13, 2001.
- RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, A.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D.F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, v. 44, p.609-616, 2004.
- RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, n.6, p. 475-480, 1997.
- ROSENFELD, G.; KELEN, E.M.A.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. I. Classification in different types and activities. *Mem. Inst. Butantan*, v. 30, p.103-116, 1960-62.
- SAKATE, M. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.523-555.
- SAKATE, M.; NOGUEIRA, R.M.B.; ANDRADE, S.F. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.611-646.
- SANGIORGIO, F.; SAKATE, M.; NOGUEIRA, R.M.B.; TOSTES, R.A. Histopathology evaluation in experimental envenomation of dogs with *Crotalus durissus terrificus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v.14, n.1, p.82-99, 2008.
- SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thromb. Haemost.*, v.92, p.369-383, 2008.

- SARTIM, M.A. *Avaliação do envolvimento da Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolada da peçonha de Bothrops atrox, no processo inflamatório*. 2010. 106f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- SITPRIJAA, V.; SUTEPARAKB, S. Animal toxins: an overview. *Asian Biomedicine*, v. 2 n. 6, p.451-457, 2008.
- SOARES, A.M.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENCO, M.V.; PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P.S. Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms. *Drugs of the Future*, v.29, p.1105–1117, 2004.
- SOARES, A.M.; TICLI, F.K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S. Medicinal Plants with inhibitory properties against snake venoms. *Curr. Med. Chem.*, v. 12, p.20, 2005.
- SOUZA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnake inhibits macrophage mediator. *Inflammation*. v.5, p.18–23, 1996.
- SPADACCI-MORENA, D.D.; TOMY, S.C.; SANO-MARTINS, I.S.; KATZ, S.G. The effect of experimental *Bothrops jararaca* envenomation on pregnant mice. *Toxicon*, v.47, p.196–207, 2006.
- SPATE, U.; SCHULZE, P.C. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. v.7, p.265-269, 2004.
- SUYENAGA, E.S.; RECHE, E.; FARIAS, F.M.; SCHAPOVAL, E.E.; CHAVES, C.G.; HENRIQUES, A.T. Anti-inflammatory investigation of some species of Mikania. *Phytoter Res* v.16, p. 519-523, 2002.
- SUWA, T.; HOGG, J.C.; QUINLAN, K.B.; VAN EEDEN, S.F. The effect of interleukin-6 on L-selectin levels on polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v.283, p.879– 884, 2002.

- TAKAHIRA, R.K. *Perfil hematológico, hemostático, bioquímico e histopatológico do envenenamento experimental de cães por Bothrops alternatus Duméril, 1854 e Bothrops moojeni Hoge, 1966*. 1999. 195f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.
- TAYLOR, G.A.; FENG, C.G.; SHER, A. P47 gpases: reulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. / Immunol.*, v. 4, p.100-109, 2004.
- TEIXEIRA, C., CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLOB, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*, v.54, n.7, p.988-997, 2009.
- TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.26, n.2 p.55-68, 2006.
- ULLOA, L.; TRACEY, K.J. The 'cytokine profile': a code for sepsis. *Trends Mol Med*, v.11, p.56-63, 2005.
- VASSALI, P.A. The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annu. Rev. Immunol.*, v.10, p.411-452, 1992.
- VENEZIANI, R.C.S.; CAMILO, D.; OLIVEIRA, R.; Constituents of Mikania glomerata Sprengel. *Biochem. Syst. Ecol.* v.27, p.99–102, 1999.
- VIEIRA, D.F.; WATANABE, L.; SANT´ANA, C.D.; MARCUSSI, S.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K. Purification and Characterization of Jararassin-I, A Thrombin-like Enzyme from *Bothrops jararaca* Snake Venom. *Acta Biochim.Biophys. Sin.*, v.36, n.12, p.798–802, 2004.
- VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American Rattlesnake Venom. *J. Formos. Med. Assoc.*, v.71, p.394-400, 1972.
- VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.26, p.212-218, 1980.

WEN, F.H.; CARDOSO, J.L.C.; MALAQUE, C.M.S.; FRANÇA, F.O.S.; SANT'ANNA, S.S.; FERNANDES, W.; FURTADO, M.F.; FRANCO, F.; ALBUQUERQUE, M.J.; KRONCA, F.J.; NALON, M.A.; RÚBIO; G.B.G.; DA SILVA, E.M.; LEITE, J.C.M. Influências das alterações ambientais na epidemiologia dos acidentes ofídicos e na distribuição geográfica das serpentes de importância médica nos estados de São Paulo e Paraná, 1988-1997. *Inf. Epidemiol. SUS*, v.11, n.1 p.45-47, 2002.

ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammation induced by Bothrops asper venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*, v.46, p. 806-813, 2005.

Anexo

ATESTADO

Atestamos, para os devidos fins, que o Projeto "**Quantificação de citocinas na intoxicação experimental com veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* em ratos *Wistar* tratados com soroterapia e *Mikania glomerata***", Protocolo nº 88/2006-CEUA, de **Yudney Pereira da Motta**, aluno(a) do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível Doutorado desta Faculdade está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEUA, desta Faculdade na data de 21/09/2006.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 07 de dezembro de 2010.



Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Trabalhos científicos

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins.

Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Reprodução de artigos publicados: A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os

trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract. Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma.

esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão .jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de publicação

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente trabalhos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

1 **Quantificação de citocinas no soro na intoxicação experimental com**
2 **veneno de *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos**
3 **wistar tratados com soroterapia e *Mikania glomerata*.**

4 [Quantification of cytokines in serum of experimental intoxication for venom of the
5 *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* in Wistar rats is treated with
6 antivenom and *Mikania glomerata*.]

7 Yudney Pereira da Motta^{1*}; Michiko Sakate¹; Rosa Maria Barilli Nogueira²; Maria Terezinha Serrão
8 Peraçoli³; Rafael Stuani Floriano²; Erika Nakaira Takahagi³

9 1 Faculdade de medicina veterinária e zootecnia- FMVZ-UNESP – Botucatu, SP

10 2 Faculdade de Ciências Agrárias – UNOESTE – Presidente Prudente

11 3 Instituto de Biociência de Botucatu – UNESP - Botucatu, SP

12 * Autor: Universidade Estadual Centro-Oeste – UNICENTRO/Guarapuava-PR, Departamento de
13 Medicina Veterinária Rua: Simeão Varella de Sá, N.3. Guarapuava-PR. CEP: 85040-080 e-mail:
14 yudney@gmail.com

15
16
17 **RESUMO**

18 O presente projeto teve como objetivo quantificar os níveis de citocinas pró-
19 inflamatórias, entre estas TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6 e anti-inflamatórias
20 como IL-10 e INF- γ e comparar o efeito do tratamento convencional com o efeito do
21 tratamento complementado pelo extrato da planta *Mikania glomerata* na intoxicação
22 experimental por *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*. Foram usados
23 ratos Wistar divididos em 5 grupos: C – controle, VC - veneno crotálico + soro
24 antifídico, VB – veneno botrópico + soro antiofídico, VCM - veneno crotálico + soro
25 antiofídico + *Mikania glomerata* e VBM - veneno botrópico + soro antiofídico +
26 *Mikania glomerata*. As citocinas foram quantificadas no soro desses animais pelo teste
27 de ELISA em três momentos (M1- 30 minutos, M2- seis horas e M3- 24 horas após a
28 inoculação do veneno). A intoxicação por venenos botrópico e crotálico estimularam
29 principalmente a produção de IL-6 no soro de animais experimentalmente intoxicados.
30 O tratamento complementar com o extrato da planta *Mikania glomerata* teve influencia
31 principalmente na produção de IL-6, IL-10 e IFN- γ . São necessários novos estudos com
32 o extrato de *Mikania glomerata* para que possa entender a ação desta planta sobre a
33 intoxicações crotálica e botrópica e também verificar qual a melhor via para administrá-
34 lo.

35

36 **Palavras-chaves:** *Bothropoides jararaca*; *Crotalus durissus terrificus*; *Mikania*
37 *glomerata*; Ratos Wistar; citocinas

38 **ABSTRACT**

39 This experiment aimed to quantify the pro-inflammatory cytokine levels, including
40 TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 as well as the anti-inflammatory ones such as
41 IL-10 and INF- γ . It was also our objective to compare the effect of the conventional
42 treatment to one of the treatment in which it was added the *Mikania glomerata* plant in
43 the experimental intoxication using *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus*
44 *terrificus* venom. It was used Wistar rats that were randomly divided into 5 groups: C –
45 control, VC – Crotalus venom + antivenom serum, VB – Bothrops venom + antivenom
46 serum, VCM - Crotalus venom + antivenom serum + *Mikania glomerata* and VBM -
47 Bothrops venom + antivenom serum + *Mikania glomerata*. Cytokines were quantified
48 in the serum, paw homogenates, and spleen cell culture by using ELISA test in three
49 different moments (M1- 30 minutes, M2- 6 hours and M3- 24 hours after venom
50 injection). The intoxication by *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus terrificus*
51 venoms mainly stimulated the production of IL-6 in the serum of animals
52 experimentally intoxicated. Adjunctive treatment with the extract of the plant *Mikania*
53 *glomerata* was mainly influences in the production of IL-6, IL-10 and INF- γ . Further
54 research with the extract of *Mikania glomerata* in order to understand the action of this
55 plant on the *Bothropoides* and *Crotalus durissus* poisoning and also check what is the
56 best way to manage it.

57 **Keywords:** *Bothrops jararaca*; *Crotalus durissus terrificus*; *Mikania glomerata*; Wistar
58 rats; cytokine

59

60 **INTRODUÇÃO**

61 Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública em
62 países tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que
63 ocasionam (Pinho e Pereira, 2001).

64 O número de notificações de ofidismo tem aumentado consideravelmente desde
65 2001, alcançando o maior índice em 2005. Desde então vem apresentando

66 decréscimo, com registro de 26.156 acidentes em 2008, correspondendo à incidência
67 de 13,8 casos por 100.000 habitantes no Brasil, a menor desde 2005 (Brasil, 2008).

68 Assim, dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas, verifica-se o predomínio
69 do acidente botrópico, que corresponde a 87,5% dos casos ofídicos notificados no
70 país, seguidos pelo crotálico 9,2%, laquélico 2,7% e elapídico 0,6%, com pequenas
71 variações de acordo com a região e distribuição geográficas das serpentes (Brasil,
72 2005).

73 O gênero *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca) representa o grupo
74 mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em
75 todo território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*,
76 *Bothropoides* e *Rhinocerothis*) (Brasil, 2001, Wen et al., 2002, Fenwick et al.,
77 2009). O veneno botrópico possui ações coagulante, proteolítica e vasculotóxica
78 (Oliveira et al., 2003). É uma mistura complexa de metaloproteinasas (toxinas
79 hemorrágicas - jararagina), fosfolipase A2 (miotoxina), serino-proteases (enzimas
80 tipo trombina) e peptídeos que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina
81 (Clissa, 2002).

82 A serpente *Crotalus durissus* é considerada de grande importância devido ao
83 quadro clínico grave que provoca, na maioria das vezes fatal quando o tratamento
84 específico não é instituído rapidamente (BARRAVIERA, 1990; BICUDO, 1994,
85 NOGUEIRA E SAKATE, 2006). O veneno crotálico é considerado de maior
86 toxicidade em relação ao gênero *Bothrops* (BELLUOMINI, 1984) e possui três ações
87 principais: neurotóxica (VITAL BRAZIL, 1972; 1980), miotóxica (AZEVEDO
88 MARQUES et al., 1985) e coagulante (AMARAL et al., 1988) além de uma ação
89 hemolítica “in vitro” (ROSENFELD et al., 1960-62). O veneno de *Crotalus* induz
90 uma série complexa de eventos inflamatórios concomitantes, com considerável lesão
91 tecidual (BONTA et al., 1978, HIRANO et al., 1990). Entretanto, os conhecimentos
92 sobre a patogenia dessa resposta inflamatória ainda são limitados (SANGIORGIO et
93 al., 2008).

94 As citocinas são polipeptídeos produzidos principalmente por linfócitos
95 ativados e macrófagos, que modulam a função de outros tipos celulares. Estão
96 envolvidas nas respostas imunológicas e apresentam efeitos importantes na resposta
97 inflamatória, sendo a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF-
98 α) e interleucina 8 (IL-8), as principais mediadoras da inflamação. A liberação

99 dessas citocinas pode ser estimulada por endotoxina, imunocomplexos, toxinas,
100 trauma físico, entre outros processos. Exercem seus efeitos de três diferentes
101 maneiras: atuando sobre a própria célula que as produz (efeito autócrino), sobre
102 células vizinhas (efeito parácrino), ou a nível sistêmico (efeito endócrino), sendo
103 suas principais células alvo, as células endoteliais, leucócitos e fibroblastos. A IL-1,
104 TNF- α e IL-6 estimulam respostas sistêmicas de fase aguda associadas à infecção ou
105 à agressão, causando sinais clínicos como febre e sedação, além de provocarem a
106 liberação de neutrófilos, hormônio adrenocorticotrófico e corticosteróides para
107 circulação (Contran, 2000). A IL-10 possui ação antiinflamatória, sendo capaz de
108 diminuir a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 (Oswald et al., 1992; Bogdan et
109 al., 1992).

110 A produção de citocinas tem sido descrita em modelos experimentais e em
111 vítimas de acidentes botrópicos e crotálicos (Lomonte et al., 1993; Barravieira et al.
112 1995; Barros et al. 1998 e Petricevich et al.,2000). Porém, poucas evidências sobre o
113 envolvimento direto das citocinas na inflamação ocasionada pela intoxicação
114 crotálica estão disponíveis na literatura. Uma melhor compreensão da resposta
115 inflamatória que ocorre nos acidentes ofídicos pode levar ao desenvolvimento de
116 novas estratégias terapêuticas para auxiliar na recuperação desses pacientes (Ávila-
117 Agüero et al., 2001).

118 Os extratos vegetais constituem uma alternativa para tratamento de ofidismo, e
119 exibem uma diversidade grande de combinações químicas com várias atividades
120 farmacológicas de interesse médico-científico. Um número grande de extratos
121 mostrou boas atividades antivenenos (Soares et al., 2004).

122 Em muitos países, extratos vegetais têm sido tradicionalmente utilizados no
123 tratamento de acidentes ofídicos (Mors,1991). O extrato de plantas com propriedades
124 antiofídicas é muitas vezes a única opção em comunidades sem acesso à soroterapia.
125 A planta *Mikania glomerata* tem se mostrado eficaz na neutralização de muitos dos
126 efeitos tóxicos dos venenos botrópico e crotálico (Maiorano et al.,2005).

127 A alta incidência de casos de acidentes ofídicos, as desvantagens do uso da
128 soroterapia como o único tratamento contra os acidentes ofídicos, a existência de
129 poucos trabalhos sobre o efeito do tratamento de intoxicações ofídicas com a planta
130 *Mikania glomerata* em relação a produção de citocinas no soro de ratos Wistar,
131 sustentam a proposta do presente estudo em avaliar a produção de citocinas pró-

132 inflamatórias e anti-inflamatórias na intoxicação experimental pelos veneno da serpente
133 *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar e tratados com
134 soro antiofídico e extrato de *Mikania glomerata*.

135

136

137 MATERIAL E MÉTODOS

138 Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, de dois meses de idade e peso corporal
139 entre 230 e 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas no biotério
140 de experimentação, em ambiente com controle de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura
141 constante (25°C), umidade do ar de 55-65%, tempo de exaustão de 10 trocas de ar da
142 sala/hora, recebendo dieta padrão para animais de laboratório (Purina[®]) e água *ad*
143 *libitum*. Os animais foram divididos em 3 grupos (G) experimentais: G1- controle; G2-
144 inoculação de 10 mg/kg de veneno botrópico + soro antiofídico (Vencofarma[®]) na dose
145 recomendada pelo fabricante para neutralizar a quantidade inoculada em cada rato e o
146 G3- inoculação de 10 mg/kg de veneno botrópico + soro antiofídico (Vencofarma[®]) na
147 dose recomendada pelo fabricante para neutralizar a quantidade inoculada em cada rato
148 + extrato de *Mikania glomerata* 10% no volume de 1 mL, no intervalo de 2 horas, com
149 três repetições após a inoculação do veneno. Cada grupo foi avaliado em três
150 momentos: M1 30 minutos após a inoculação do veneno, M2 seis horas após a
151 inoculação do veneno e M3, 24 horas após a inoculação do veneno.

152 Para cada momento, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico na dose de 50
153 mg/kg, por via intraperitoneal, e o sangue foi coletado pela punção cardíaca usando
154 sistema a vácuo (Vacutainer Systems[®]). As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm
155 durante 10 minutos e os soros estocados a -20°C para posterior dosagem das citocinas.

156 Para a quantificação das citocinas no soro dos animais utilizados nesse
157 experimento, foi utilizado o teste de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
158 usando o Kit comercial da R&D Systems (Minneapolis, Minn, E.U.A.) de acordo com
159 as instruções do fabricante.

160 Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para amostras
161 dependentes, empregando-se o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego,
162 Califórnia, USA, 2000. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

164 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

165 Não houve alterações significantes na quantidade de TNF- α presente no soro, o que
166 também foi observado em soro de pacientes humanos que sofreram picadas por
167 serpentes *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* mesmo sendo
168 comprovada a sua produção no local da picada (Lomente et al. 1993, Barraviera et al.,
169 1995 Carneiro et al., 2002).

170 O animais experimentalmente intoxicados com o veneno botrópico e tratados com o
171 extrato de *M. glomerata* tiveram uma maior produção de TNF- α após 24 horas da
172 inoculação, o que caracteriza estímulo sistêmico da planta na produção dessa
173 interleucina pró-inflamatória, o que deve ser melhor investigado pois a planta tem um
174 potencial anti-inflamatório em que se esperava uma redução na quantificação desta
175 citocina (Gasparetto et al., 2010).

176 A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e a sua produção por macrófagos e
177 monócitos faz com que haja a diminuição de citocinas pró-inflamatoria (Rangel-Santos
178 et al., 2004, Oberholzer et al., 2002, Sitprija e Suteparak, 2008). Sua liberação já foi
179 observada em alguns trabalhos e em pacientes que sofreram intoxicação por veneno das
180 serpentes *Bothrops* e *Crotalus durissus* (Rangel-Santos et al., 2004,).

181 Nesse trabalho, não houve alterações significantes na produção de IL-10 quando
182 foram quantificadas no soro de ratos Wistar intoxicados pelos venenos de *Bothropoides*
183 *jararaca*. Os animais que receberam o veneno crotálico e tratados com soro antiofídico
184 e *M. glomerata* apresentaram uma menor produção dessa citocina após 24 horas da
185 inoculação do veneno, o que diretamente pode estar relacionada com a ação anti-
186 inflamatória do veneno crotálico e do extrato de *M. glomerata* (Rangel-Santos et al.,
187 2004, Motta et al., 2009, Luna et al., 2011b).

188 Os valores de IL-6 (Tab. 1) nos animais que receberam o veneno crotálico e apenas
189 com o tratamento com soroterapia tiveram um valor menor após 24 horas da inoculação
190 quando comparados com o momento M1 do mesmo grupo e o momento M3 do grupo
191 controle, o que pode estar relacionado com a ação anti-inflamatória do veneno, já foi
192 relatada por alguns autores, fazendo com que tenha uma menor produção desta citocina
193 pró-inflamatória (Souza e Silva et al.1996, Rangel-Santos et al. 2004).

194 O aumento da IL-6 em pacientes ou animais intoxicados pelas serpentes do gênero
 195 Bothropoides (tab.1) após 6 horas do acidente ou inoculação como foi observado nesse
 196 trabalho, concorda com a literatura onde existem relatos desse aumento em pacientes ou
 197 animais de experimentação intoxicados com veneno botrópico (Lomente et al. 1993,
 198 Ávila-Aguero et al., 2001b, Laing et al. 2003; Escocard et al. 2006; Luna et al., 2011a;
 199 Luna et al., 2011b).

200 **Tabela 1** – Valores médios e desvio padrão de interleucina 6 (IL-6) no soro de ratos
 201 intoxicados com venenos crotálico e botrópico tratados com soro antiofídico e *Mikania*
 202 *glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	57,292 (3,925)Aa	73,785 (14,893) Aa	74,560 (14,507)Aa
6 horas (M2)	56,944 (2,882)Ab	64,815 (3,191) ABa	65,972 (3,511) Aa
24 horas (M3)	57,870 (2,714)Aa	56,906 (5,829) Ba	71,759 (10,481) Aa
	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	57,292 (3,925)Aa	62,500 (5,510) Ca	62,237 (5,311) Ba
6 horas (M2)	56,944 (2,882)Ab	81,019 (5,575)Bb	208,06 (106,90) Aa
24 horas (M3)	57,870 (2,714)Ab	260,17 (80,193)Aa	65,972 (7,429) Bb

203 Resultados A = coluna dentro do mesmo grupo; a = linha, mesmo momento em grupos
 204 diferentes e () desvio padrão.

205 O aumento dos níveis de IL-6 em resposta à inoculação do veneno foi associado
 206 com o início da regeneração muscular. O efeito desta citocina provoca migração de
 207 neutrófilos para os tecidos e ativa a maturação destes e regula moléculas de adesão das
 208 células endoteliais envolvidas na adesão de leucócitos ao endotélio (Suwa et al., 2002;
 209 Texeira et al., 2009). No momento M3 do grupo que recebeu o tratamento
 210 complementar com o extrato da planta, foi observada a volta à normalidade da IL-6
 211 quando comparado com o grupo controle, o que pode estar relacionado com o potencial
 212 anti-inflamatório do extrato de *Mikania glomerata* (Holetz et al. 2002, Maiorano et al.
 213 2005, Motta et al. 2009).

214 O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória presente principalmente nas lesões de
 215 músculo esquelético e promovendo a regeneração das fibras musculares (Cheng et al.,
 216 2008). O grupo intoxicado com veneno crotálico e tratado com soro antiofídico e

217 *Mikania glomerata* apresentou um aumento marcante do IFN- γ no momento 24 horas
 218 após a inoculação do veneno. O mesmo aconteceu com o grupo que recebeu o veneno
 219 botrópico e tratado com soro antiofídico e *Mikania glomerata*, o que leva a acreditar
 220 que o extrato da planta aumenta a produção de IFN- γ sendo mais eficaz para a
 221 regeneração das fibras musculares após os acidentes ofídico por esses gêneros de
 222 serpentes.

223 Motta (2008) e Floriano et al. (2009) observaram, por meio de exame
 224 histopatológico da musculatura do local da inoculação do veneno, redução da gravidade
 225 das lesões de animais tratados com o extrato de *Mikania glomerata*.

226 **Tabela 2** – Valores médios e desvio padrão de interferon gama (IFN- γ) no soro de ratos
 227 intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata*
 228 (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos (M1)	20,399 (4,238) Aa	23,980 (2,291) Aa	20,399 (4,238) Ba
6 horas (M2)	20,920 (1,692) Aa	22,280 (2,291) Aa	25,434 (2,872) Ba
24 horas (M3)	24,479 (2,349) Ab	21,918 (1,1018) Ab	220,53 (61,717) Aa
	C	VB	VBM
30 minutos (M1)	20,399 (4,238) Aa	24,089 (3,640)Aa	24,089 (3,640)Ba
6 horas (M2)	20,920 (1,692) Aa	24,913 (2,095)Aa	25,463 (2,291)Ba
24 horas (M3)	24,479 (2,349) Ab	31,250 (3,508)Ab	121,77 (9,649)Aa

229 Resultados A = coluna dentro do mesmo grupo; a = linha, mesmo momento em grupos
 230 diferentes e () desvio padrão.

231 Muitos autores relatam o aumento da concentração de IL-1 β após o acidente ofídico
 232 ou em intoxicações experimentais. Neste trabalho, só foi observado o aumento após a
 233 inoculação do veneno botrópico o que pode ser explicado pelo maior efeito deste
 234 veneno no local da inoculação ou picada. O veneno botrópico tem uma ação proteolítica
 235 e causa degeneração, necrose e infiltrado inflamatório principalmente de células
 236 polimorfonucleares levando assim a produção de citocinas e estas posteriormente são
 237 encontradas nos soros (Heinrich et al., 1990; Laing et al., 2003; Motta, 2008; Teixeira et
 238 al., 2009). Esse aumento só foi percebido após 6 horas da inoculação o que pode ser
 239 explicado pela produção da IL-1 β no local da inoculação que posteriormente alcançou a
 240 corrente sanguínea e ser detectada no soro, já que as ações vasculotóxica e proteolítica

241 do veneno fazem com que ocorra um menor suporte sanguíneo no local da picada
242 (Motta et al. 2009).

243 CONCLUSÕES

244 Conclui-se que a intoxicação por venenos botrópico e crotálico estimulam
245 principalmente a produção de IL-6 nos animais experimentalmente intoxicados,
246 detectada no soro. O tratamento complementar com o extrato da planta *Mikania*
247 *glomerata* influenciou principalmente a produção de IL-6, IL-10 e IFN- γ . São
248 necessários novos estudos com o extrato de *Mikania glomerata* para que possa
249 compreender a ação da planta sobre as intoxicações crotálica e botrópica e a melhor via
250 para administrá-lo.

251

252 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 253 1. ÁVILA-AGÜERO, M. L. PARÍS, M.M.; HU. S.; PETERSON, P.K.;
254 GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE. B.; FAINGEZICHT, I. Systemic cytokine
255 response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr. Emerg. Cary*, v.17,
256 n. 6, p.425-429, 2001.
- 257 2. BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B; TARKKOWSKI, A; HANSON, L.A;
258 MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by
259 Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. *J. Venom. Anim.Toxins*, v. 1, p. 1-11,
260 1995.
- 261 3. BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L.
262 Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with
263 Bothrops atrox venom. *Mediat. Inflamm.*, v. 7, p. 339-346, 1998.
- 264 4. BOGDAN, C. PAIK. J.; VODOVOTZ. Y.; NATHAN, C. Contrasting
265 mechanisms for supression of macrophage cytokine release by transforming
266 growth factor- β and interleukin-10. *J. Biol. Chem.*, v.32, p.23302-23308,1992.
- 267 5. BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – SVS. Casos de
268 acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades
269 Federadas. 2008. Disponível
270 em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_mes_2008.ppd)
271 [mes_2008.ppd](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_mes_2008.ppd)> Acesso em: 20 mar. 2009.

- 272 6. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
273 Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 5ª edição. Brasília:
274 Ministério da Saúde; 2001. 816p.
- 275 7. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
276 Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª edição. Brasília:
277 Ministério da Saúde; 2005. 816p.
- 278 8. CARNEIRO, A.S.; RIBEIRO, O.R.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.H.K.;
279 VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O.M.; STAROBINASET, N. Local
280 inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice
281 selected for acute inflammatory response. *Toxicon*, V.40, pp. 1571–1579. 2002.
- 282 9. CHENG, M.; NGUYEN, M.; FANTUZZI, G.; KOH, T.J. Endogenous
283 interferon- γ is required for efficient skeletal muscle regeneration *Am J Physiol*
284 *Cell Physiol*. vol. 294, n.5, p.1183-1191, 2008.
- 285 10. CLISSA PB. Caracterização do efeito da jararagina sobre a produção e liberação
286 de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino. 2002. 110f. Tese (Doutorado)
287 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 288 11. CONTRAN, R.S. Patologia celular II: adaptações, acúmulos intracelulares e
289 envelhecimento celular. In:_____. Robbins. Patologia estrutural e funcional.
290 5. ed, Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2000. p.37-38.
- 291 12. ESCOCARD, R.C.M.; KANASHIRO, M.M.; PETRETSKI, J.H.; AZEVEDO-
292 SILVA, J.; QUEIROZ DE CARVALHO, E.C.; DA SILVA W.D; KIPNIS, T.L.
293 Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide
294 synthase/nitric oxide in mice injected with Bothrops atrox venom.
295 *Immunobiology*, v.211, p. 37–46, 2006
- 296 13. FENWICK AM, GUTBERLET JR RL, JENNAFER A, EVANS JA,
297 PARKINSON CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and
298 classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and
299 Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean*
300 *Society*. V.156, p.617–40, 2009.
- 301 14. GASPARETTO, J.C.; CAMPOS, F.R.; BUDEL, J.M.; PONTAROLO, R.
302 *Mikania glomerata* Spreng. and *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae:

- 303 Agronomic, genetic, anatomical, chemical, pharmacological, toxicological
304 studies and its use in herbal therapy programs in Brazil. Rev. Bras. Farmacogn.
305 V.20, p.627-640, 2010.
- 306 15. HEINRICH PC, CASTELL JV, ANDUS T. Interleukin-6 and the acute phase
307 response. Biochem J., v.265, p.621–636, 1990.
- 308 16. HOULT, J. R. S.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of
309 simple coumarins: natural products with therapeutic potential. Gen. Pharmacol.
310 V. 27, p. 713–722, 1996
- 311 17. LAING, G.D.; Clissa, P.B.; Theakston, R.D.; Moura-da-Silva, A.M.; Taylor,
312 M.J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin
313 necrosis. Eur. J. Immunol..., v.33, n.12, p. 3458-63, 2003.
- 314 18. LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., HANSON, L.A. Host response to Bothrops
315 asper snake venom. Analysis of oedema formation, inflammatory cells, and
316 cytokine release in a mouse model. Inflammation, v.17, p. 93–105, 1993.
- 317 19. LUNA, K.P.O.; DA SILVA, M.B.; PEREIRA, V.R.A. Clinical and
318 immunological aspects of envenomations by Bothrops snakes. The Journal of
319 Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. V.17, n. 2, p.130-
320 141. 2011a
- 321 20. LUNA, K.P.O.; MELO, C,M,L.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, A.O.;
322 PEREIRA, V.R.A. Bothrops erythromelas snake venom induces a
323 proinflammatory response in mice splenocytes. Int J Interf Cytok Mediator
324 Res.n.3 p.9-18, 2011b.
- 325 21. MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.;
326 COUTO, L.B.; GOMESD, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA,
327 P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*.
328 *Journal of Ethnopharmacology*. v.102, p.364–370, 2005.
- 329 22. MORS, W.B. Plants active against snake bite. Econ. Med. Plant Res., v.5,
330 p.352–382, 1991.
- 331 23. MOTTA, Y.P.; SAKATE, M.; NOGUEIRA, R.M.B.; FLORIANO, R.S.;
332 LAPOSY, C.B.L.; SANCHES, O.; CAMPRESI, A.C.; Avaliações clínica,
333 laboratorial e histopatológica da intoxicação experimental por veneno da

- 334 serpente Bothrops jararaca em ratos wistar e tratados com antiveneno e Mikania
335 glomerata. Rev. Bras. Toxicol., v.20, 2009.
- 336 24. OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Interleukin 10: A
337 complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an
338 antiinflammatory drugs. Crit. Care Med.,v.30, p.58-63, 2002.
- 339 25. OLIVEIRA, R.B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE. M.T. Fatores associados à
340 incoagulabilidade sangüínea no envenenamento por serpentes do gênero
341 Bothrops (Risk factors associated with coagulation abnormalities in Bothrops
342 envenoming). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v.36, n.6,
343 p.657-663, 2003.
- 344 26. OSWALD, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; JAMES, S.L IL-10 synergizes
345 with IL-4 and transforming growth factor β to inhibit macrophage cytotoxic
346 activity. J. Immunol., v.148, p.3578-3582, 1992.
- 347 27. PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ,
348 J.M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with
349 Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms. Toxicon, v. 38, p. 1253-
350 1266, 2000.
- 351 28. PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v.47, n.1,
352 p. 2-13, 2001.
- 353 29. RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, A.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D.F.
354 Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of Crotalus durissus
355 terrificus venom. Toxicon, v. 44, p.609-616, 2004.
- 356 30. SITPRIJAA, V.; SUTEPARAKB, S.; Animal toxins: an overview. Asian
357 Biomedicine, v. 2 n. 6, p.451-457, 2008.
- 358 31. SOARES A.M., TICLI F.K., MARCUSSI S., LOURENCO M.V., JANUARIO
359 A.H., SAMPAIO S.V., GIGLIO J.R., LOMONTE B., PEREIRA P.S. Medicinal
360 Plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal**
361 **Chemistry**, v. 12 .p. 2625-41, 2005.
- 362 32. SOARES, A.M., JANU´ARIO, A.H., LOURENCO, M.V., PEREIRA, A.M.S.,
363 PEREIRA, P.S., Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms.

- 364 Drugs of the Future 29, 1105–1117. SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos.**
365 São Paulo: Atheneu, 1990. 138p, 2004.
- 366 33. SOUZA-E-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; MARIANO, M. The
367 venom of South American rattlesnake inhibits macrophage mediator.
368 Inflammation. v.5, p.18–23, 1996.
- 369 34. SUWA, T.; HOGG, J.C.; Quinlan, K.B.; VAN EEDEN, S.F.; The effect of
370 interleukin-6 on L-selectin levels on polymorphonuclear leukocytes. Am. J.
371 Physiol. Heart Circ. Physiol., v.283, p.879–84, 2002.
- 372 35. TEIXEIRA, C., CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLOB, G.; CHAVES, F.;
373 Inflammation induced by Bothrops asper venom. Toxicon, v.54, n.7, p.988-97,
374 2009.
- 375 36. WEN FH, CARDOSO JLC, MALAQUE CMS, FRANÇA FOS, SANT´ANNA
376 SS, FERNANDES W, FURTADO MF, FRANCO F, ALBUQUERQUE MJ,
377 KRONCA FJ, NALON MA, RÚBIO GBG, DA SILVA EM, LEITE, JCM.
378 Influências das alterações ambientais na epidemiologia dos acidentes ofídicos e
379 na distribuição geográfica das serpentes de importância médica nos estados de
380 São Paulo e Paraná, 1988-1997. *Inf. Epidemiol. SUS*,; v.11, n.1 p.45-47, 2002.

1 **Quantificação de citocinas no homogenato da pata na intoxicação**
2 **experimental com veneno de *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus***
3 ***terrificus* em ratos wistar tratados com soroterapia e *Mikania***
4 ***glomerata*.**

5
6 [Quantification of cytokines in in paw homogenate of experimental intoxication for
7 venom of the *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* in Wistar rats is
8 treated with antivenom and *Mikania glomerata*].

9 Yudney Pereira da Motta^{1*}; Michiko Sakate¹; Rosa Maria Barilli Nogueira²; Maria Terezinha Serrão
10 Peraçoli³; Rafael Stuani Floriano²; Erika Nakaira Takahagi³

11 1 Faculdade de medicina veterinária e zootecnia- FMVZ-UNESP – Botucatu, SP

12 2 Faculdade de Ciências Agrarias – UNOESTE – Presidente Prudente

13 3 Instituto de Biociência de Botucatu – UNESP - Botucatu, SP

14 * Autor: Universidade Estadual Centro-Oeste – UNICENTRO/Guarapuava-PR, Departamento de
15 Medicina Veterinária Rua: Simeão Varella de Sá, N.3. Guarapuava-PR. CEP: 85040-080 e-mail:
16 yudney@gmail.com

17
18 **RESUMO**

19 O presente projeto teve como objetivo quantificar os níveis de citocinas pró-
20 inflamatórias, entre estas TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6 e anti-inflamatórias
21 como IL-10 e INF- γ e comparar o efeito do tratamento convencional com o efeito do
22 tratamento complementado pelo extrato da planta *Mikania glomerata* na intoxicação
23 experimental por *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*. Foram usados
24 ratos Wistar divididos em 5 grupos: C – controle, VC - veneno crotálico + soro
25 antiofídico, VB – veneno botrópico + soro antiofídico, VCM - veneno crotálico + soro
26 antiofídico + *Mikania glomerata* e VBM - veneno botrópico + soro antiofídico +
27 *Mikania glomerata*. As citocinas foram quantificadas no soro desses animais pelo teste
28 de ELISA em três momentos (M1- 30 minutos, M2- seis horas e M3- 24 horas após a
29 inoculação do veneno). A intoxicação por veneno botrópico estimula a produção de
30 TNF- α , IL-1 β , IL-6 e o veneno crotálico estimulou a produção de IL-6 e uma menor
31 produção de INF- γ . O tratamento complementar com o extrato da planta *Mikania*
32 *glomerata* teve influencia principalmente na produção de IL-6, IL-1 β e INF- γ . São
33 necessários novos estudos com o extrato de *Mikania glomerata* para que possa entender

34 a ação da planta sobre a intoxicação crotálica e botrópica e também qual a melhor via
35 para administrá-lo.

36 **Palavras-chaves:** *Bothropoides jararaca*; *Crotalus durissus terrificus*;
37 *Mikania glomerata*; Ratos Wistar; citocinas

38

39 **ABSTRACT**

40 This experiment aimed to quantify the pro-inflammatory cytokine levels, including
41 TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 as well as the anti-inflammatory ones such as
42 IL-10 and INF- γ . It was also our objective to compare the effect of the conventional
43 treatment to one of the treatment in which it was added the *Mikania glomerata* plant in
44 the experimental intoxication using *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus*
45 *terrificus* venom. It was used Wistar rats that were randomly divided into 5 groups: C –
46 control, VC – Crotalus venom + antivenom serum, VB – Bothrops venom + antivenom
47 serum, VCM - Crotalus venom + antivenom serum + *Mikania glomerata* and VBM -
48 Bothrops venom + antivenom serum + *Mikania glomerata*. Cytokines were quantified
49 in the serum, paw homogenates, and spleen cell culture by using ELISA test in three
50 different moments (M1- 30 minutes, M2- 6 hours and M3- 24 hours after venom
51 injection). The intoxication by *Bothrops* venom stimulates the production of TNF- α , IL-
52 1 β , IL-6 and Crotalus venom stimulated the production of IL-6 and a lower production
53 of INF- γ . Adjunctive treatment with the extract of the plant *Mikania glomerata* was
54 mainly influences the production of IL-6, IL-1 β and INF- γ . Further research with the
55 extract of *Mikania glomerata* in order to understand the action of the plant on Crotalus
56 and Bothrops poisoning and also what the best way to manage it.

57 **Keywords:** *Bothrops jararaca*; *Crotalus durissus terrificus*; *Mikania glomerata*; Wistar
58 rats; cytokine

59

60 **INTRODUÇÃO**

61 Acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública em países
62 tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam
63 (Pinho e Pereira, 2001).

64 O número de notificações de ofidismo tem aumentado consideravelmente desde
65 2001, alcançando o maior índice em 2005. Desde então vem apresentando
66 decréscimo, com registro de 26.156 acidentes em 2008, correspondendo à incidência
67 de 13,8 casos por 100.000 habitantes no Brasil, a menor desde 2005 (Brasil, 2008).

68 Assim, dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas, verifica-se o predomínio
69 do acidente botrópico, que corresponde a 87,5% dos casos ofídicos notificados no
70 país, seguidos pelo crotálico 9,2%, laquético 2,7% e elapídico 0,6%, com pequenas
71 variações de acordo com a região e distribuição geográficas das serpentes (Brasil,
72 2005).

73 O gênero *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca) representa o grupo
74 mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em
75 todo território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*,
76 *Bothropoides* e *Rhinocerophis*) (Brasil, 2001, Wen et al., 2002, Fenwick et al.,
77 2009). O veneno botrópico possui ações coagulante, proteolítica e vasculotóxica
78 (Oliveira et al., 2003). É uma mistura complexa de metaloproteinasas (toxinas
79 hemorrágicas - jararagina), fosfolipase A2 (miotoxina), serino-proteases (enzimas
80 tipo trombina) e peptídeos que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina
81 (Clissa, 2002).

82 As citocinas são polipeptídeos produzidos principalmente por linfócitos
83 ativados e macrófagos, que modulam a função de outros tipos celulares. Estão
84 envolvidas nas respostas imunológicas e apresentam efeitos importantes na resposta
85 inflamatória, sendo a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF-
86 α) e interleucina 8 (IL-8), as principais mediadoras da inflamação. A liberação
87 dessas citocinas pode ser estimulada por endotoxina, imunocomplexos, toxinas,
88 trauma físico, entre outros processos. Exercem seus efeitos de três diferentes
89 maneiras: atuando sobre a própria célula que as produz (efeito autócrino), sobre
90 células vizinhas (efeito parácrino), ou a nível sistêmico (efeito endócrino), sendo
91 suas principais células alvo, as células endoteliais, leucócitos e fibroblastos. A IL-1,
92 TNF- α e IL-6 estimulam respostas sistêmicas de fase aguda associadas à infecção ou
93 à agressão, causando sinais clínicos como febre e sedação, além de provocarem a
94 liberação de neutrófilos, hormônio adrenocorticotrófico e corticosteróides para
95 circulação (Contran, 2000). A IL-10 tem ação antiinflamatória, sendo capaz de

96 diminuir a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 (Oswald et al., 1992; Bogdan et
97 al., 1992).

98 A produção de citocinas tem sido descrita em modelos experimentais e em
99 vítimas de acidentes botrópicos e crotálicos (Lomonte et al., 1993; Barravieira et al.
100 1995; Barros et al. 1998 e Petricevich et al.,2000). Porém, poucas evidências sobre o
101 envolvimento direto das citocinas na inflamação ocasionada pela intoxicação
102 crotálica estão disponíveis na literatura. Uma melhor compreensão da resposta
103 inflamatória que ocorre nos acidentes ofídicos pode levar ao desenvolvimento de
104 novas estratégias terapêuticas para auxiliar na recuperação desses pacientes (Ávila-
105 Agüero et al., 2001).

106 O tratamento preconizado para neutralizar a ação dos venenos botrópico e
107 crotálico é por meio da soroterapia e o soro bivalente antibotrópico-crotálico é o mais
108 facilmente encontrado e utilizado em medicina veterinária. Mesmo sendo o
109 tratamento recomendado, ainda apresenta algumas desvantagens, como: (1) limitado
110 ou nenhum acesso ao soro antiofídico na zona rural de países em desenvolvimento
111 onde a maioria dos acidentes acontece; (2) variações significantes na composição do
112 veneno e reatividade antigênica devido a diversidades de serpentes, o que pode
113 causar limitações durante a soroterapia; (3) reações adversas em pacientes devido à
114 infusão de proteínas animais; e (4) efetividade limitada para proteger os efeitos
115 deletérios no local da picada. Assim, a procura contínua e identificação de novas
116 combinações que possam ser úteis como terapia alternativa ou terapias
117 complementares para a intoxicação por veneno de serpente é uma tarefa pertinente
118 (Soares et al., 2005).

119 Em muitos países, extratos vegetais têm sido tradicionalmente utilizados no
120 tratamento de acidentes ofídicos (Mors,1991). O extrato de plantas com propriedades
121 antiofídicas é muitas vezes a única opção em comunidades sem acesso à soroterapia.
122 A planta *Mikania glomerata* tem se mostrado eficaz na neutralização de muitos dos
123 efeitos tóxicos dos venenos botrópico e crotálico (Maiorano et al.,2005).

124 Os extratos vegetais constituem uma alternativa para tratamento de ofidismo, e
125 exibem uma diversidade grande de combinações químicas com várias atividades
126 farmacológicas de interesse médico-científico. Um número grande de extratos
127 mostrou boas atividades antivenenos (Soares et al., 2004).

128 A alta incidência de casos de acidentes ofídicos, as desvantagens do uso da
129 soroterapia como o único tratamento contra os acidentes ofídicos, a existência de
130 poucos trabalhos sobre o efeito do tratamento de intoxicações ofídicas com a planta
131 *Mikania glomerata* em relação a produção de citocinas no homogenato da pata de ratos
132 Wistar, sustentam a proposta do presente estudo em avaliar a produção de citocinas pró-
133 inflamatórias e anti-inflamatórias na intoxicação experimental pelos veneno da serpente
134 *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar e tratados com
135 soro antiofídico e extrato de *Mikania glomerata*.

136

137 MATERIAL E MÉTODOS

138 Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, de 2 meses de idade e peso corporal
139 entre 230 e 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas no biotério de
140 experimentação, em ambiente com controle de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura
141 constante (25°C), umidade do ar de 55-65%, tempo de exaustão de 10 trocas de ar da
142 sala/hora, recebendo dieta padrão para animais de laboratório (Purina[®]) e água *ad*
143 *libitum*. Os animais foram divididos em 3 grupos (G) experimentais: G1- controle; G2-
144 inoculação de 10 mg/kg de veneno botrópico + soro antiofídico (Vencofarma[®]) na dose
145 recomendada pelo fabricante para neutralizar a quantidade inoculada em cada rato e o
146 G3- inoculação de 10 mg/kg de veneno botrópico + soro antiofídico (Vencofarma[®]) na
147 dose recomendada pelo fabricante para neutralizar a quantidade inoculada em cada rato
148 + extrato de *Mikania glomerata* 10% no volume de 1 mL, no intervalo de 2 horas, com
149 três repetições após a inoculação do veneno. Cada grupo foi avaliado em três
150 momentos: M1 30 minutos após a inoculação do veneno, M2 6 horas após a inoculação
151 do veneno e M3, 24 horas após a inoculação do veneno.

152 Para cada momento, os ratos foram anestesiados e eutanasiados com tiopental
153 sódico na dose de 100 mg/kg, por via intraperitoneal. A musculatura da pata esquerda
154 foi seccionada com auxílio de um punch com diâmetro de 8 mm e transferida para um
155 tubo eppendorf contendo 200 mL de PBS. O tecido foi picotado com uma tesoura e
156 posteriormente homogeneizado com uma haste de vidro no próprio tubo eppendorf.
157 Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 1200 rpm durante 6 minutos e o
158 sobrenadante congelado a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

159 Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para amostras
160 dependentes, empregando-se o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego,
161 Califórnia, USA, 2000. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

162 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

163 O TNF- α teve um aumento somente nos animais que receberam o veneno
164 botrópico, não tendo diferença estatística entre os tratamentos. Os animais acidentados
165 ou intoxicados pelo veneno botrópico tem uma grande alteração no local da picada ou
166 inoculação o que é percebido quando avaliado clinicamente ou por meio de exames
167 histopatológicos onde se encontram alterações como necrose, congestão, hemorragia,
168 edema e infiltração de células polimorfonucleares o que faz com que esse tipo de
169 acidente possa levar uma maior liberação de citocinas pró-inflamatória no local
170 (Barraviera et al., 1995; Motta, 2008).

171 Nos animais intoxicados pelo veneno crotálico, não foram encontrados níveis de
172 TNF- α superiores aos animais do grupo controle o que pode estar relacionado à ação
173 anti-inflamatória do veneno crotálico (Rangel-Santos et al., 2004).

174 Não foram encontradas diferenças significantes de IL-10 entre os grupos e
175 momentos de ratos Wistar inoculados com o veneno botrópico e crotálico. A produção
176 de IL-10 é estimulada pelas citocinas pro-inflamatórias (IL-1 e IFN) e a ausência dessa
177 citocina pode ser devido ao tempo insuficiente para o estímulo da produção local de IL-
178 10 (LUNA et al., 2011b).

179 A IL-6 esteve aumentada nos animais intoxicados com veneno botrópico e
180 também nos animais intoxicados pelo veneno crotálico (tab.1), o que já era esperado
181 pela reação inflamatória no local da inoculação. Os animais que receberam veneno
182 crotálico tiveram um aumento após seis horas, voltando aos níveis basais após 24 horas
183 da inoculação, o que pode ser explicado pelo veneno crotálico não ter ações locais
184 evidentes como no veneno botrópico (Nogueira et al 2007b; Nogueira e Sakate, 2006;
185 Motta, 2008; Floriano et al., 2009).

186 Nos animais intoxicados pelo veneno botrópico, teve um aumento da IL-6 após 6
187 horas da inoculação (tab. 1) mantendo esses valores até após 24 horas da inoculação,
188 pois a reação inflamatória no local da inoculação é maior quando comparada com à do
189 veneno crotálico (Barraviera et al, 1995; Motta, 2008) Em comparação com o
190 tratamento convencional, soro antiofídico polivalente e o extrato aquoso de *Mikania*

191 *glomerata*, não foram capaz de reduzir a produção dessa citocina no local da inoculação
 192 e concorda com Motta (2008) e Soares et al. (2005) que a terapia sistêmica não provoca
 193 muitos efeitos benéficos para as alterações locais como ocorrem nos animais
 194 acidentados com o veneno botrópico, pois animais intoxicados pelo veneno botrópico
 195 apresentam alterações na circulação sanguínea no local da picada dificultando a ação da
 196 terapêutica sistêmica.

197 **Tabela 1** – Valores médios e desvio padrão de IL-6 no homogenato da pata de ratos
 198 intoxicados com venenos crotálico e botrópico tratados com soro antiofídico e *Mikania*
 199 *glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos	55,749 (6,726) Aa	70,023 (5,890) Ba	70,858 (5,556) Ba
6 horas	56,327 (2,155) Ab	438,68 (177,23) Aa	586,36 (84,281) Aa
24 horas	59,221 (3,902) Aa	63,272 (4,781) Ba	64,961 (6,392) Ba
	C	VB	VBM
30 minutos	55,749 (6,726)Ab	84,876 (18,678) Ba	85,376 (18,226) Ba
6 horas	56,327 (2,155) Ab	1534,0 (216,53) Aa	1298,6 (268,12) Aa
24 horas	59,221 (3,902) Ab	1680,0 (515,65) Aa	1239,2 (535,25) Aa

200 Resultados A = coluna dentro do mesmo grupo; a = linha, mesmo momento em grupos
 201 diferentes e () desvio padrão.

202 Os animais intoxicados com o veneno crotálico tiveram uma menor produção de
 203 IFN- γ no homogenato da pata e sugere uma ação anti-inflamatória do veneno crotálico
 204 (tab. 2) (Rangel-Santos et al., 2004). Os animais que foram intoxicados pelo veneno
 205 botrópico e receberam extrato de *Mikania glomerata* e soro antiofídico polivalente
 206 apresentaram uma queda na produção de IFN- γ , o que não foi observada quando esta foi
 207 quantificada no soro. Este fato pode estar relacionado com a ação anti-inflamatória do
 208 extrato da planta (*Mikania glomerata*) no local da inoculação (Maiorano et al., 2005,
 209 Motta, 2008).

210

211

212 **Tab. 2** – Valores médios e desvio padrão de IFN – γ no homogenato da pata de ratos
 213 intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata*
 214 (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VC	VCM
30 minutos	33,275 (2,874)Aa	29,586 (2,098)Aa	29,586 (2,098)Aa
6 horas	32,480 (1,587)Aa	28,284 (1,766)Ab	26,404 (0,576)Bb
24 horas	33,774 (5,587)Aa	28,140 (1,328)Ab	27,001 (1,824)Bb

215 Resultados A = coluna dentro do mesmo grupo; a = linha, mesmo momento em grupos
 216 diferentes e () desvio padrão.

217

218

219 A interleucina 1β é a responsável junto ao TNF- α pela indução da resposta
 220 aguda à agressão tecidual (Laing et al., 2003). Nos animais intoxicados
 221 experimentalmente pelo veneno crotálico, não houve alteração na produção de IL- 1β no
 222 homogenato da pata, o que se pode sugerir uma ação anti-inflamatória do veneno
 223 crotálico e seu pequeno efeito no local da inoculação (Barraviera, 1994; Barraviera et
 224 al., 1995; Rangel-Santos et al., 2004).

225 Os animais que foram intoxicados pelo veneno botrópico apresentaram um
 226 aumento da produção de IL- 1β (tab. 3), o que pode estar relacionado com a ação
 227 proteolítica do veneno botrópico (Zamuner et al., 2005; Motta, 2008). Os animais que
 228 receberam o tratamento convencional apresentaram este aumento seis horas (M2) e 24
 229 horas (M3) após a inoculação e os animais que receberam extrato de *Mikania glomerata*
 230 e soro antiofídico polivalente apresentaram um aumento estatisticamente significativo
 231 apenas no momento M3. Este fato pode estar diretamente relacionado com a ação do
 232 extrato da planta que já mostrou, em alguns estudos, ter um potencial anti-inflamatório e
 233 assim reduz a produção de IL- 1β pois esta é uma das citocinas pró-inflamatórias
 234 responsáveis pela resposta aguda frente a uma agressão tecidual (Motta, 2008; Maiorano
 235 et al., 2005).

236

237

238 **Tabela 3** – Valores médios e desvio padrão de IL-1 β no homogenato da pata de ratos
 239 intoxicados com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania glomerata*
 240 (pg/ml) segundo grupos e momentos de avaliação.

	C	VB	VBM
30 minutos	11,327 (1,669)Aa	11,421 (1,096) Ba	11,421 (1,096)Ba
6 horas	11,013 (0,472) Ab	79,861 (11,638) Aa	15.484 (3.401)Bb
24 horas	10,580 (0,670) Ab	96,657 (29,303) Aa	106,01 (64,019) Aa

241 Resultados A = coluna dentro do mesmo grupo; a = linha, mesmo momento em grupos
 242 diferentes e () desvio padrão.

243

244 CONCLUSÕES

245 Conclui-se que a intoxicação por veneno botrópico estimula a produção de TNF-
 246 α , IL-1 β , IL-6 e o veneno crotálico estimula a produção de IL-6 e uma menor produção
 247 de IFN- γ . O tratamento complementar com o extrato da planta *Mikania glomerata* teve
 248 influencia principalmente na produção de IL-6, IL-1 β e IFN- γ . São necessários novos
 249 estudos com o extrato de *Mikania glomerata* para que possa entender a ação da planta
 250 sobre as intoxicações crotálica e botrópica e também pesquisar qual seria a melhor via
 251 para administrá-lo.

252

253 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 254 1. ÁVILA-AGÜERO, M. L. PARÍS, M.M.; HU. S.; PETERSON, P.K.;
 255 GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE. B.; FAINGEZICHT, I. Systemic cytokine
 256 response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr. Emerg. Care*, v.17,
 257 n. 6, p.425-429, 2001.
- 258 2. BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B; TARKKOWSKI, A; HANSON, L.A;
 259 MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by
 260 Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. *J. Venom. Anim.Toxins*, v. 1, p. 1-11,
 261 1995.
- 262 3. BOGDAN, C. PAIK. J.; VODOVOTZ. Y.; NATHAN, C. Contrasting
 263 mechanisms for supression of macrophage cytokine release by transforming
 264 growth factor- β and interleukin-10. *J. Biol. Chem.*, v.32, p.23302-23308,1992.

- 265 4. BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – SVS. Casos de
266 acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades
267 Federadas. 2008. Disponível
268 em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_mes_2008.ppd)
269 [mes_2008.ppd](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_mes_2008.ppd)> Acesso em: 20 mar. 2009.
- 270 5. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
271 Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 5ª edição. Brasília:
272 Ministério da Saúde; 2001. 816p.
- 273 6. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
274 Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª edição. Brasília:
275 Ministério da Saúde; 2005. 816p.
- 276 7. CLISSA PB. Caracterização do efeito da jararagina sobre a produção e liberação
277 de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino. 2002. 110f. Tese (Doutorado)
278 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 279 8. CONTRAN, R.S. Patologia celular II: adaptações, acúmulos intracelulares e
280 envelhecimento celular. In:_____. Robbins. Patologia estrutural e funcional.
281 5. ed, Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2000. p.37-38.
- 282 9. FENWICK AM, GUTBERLET JR RL, JENNAFER A, EVANS JA,
283 PARKINSON CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and
284 classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and
285 Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean*
286 *Society*. V.156, p.617–40, 2009.
- 287 10. FLORIANO, R.S., NOGUEIRA, R. B., SAKATE, M., LAPOSY, C.B.,
288 MOTTA, Y. P., SANGIORGIO, F., DAVID, H., NABAS, J.M. Effect of
289 Mikania glomerata leaf aqueous extract associated with anti-snake venom serum
290 on experimental Crotalus durissus terrificus envenomation in rats. *International*
291 *Journal of Tropical Biology and Conservation*, v. 57, n.4, p.929-937, 2009.
- 292 11. LAING, G.D.; Clissa, P.B.; Theakston, R.D.; Moura-da-Silva, A.M.; Taylor,
293 M.J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin
294 necrosis. *Eur. J. Immunol.*, v.33, n.12, p. 3458-63, 2003.

- 295 12. LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., HANSON, L.A. Host response to Bothrops
296 asper snake venom. Analysis of oedema formation, inflammatory cells, and
297 cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, v.17, p. 93–105, 1993.
- 298 13. LUNA, K.P.O.; MELO, C.M.L.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, A.O.;
299 PEREIRA, V.R.A. Bothrops erythromelas snake venom induces a
300 proinflammatory response in mice splenocytes. *Int J Interf Cytok Mediator*
301 *Res.*n.3 p.9-18, 2011b.
- 302 14. MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.;
303 COUTO, L.B.; GOMESD, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA,
304 P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*.
305 *Journal of Ethnopharmacology*. v.102, p.364–370, 2005.
- 306 15. MORS, W.B. Plants active against snake bite. *Econ. Med. Plant Res.*, v.5,
307 p.352–382, 1991.
- 308 16. MOTTA, Y.P. Aspectos clínico, laboratorial e histopatológico da intoxicação
309 experimental pelos venenos das serpentes Bothrops jararaca e Crotalus durissus
310 terrificus em ratos Wistar tratados com antiveneno e Mikania glomerata.
311 Botucatu, 2008, 238p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária –
312 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.
- 313 17. NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M.; SANGIORGIO, F.; LAPOSY, C.B.;
314 TOSTES, R.A. Experimental envenomation with Crotalus durissus terrificus
315 venom in dogs treated with antiophidic serum-Part II: laboratory aspects,
316 electrocardiogram and histopathology. *J. venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*,
317 v.13, n.4 p.811-810, 2007b.
- 318 18. NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE,M. Clinical and hematological alterations in
319 dogs during experimental envenomation with Crotalus durissus terrificus venom
320 and treated with antiophidic serum. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*,
321 v.12, n.2, p.285-296, 2006.
- 322 19. OLIVEIRA, R.B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE. M.T. Fatores associados à
323 incoagulabilidade sangüínea no envenenamento por serpentes do gênero
324 Bothrops (Risk factors associated with coagulation abnormalities in Bothrops
325 envenoming). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.36, n.6,
326 p.657-663, 2003.

- 327 20. OSWALD, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; JAMES, S.L IL-10 synergizes
328 with IL-4 and transforming growth factor β to inhibit macrophage cytotoxic
329 activity. *J. Immunol.*, v.148, p.3578-3582, 1992.
- 330 21. PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ,
331 J.M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with
332 Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms. *Toxicon*, v. 38, p. 1253-
333 1266, 2000.
- 334 22. PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.47, n.1, p.
335 2-13, 2001.
- 336 23. RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, A.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D.F.
337 Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus*
338 *terrificus* venom. *Toxicon*, v. 44, p.609-616, 2004.
- 339 24. SOARES A.M., TICLI F.K., MARCUSSI S., LOURENCO M.V., JANUARIO
340 A.H., SAMPAIO S.V., GIGLIO J.R., LOMONTE B., PEREIRA P.S. Medicinal
341 Plants with inhibitory properties against snake venoms. *Current Medicinal*
342 *Chemistry*, v. 12 .p. 2625-41, 2005.
- 343 25. SOARES, A.M., JANU´ARIO, A.H., LOURENCO, M.V., PEREIRA, A.M.S.,
344 PEREIRA, P.S., Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms.
345 *Drugs of the Future* 29, 1105–1117. SOERENSEN, B. *Animais peçonhentos*. São
346 Paulo: Atheneu, 1990. 138p, 2004.
- 347
- 348 26. WEN FH, CARDOSO JLC, MALAQUE CMS, FRANÇA FOS, SANT´ANNA
349 SS, FERNANDES W, FURTADO MF, FRANCO F, ALBUQUERQUE MJ,
350 KRONCA FJ, NALON MA, RÚBIO GBG, DA SILVA EM, LEITE, JCM.
351 Influências das alterações ambientais na epidemiologia dos acidentes ofídicos e
352 na distribuição geográfica das serpentes de importância médica nos estados de
353 São Paulo e Paraná, 1988-1997. *Inf. Epidemiol. SUS.*; v.11, n.1 p.45-47, 2002.
- 354
- 355 27. ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; GUTIÉRREZ, J.M.;
356 TEIXEIRA, C.F.P. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of
357 proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in
358 leukocyte infiltration. *Toxicon*, v.46, p. 806-813, 2005.

1 **Quantificação de citocinas, em cultura de células esplênicas, na**
2 **intoxicação experimental com veneno de *Bothropoides jararaca* e**
3 ***Crotalus durissus terrificus* em ratos wistar tratados com soroterapia e**
4 **extrato de *Mikania glomerata*.**

5
6 [Quantification of cytokines in culture of spleen cells of experimental intoxication for
7 venom of the serpent *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* in Wistar
8 rats treated with antivenom.]

9 Yudney Pereira da Motta^{1*}; Michiko Sakate¹; Rosa Maria Barilli Nogueira²; Maria Terezinha Serrão
10 Peraçoli³; Rafael Stuani Floriano²; Erika Nakaira Takahagi³

11 1 Faculdade de medicina veterinária e zootecnia- FMVZ-UNESP – Botucatu, SP

12 2 Faculdade de Ciências Agrárias – UNOESTE – Presidente Prudente

13 3 Instituto de Biociência de Botucatu – UNESP - Botucatu, SP

14 * Autor: Universidade Estadual Centro-Oeste – UNICENTRO/Guarapuava-PR, Departamento de
15 Medicina Veterinária Rua: Simeão Varella de Sá, N.3. Guarapuava-PR. CEP: 85040-080 e-mail:
16 yudney@gmail.com

17
18 **RESUMO**

19 O presente projeto teve como objetivo quantificar os níveis de citocinas pró-
20 inflamatórias, entre estas TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6 e anti-inflamatórias
21 como IL-10 e INF- γ e comparar o efeito do tratamento convencional com o efeito do
22 tratamento complementado pelo extrato da planta *Mikania glomerata* na intoxicação
23 experimental por *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*. Foram usados
24 ratos Wistar divididos em 5 grupos: C – controle, VC - veneno crotálico + soro
25 antifídico, VB – veneno botrópico + soro antiofídico, VCM - veneno crotálico + soro
26 antiofídico + *Mikania glomerata* e VBM - veneno botrópico + soro antiofídico +
27 *Mikania glomerata*. As citocinas foram quantificadas na cultura de células esplênicas
28 estimuladas ou não (lipossacarídeo ou a Concanavalina) desses animais pelo teste de
29 ELISA em três momentos (M1- 30 minutos, M2- seis horas e M3- 24 horas após a
30 inoculação do veneno). A dosagem das citocinas nas culturas de células esplênicas de
31 ratos experimentalmente intoxicados com veneno botrópico e crotálico leva a concluir-
32 se que esses venenos agem nesses animais levando a estimulação ou a inibição de TNF-
33 α ; IL-6 e IL-10. O tratamento complementar com o extrato da planta *Mikania glomerata*
34 nos animais que receberam o veneno crotálico inibe a produção de IL-10. São
35 necessários novos estudos com o extrato de *Mikania glomerata* para que possa entender

36 a ação da planta sobre as intoxicações crotálica e botrópica e também indicar qual seria
37 a melhor via para administrá-lo.

38

39

40 **Palavras-chave:** *Bothropoides jararaca*; *Crotalus durissus terrificus*; *Mikania*
41 *glomerata*; Ratos Wistar; Citocinas; Cultura de células esplênicas.

42

43 **ABSTRACT**

44 This experiment aimed to quantify the pro-inflammatory cytokine levels, including
45 TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 as well as the anti-inflammatory ones such as
46 IL-10 and INF- γ . It was also our objective to compare the effect of the conventional
47 treatment to one of the treatment in which it was added the *Mikania glomerata* plant in
48 the experimental intoxication using *Bothropoides jararaca* and *Crotalus durissus*
49 *terrificus* venom. It was used Wistar rats that were randomly divided into 5 groups: C –
50 control, VC – Crotalus venom + antivenom serum, VB – Bothrops venom + antivenom
51 serum, VCM - Crotalus venom + antivenom serum + *Mikania glomerata* and VBM -
52 Bothrops venom + antivenom serum + *Mikania glomerata*. Cytokines were quantified
53 in the serum, paw homogenates, and spleen cell culture by using ELISA test in three
54 different moments (M1- 30 minutes, M2- 6 hours and M3- 24 hours after venom
55 injection). The measurement of cytokines in cultures of spleen cells of rats
56 experimentally poisoned by Crotalus and Bothrops venom leads to the conclusion that
57 these poisons act in these animals leading to stimulation or inhibition of TNF- α , IL-6
58 and IL-10. Adjunctive treatment with the extract of the plant *Mikania glomerata* in rats
59 treated with rattlesnake venom inhibits the production of IL-10. Further research with
60 the extract of *Mikania glomerata* in order to understand the action of the plant in
61 *Crotalus* and *Bothrops* poisoning and also indicate what would be the best way to
62 manage it.

63 **Keywords:** *Bothrops jararaca*; *Crotalus durissus terrificus*; *Mikania glomerata*; Wistar
64 rats; cytokine

65

66

67 INTRODUÇÃO

68 Acidentes ofídicos representam sério problema de saúde pública em países
69 tropicais pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam
70 (PINHO & PEREIRA, 2001).

71 O número de notificações de ofidismo tem aumentado consideravelmente desde
72 2001, alcançando o maior índice em 2005. Desde então vem apresentando decréscimo,
73 com registro de 26.156 acidentes em 2008, correspondendo à incidência de 13,8 casos
74 por 100.000 habitantes no Brasil, a menor desde 2005 (Ministério da saúde, 2008).

75 Assim, dos quatro gêneros de serpentes peçonhentas, verifica-se o predomínio do
76 acidente botrópico, que corresponde a 87,5% dos casos ofídicos notificados no país,
77 seguidos pelo crotálico 9,2%, laquéutico 2,7% e elapídico 0,6%, com pequenas variações
78 de acordo com a região e distribuição geográficas das serpentes (Ministério da saúde,
79 2005).

80 O gênero *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caíçaca) representa o grupo mais
81 importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em todo
82 território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides* e
83 *Rhinocerophis*) (Brasil, 2001, Wen et al., 2002, Fenwick et al., 2009). O veneno
84 botrópico possui ações coagulante, proteolítica e vasculotóxica (Oliveira et al., 2003). É
85 uma mistura complexa de metaloproteinasas (toxinas hemorrágicas - jararagina),
86 fosfolipase A2 (miotoxina), serino-proteases (enzimas tipo trombina) e peptídeos que
87 agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina (Clissa, 2002).

88 As serpentes do gênero *Crotalus* são consideradas de grande importância tanto
89 para seres humanos como em animais devido à gravidade do quadro clínico que causam,
90 e na maioria das vezes fatal quando o tratamento com soro específico não é instituído
91 precocemente (Brasil, 2005).

92 As citocinas são polipeptídeos produzidos principalmente por linfócitos ativados e
93 macrófagos, que modulam a função de outros tipos celulares. Estão envolvidas nas
94 respostas imunológicas e apresentam efeitos importantes na resposta inflamatória, sendo
95 a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α) e interleucina 8 (IL-
96 8), as principais mediadoras da inflamação. A liberação dessas citocinas pode ser
97 estimulada por endotoxina, imunocomplexos, toxinas, trauma físico, entre outros
98 processos. Exercem seus efeitos de três diferentes maneiras: atuando sobre a própria

99 célula que as produz (efeito autócrino), sobre células vizinhas (efeito parácrino), ou a
100 nível sistêmico (efeito endócrino), sendo suas principais células alvo, as células
101 endoteliais, leucócitos e fibroblastos. A IL-1, TNF- α e IL-6 estimulam respostas
102 sistêmicas de fase aguda associadas à infecção ou à agressão, causando sinais clínicos
103 como febre e sedação, além de provocarem a liberação de neutrófilos, hormônio
104 adrenocorticotrófico e corticosteróides para circulação (Contran, 2000). A IL-10 tem
105 ação antiinflamatória, sendo capaz de diminuir a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8
106 (Oswald et al., 1992; Bogdan et al., 1992).

107 A produção de citocinas tem sido descrita em modelos experimentais e em
108 vítimas de acidentes botrópicos e crotálicos (Lomonte et al., 1993; Barravieira et al.
109 1995; Barros et al. 1998 e Petricevich et al.,2000). Porém, poucas evidências sobre o
110 envolvimento direto das citocinas na inflamação ocasionada pela intoxicação crotálica
111 estão disponíveis na literatura. Uma melhor compreensão da resposta inflamatória que
112 ocorre nos acidentes ofídicos pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias
113 terapêuticas para auxiliar na recuperação desses pacientes (Ávila-Agüero et al., 2001).

114 Várias moléculas tem sido utilizadas como substitutas para o estímulo antígeno
115 específico para células B e T. Entre as mais utilizadas estão as lectinas ou mitógenos.
116 Os mitógenos são qualquer substância capaz de induzir divisão celular por mitose,
117 também denominada de transformação blástica. Entre os mitógenos podem ser
118 encontrados os produtos bacterianos como lipossacarídeo (LPS) que estimula
119 preferencialmente células B. As lectinas são substâncias derivadas de plantas que
120 estimulam preferencialmente células T e entre elas está a Concanavalina A (Con-A)
121 (Ashraf et al., 2003)

122 Pelo fato de os linfócitos proliferarem, preferencialmente, em resposta a
123 determinados antígenos, medidas de proliferação têm sido amplamente aplicadas na
124 Imunologia Clínica. Ensaio de linfoproliferação são utilizados para descrever
125 anormalidades associadas a toxinas, imunodeficiências congênitas, câncer,
126 envelhecimento, doenças infecciosas, desnutrição, estresse, choque e doenças
127 autoimunes bem como na pesquisa terapêutica de tais desordens (Ashraf et al., 2003).

128 O tratamento preconizado para neutralizar a ação dos venenos botrópico e
129 crotálico é por meio da soroterapia e o soro bivalente antibotrópico-crotálico é o mais
130 facilmente encontrado e utilizado em medicina veterinária. Mesmo sendo o tratamento
131 recomendado, ainda apresenta algumas desvantagens, como: (1) limitado ou nenhum
132 acesso ao soro antiofídico na zona rural de países em desenvolvimento onde a maioria
133 dos acidentes acontece; (2) variações significantes na composição do veneno e
134 reatividade antigênica devido a diversidades de serpentes, o que pode causar limitações
135 durante a soroterapia; (3) reações adversas em pacientes devido à infusão de proteínas
136 animais; e (4) efetividade limitada para proteger os efeitos deletérios no local da picada.
137 Assim, a procura contínua e identificação de novas combinações que possam ser úteis
138 como terapia alternativa ou terapias complementares para a intoxicação por veneno de
139 serpente é uma tarefa pertinente (Soares et al., 2005).

140 Em muitos países, extratos vegetais têm sido tradicionalmente utilizados no
141 tratamento de acidentes ofídicos (Mors,1991). O extrato de plantas com propriedades
142 antiofídicas é muitas vezes a única opção em comunidades sem acesso à soroterapia. A
143 planta *Mikania glomerata* tem se mostrado eficaz na neutralização de muitos dos efeitos
144 tóxicos dos venenos botrópico e crotálico (Maiorano et al.,2005).

145 Os extratos vegetais constituem uma alternativa para tratamento de ofidismo, e
146 exibem uma diversidade grande de combinações químicas com várias atividades
147 farmacológicas de interesse médico-científico. Um número grande de extratos mostrou
148 boas atividades antivenenos (Soares et al., 2004). A habilidade dos linfócitos em
149 responder a ligantes particulares in vitro faz da linfoproliferação uma ferramenta útil
150 para o estudo da imunidade mediada por células (Taylor et al. 2004).

151 A alta incidência de casos de acidentes ofídicos, as desvantagens do uso da
152 soroterapia como o único tratamento contra os acidentes ofídicos, a existência de
153 poucos trabalhos sobre o efeito do tratamento de intoxicações ofídicas com a planta
154 *Mikania glomerata* em relação a produção de citocinas no homogenato da pata de ratos
155 Wistar, sustentam a proposta do presente estudo em avaliar a produção de citocinas pró-
156 inflamatórias e anti-inflamatórias na intoxicação experimental pelos veneno da serpente
157 *Bothropoides jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar e tratados com
158 soro antiofídico e extrato de *Mikania glomerata*.

160 MATERIAL E MÉTODOS

161 Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, de 2 meses de idade e peso corporal entre
162 230 e 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas no biotério de
163 experimentação, em ambiente com controle de luz (ciclos de 12 horas) e temperatura
164 constante (25°C), umidade do ar de 55-65%, tempo de exaustão de 10 trocas de ar da
165 sala/hora, recebendo dieta padrão para animais de laboratório (Purina[®]) e água *ad*
166 *libitum*. Os animais foram divididos em 3 grupos (G) experimentais: G1- controle; G2-
167 inoculação de 10 mg/kg de veneno botrópico + soro antiofídico (Vencofarma[®]) na dose
168 recomendada pelo fabricante para neutralizar a quantidade inoculada em cada rato e o
169 G3- inoculação de 10 mg/kg de veneno botrópico + soro antiofídico (Vencofarma[®]) na
170 dose recomendada pelo fabricante para neutralizar a quantidade inoculada em cada rato
171 + extrato de Mikania glomerata 10% no volume de 1 mL, no intervalo de 2 horas, com
172 três repetições após a inoculação do veneno. Cada grupo foi avaliado em três
173 momentos: M1 30 minutos após a inoculação do veneno, M2 6 horas após a inoculação
174 do veneno e M3, 24 horas após a inoculação do veneno.

175 Para cada momento, os ratos foram anestesiados e eutanasiados com tiopental
176 sódico na dose de 100 mg/kg, por via intraperitoneal.

177 Um fragmento do baço dos ratos previamente inoculados com o veneno
178 botrópico ou crotálico foi coletado assepticamente, usando capela de fluxo laminar,
179 materiais estéreis e antissepsia do rato, nos diferentes momentos e macerado em 500uL
180 de meio de cultura RPMI 1640 com auxílio de uma agulha 25X7. A suspensão celular
181 foi transferida para tubos de ensaio e centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm. O
182 sedimento celular foi homogeneizado com 1mL de meio completo (RPMI contendo
183 gentamicina 40mg/mL, L-glutamina 200mM, soro fetal bovino 10% e HEPES 25mM) e
184 a concentração celular foi acertada para 4x10⁶ células/mL.

185 Culturas contendo 0,5 mL (2x10⁶ células) foram colocadas em placas de fundo
186 plano e estimuladas com lipopolissacarídeo (10g/mL de cultura) ou concanavalin-A (5
187 (g/mL de cultura), de acordo com a citocina avaliada. Após 48 horas de incubação a
188 37oC sob tensão constante de 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e
189 estocados a -20oC para posterior dosagem das citocinas.

190 Para a quantificação das citocinas no sobrenadante da cultura de células
191 esplênicas dos animais utilizados nesse experimento foi utilizado o teste de ELISA
192 (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) usando o Kit comercial da R&D Systems
193 (Minneapolis, Minn, E.U.A.) de acordo com as instruções do fabricante.

194 Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para amostras
195 dependentes, empregando-se o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego,
196 Califórnia, USA, 2000. O nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

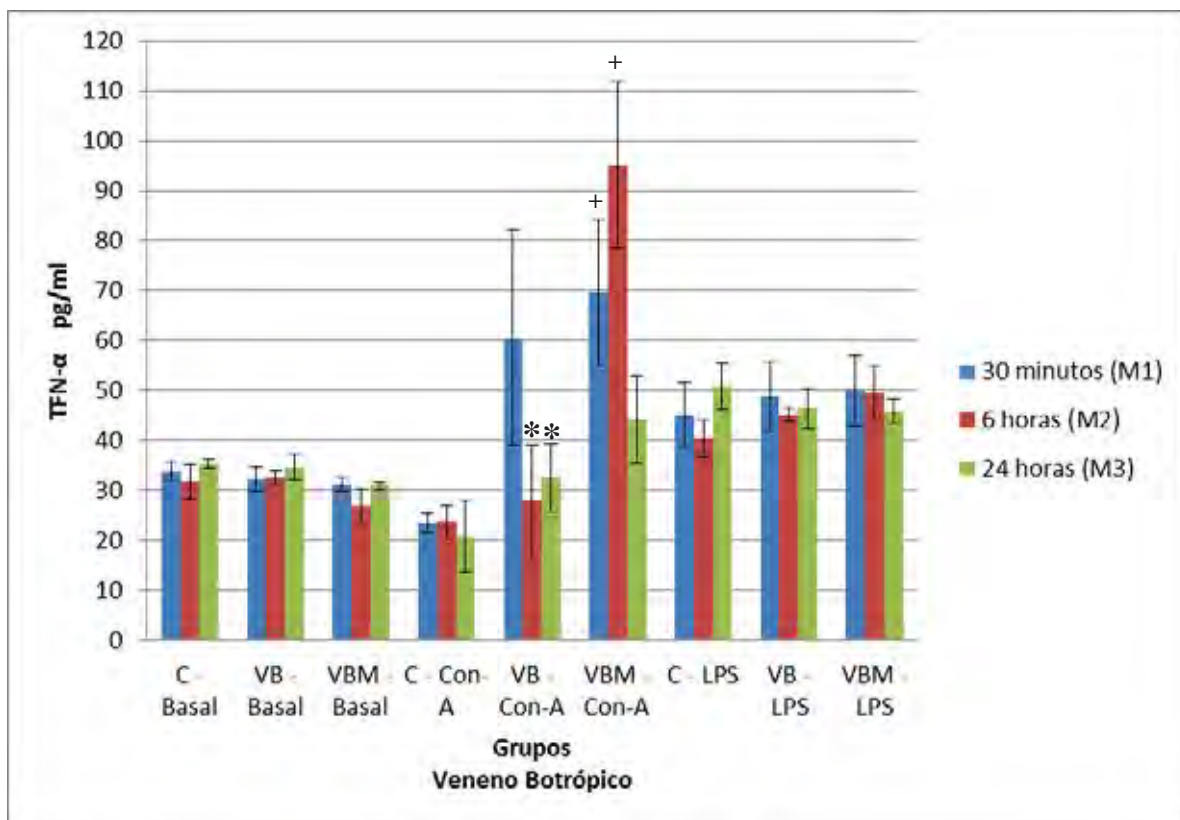
197

198 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

199 As culturas dos animais do grupo VC no momento M2 que receberam o estímulo
200 de Con-A foram estatisticamente menores ($p < 0,05$) do que o mesmo momento no
201 grupo VCM, o que demonstra a ação da planta neutralizando a ação do veneno
202 crotálico. Como este veneno tem uma ação anti-inflamatória e quando ele for inibido,
203 pode-se avaliar uma produção superior de TNF- α (Hoult e Paya, 1996; Rangel-Santo *et*
204 *al.*, 2004; Maiorano *et al.*, 2005).

205 A cultura de células esplênicas dos animais intoxicados com veneno botrópico
206 (fig. 1) teve um aumento na produção de TNF- α quando estimulada com CON-A. O
207 grupo VB teve um aumento na produção de TNF- α no momento M1 enquanto o VBM
208 teve o aumento na produção de TNF- α no momento M1 e M2. Os animais tratados com
209 soro antiofídico e o extrato da planta *Mikania glomerata* começaram a receber o extrato
210 da planta após duas horas da intoxicação totalizando três doses no momento M2. A ação
211 da planta pode ter feito essa diferença sendo que o momento M2 do grupo VBM foi
212 maior que no grupo que não recebeu o extrato da planta (VB). A planta possui como
213 principal princípio ativo, a cumarina, que tem um potencial antiofídico fazendo a inibição
214 de algumas substâncias encontradas no veneno botrópico (Hoult e Paya, 1996;
215 Maiorano *et al.*, 2005, Soares *et al.*, 2005).

216



217

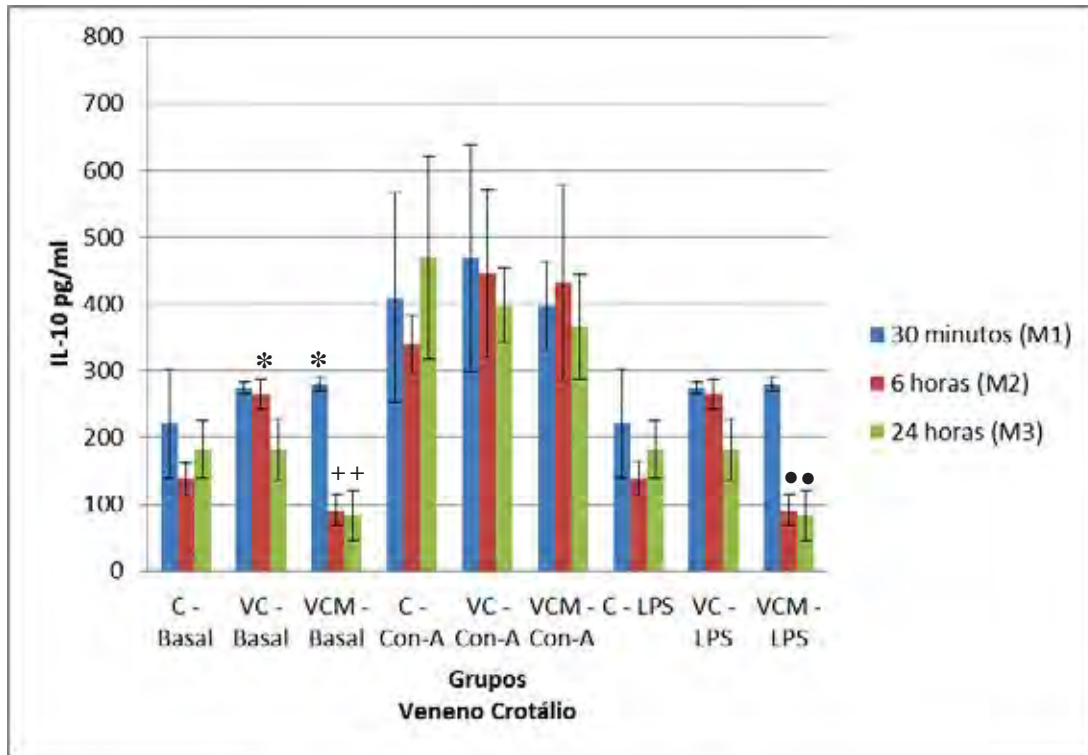
218 **Figura 1.** Valores médios e desvio padrão de TNF- α na cultura de células esplênicas de
 219 ratos intoxicado com veneno botrópico e tratados com soro antiofídico e *Mikania*
 220 *glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

221 * ($p < 0,05$) vs M1; + ($p < 0,05$) vs VB-Con-A (M1, M2); VBM-Con-A (M3) (ANOVA)

222 O estímulo com Con-A foi efetivo para o aumento de produção de IL-10 (fig. 2)
 223 quando usado para estimular a cultura de células esplênicas de animais intoxicados
 224 experimentalmente tanto com o veneno crotálico quanto com o veneno botrópico
 225 (Ashraf et al., 2003). Quando avaliada a citocina anti-inflamatória IL-10 no
 226 sobrenadante da cultura de células esplênicas sem nenhum estímulo, foi observado que
 227 houve um valor estatisticamente menor no grupo que recebeu veneno crotálico e o
 228 tratamento com o extrato da planta *Mikania glomerata* no momento M2 e M3 quando
 229 comparado com o momento M1. Este fato significa uma maior ação anti-inflamatória
 230 tanto do veneno crotálico, com já foi relatada, como também da ação do extrato de
 231 *Mikania glomerata* (Rangel-Santo et al., 2004).

232 Nos animais que receberam o veneno botrópico tiveram uma menor produção
 233 de IL-10 em culturas que não receberam o estímulo de Con-A no momento M2 quando
 234 comparados com os momentos M1 e M3, o que pode ser explicado pela ação do veneno

235 ter efeito local maior do que os efeitos sistêmicos, assim, após 6 horas (M2), os animais
 236 estavam apenas sob a influência do extrato de *Mikania glomerata* onde ela acabou
 237 modulando a resposta da IL-10 nos animais que foram intoxicados com o veneno
 238 botrópico (Suyenaga *et al.*, 2002; Maiorano *et al.*, 2005).



239

240

241 **Figura 2.** Valores médios e desvio padrão de IL-10 na cultura de células esplênicas de
 242 ratos intoxicados com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico e *Mikania*
 243 *glomerata* (pg/mL) segundo grupos e momentos de avaliação.

244 * ($p < 0,05$) vs C-Basal (M2), VCM-Basal (M2); +($p < 0,05$) vs VCM-Basal (M1), C-Basal (M3); •($p < 0,05$) vs VCM-
 245 LPS (M1) (ANOVA)

246

247 Mesmo tendo uma ação anti-inflamatória, o veneno crotálico não foi eficaz em
 248 diminuir a produção de IL-6 e o tratamento com *Mikania glomerata*, que já foi relatada
 249 sua ação anti-inflamatória, não foi eficaz para impedir que fosse produzida essa citocina
 250 que age principalmente na fase aguda da inflamação (Hoult e Paya, 1996; Rangel-Santo
 251 *et al.*, 2004).

252 Os animais que receberam o veneno botrópico e o tratamento com o extrato da
253 planta mostraram uma menor significância em relação à produção de IL-6, o que pode
254 está relacionado à ação da planta que possui um potencial anti-inflamatório e reduziu a
255 produção dessa citocina que está relacionada à resposta inflamatória aguda (Heinrich *et*
256 *al.*, 1990; Eitner *et al.*, 1997; Maiorano *et al.*, 2005; Zamuner *et al.*, 2005).

257 Os animais que receberam o veneno botrópico e as cultura de células esplênicas
258 estimuladas com LPS apresentaram um menor valor da IL-6 no momento M3 do grupo
259 que foi tratado com o extrato de *M. glomerata*, o que pode representar um efeito do
260 extrato sobre a ação do veneno levando a uma menor produção de IL-6 após 24 horas da
261 inoculação, concordando assim com a ação das substâncias encontradas no extrato de
262 *M. glomerata* (Hoult e Paya, 1996; Zamuner *et al.*, 2005; Maiorano *et al.*, 2005; Sartim,
263 2010).

264 O IFN- γ quando dosado em culturas de células esplênicas sem estímulos
265 apresentou uma queda em seus valores quando comparados os momentos em todos os
266 grupos e subgrupos e isso pode ter influência do estresse desses animais, pois o IFN- γ
267 tem sua produção alterada na presença de cortisol e este é liberado em situações de
268 estresse (Meyer e Silva, 1999).

269 A produção de IFN- γ induzida por Con-A permite avaliar a capacidade geral de
270 produção desta citocina, pois esta lectina se liga às glicoproteínas da superfície dos
271 linfócitos T, ativando-os de forma policlonal (Pelizon, 2007). Assim, tanto no grupo de
272 animais que foram intoxicados com o veneno botrópico quanto com o crotálico e que a
273 cultura de células esplênicas foram estimuladas com Con-A apresentaram um aumento
274 na produção dessa citocina e quando avaliados os diferentes tratamentos, não houve
275 diferença entre eles.

276 Os níveis basais de IL-1 β quantificados no sobrenadante das culturas de células
277 esplênicas não mostraram alterados em nenhum dos grupos experimentais quando
278 comparados com o grupo controle e o mesmo ocorreu com as culturas que tiveram o
279 estímulo com Con-A. Nas culturas de células esplênicas que receberam o estímulo de
280 LPS, a produção de IL-1 β foi alterada mostrando uma maior produção, pois, TNF e LPS

281 fazem a indução da produção da IL-1 β . Mesmo assim, as quantidades de IL-1 β não
282 foram de relevância já que tem baixos níveis de células especializadas na expressão de
283 IL-1 β na cultura de células esplênicas (Moreira, 2004, Sartim, 2010).

284 CONCLUSÕES

285 A dosagem das citocinas nas culturas de células esplênicas de ratos
286 experimentalmente intoxicados com venenos botrópico e crotálico permite concluir-se
287 que esses venenos agem nesses animais levando a estimulação ou a inibição de TNF- α ;
288 IL-6 e IL-10. O tratamento complementar com o extrato da planta *Mikania glomerata*
289 nos animais que receberam o veneno crotálico inibe a produção de IL-10. São
290 necessários novos estudos com o extrato de *Mikania glomerata* para que possa entender
291 a ação da planta sobre as intoxicações crotálica e botrópica e também explorar qual
292 seria a melhor via para administrá-lo.

293

294 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

295

296 1. ÁVILA-AGÜERO, M. L. PARÍS, M.M.; HU. S.; PETERSON, P.K.;
297 GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE. B.; FAINGEZICHT, I. Systemic cytokine
298 response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr. Emerg. Care*, v.17,
299 n. 6, p.425-429, 2001.

300 2. BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B; TARKKOWSKI, A; HANSON, L.A;
301 MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by
302 Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. *J. Venom. Anim.Toxins*, v. 1, p. 1-11,
303 1995.

304 3. BOGDAN, C. PAIK. J.; VODOVOTZ. Y.; NATHAN, C. Contrasting
305 mechanisms for supression of macrophage cytokine release by transforming
306 growth factor- β and interleukin-10. *J. Biol. Chem.*, v.32, p.23302-23308,1992.

307 4. BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – SVS. Casos de
308 acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades
309 Federadas. 2008. Disponível
310 em:<[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_mes_2008.ppd)
311 [mes_2008.ppd](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_animais_peconhentos_mes_2008.ppd)> Acesso em: 20 mar. 2009.

- 312 5. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
313 Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 5ª edição. Brasília:
314 Ministério da Saúde; 2001. 816p.
- 315 6. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância
316 Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª edição. Brasília:
317 Ministério da Saúde; 2005. 816p.
- 318 7. CLISSA PB. Caracterização do efeito da jararagina sobre a produção e liberação
319 de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino. 2002. 110f. Tese (Doutorado)
320 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 321 8. CONTRAN, R.S. Patologia celular II: adaptações, acúmulos intracelulares e
322 envelhecimento celular. In:_____. Robbins. Patologia estrutural e funcional.
323 5. ed, Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2000. p.37-38.
- 324 9. EITNER, F.; WESTERHUIS, R.; BURG, M.; WEINHOLD, B.; GRONE, H.J.;
325 OSTENDORF, T.; RUTHER, U.; KOCH, K.M.; REES, A.J.; FLOEGE, J. Role
326 of interleukin-6 in mediating mesangial cell proliferation and matrix production
327 in vivo. *Kidney Int* v.51, p.69-78, 1997.
- 328 10. FENWICK AM, GUTBERLET JR RL, JENNAFER A, EVANS JA,
329 PARKINSON CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and
330 classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and
331 Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean*
332 *Society*. V.156, p.617–40, 2009.
- 333 11. HEINRICH PC, CASTELL JV, ANDUS T. Interleukin-6 and the acute phase
334 response. *Biochem J.*, v.265, p.621–636, 1990.
- 335 12. HOULT, J. R. S.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of
336 simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.*
337 *V. 27*, p. 713–722, 1996.
- 338 13. LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., HANSON, L.A. Host response to Bothrops
339 asper snake venom. Analysis of oedema formation, inflammatory cells, and
340 cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, v.17, p. 93–105, 1993.
- 341 14. MAIORANO, V.A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M.A.F.; OLIVEIRA, C.Z.;
342 COUTO, L.B.; GOMESD, O.A.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; PEREIRA,

- 343 P.S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*.
344 *Journal of Ethnopharmacology*. v.102, p.364–370, 2005.
- 345 15. MEYER, T.N.; SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. *Rev Assoc Med Bras*;
346 v.45, n.2, p.181-188, 1999.
- 347 16. MOREIRA, P.R.S. Efeito do estresse crônico na Linfoproliferação e produção in
348 vitro de IFN-gama e IL-10 por células do baço e timo de ratos
349 hipotireoidianos Botucatu, 2006. Dissertação de Mestrado Universidade Federal
350 da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
351 Imunologia, Salvador.
- 352 17. MORS, W.B. Plants active against snake bite. *Econ. Med. Plant Res.*, v.5,
353 p.352–382, 1991.
- 354 18. OLIVEIRA, R.B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE. M.T. Fatores associados à
355 incoagulabilidade sangüínea no envenenamento por serpentes do gênero
356 Bothrops (Risk factors associated with coagulation abnormalities in Bothrops
357 envenoming). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.36, n.6,
358 p.657-663, 2003.
- 359 19. OSWALD, I.P.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; JAMES, S.L IL-10 synergizes
360 with IL-4 and transforming growth factor β to inhibit macrophage cytotoxic
361 activity. *J. Immunol.*, v.148, p.3578-3582, 1992.
- 362 20. PELIZON, A.C.; DENADAI, B.; SCHIAVON, E.V.; MARTINS, D.R.;
363 ZORZELLA, S.F.G.1; SARTORI, A. Produção deficiente de citocinas Th1 em
364 camundongos BALB/c jovens. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.2, p.171-
365 176, 2007.
- 366 21. PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ,
367 J.M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with
368 Bothrops asper and Bothrops jararaca snake venoms. *Toxicon*, v. 38, p. 1253-
369 1266, 2000.
- 370 22. PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v.47, n.1,
371 p. 2-13, 2001.

- 372 23. RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, A.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D.F.
373 Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus*
374 *terrificus* venom. *Toxicon*, v. 44, p.609-616, 2004.
- 375 24. SARTIM, M.A. Avaliação do envolvimento da Galatrox, uma lectina ligante de
376 lactose isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório. 2010.
377 106f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
378 Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- 379 25. SOARES A.M., TICLI F.K., MARCUSSI S., LOURENCO M.V., JANUARIO
380 A.H., SAMPAIO S.V., GIGLIO J.R., LOMONTE B., PEREIRA P.S. Medicinal
381 Plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal**
382 **Chemistry**, v. 12 .p. 2625-41, 2005.
- 383 26. SOARES, A.M., JANU´ARIO, A.H., LOURENCO, M.V., PEREIRA, A.M.S.,
384 PEREIRA, P.S., Neutralizing effects of Brazilian plants against snake venoms.
385 *Drugs of the Future* 29, 1105–1117. SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**.
386 São Paulo: Atheneu, 1990. 138p, 2004.
- 387 27. SUYENAGA, E.S.; RECHE, E.; FARIAS, F.M.; SCHAPOVAL, E.E.;
388 CHAVES, C.G.; HENRIQUES, A.T. Anti-inflammatory investigation of some
389 species of *Mikania*. *Phytoter Res* v.16, p. 519-523, 2002.
- 390 28. WEN FH, CARDOSO JLC, MALAQUE CMS, FRANÇA FOS, SANT´ANNA
391 SS, FERNANDES W, FURTADO MF, FRANCO F, ALBUQUERQUE MJ,
392 KRONCA FJ, NALON MA, RÚBIO GBG, DA SILVA EM, LEITE, JCM.
393 Influências das alterações ambientais na epidemiologia dos acidentes ofídicos e
394 na distribuição geográfica das serpentes de importância médica nos estados de
395 São Paulo e Paraná, 1988-1997. *Inf. Epidemiol. SUS*,; v.11, n.1 p.45-47, 2002.
- 396 29. ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; GUTIÉRREZ, J.M.;
397 TEIXEIRA, C.F.P. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of
398 proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in
399 leukocyte infiltration. *Toxicon*, v.46, p. 806-813, 2005.