

Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase a toxicidade renal

Study of toxicity of crotalic and bothropic species in ofidic accidents, with an emphasis in renal toxicity

Estudio de la toxicidad de las especies crotalicas y botrópicas en accidentes ofidicos, con énfasis en toxicidad renal

Isac de Castro*

RESUMO: Os acidentes ofídicos possuem uma taxa de letalidade mundial de 2,3%, no Brasil chega a 6%. Nos acidentes crotálicos e botrópicos podem ocorrer insuficiência renal aguda (IRA) causada principalmente por necrose tubular aguda (NTA). As principais frações tóxicas no veneno crotálico é a crotoxina e a fosfolipase A2, no veneno botrópico são as metaloproteinases e a botropsina. O veneno crotálico pode levar a alterações glomerulares e nos túbulos proximais, entre as principais causas da IRA por NTA consta a rabdomiólise, já o veneno botrópico pode levar a formação de trombos, levando o rim a isquemia pela diminuição da perfusão sanguínea. O comprometimento renal por acidentes ofídicos por apresentar comprometimento sistêmico, deixa ainda obscura sobre a patogênese a ação direta do veneno, bem como da terapia com soro antiofídico que da mesma forma ainda não está esclarecido em sua ação em diminuir uma potencial ação direta do veneno em tecido renal.

DESCRITORES: Toxicidade renal, Acidentes ofídicos, Animais peçonhentos

ABSTRACT: Ofidic accidents present world lethality of 2.3% and in Brazil reaches 6%. In crotalic and bothropic accidents, acute renal insufficiency (ARI) can ensue caused mainly by acute tubular necrosis (ATN). The main toxic fractions in crotalic venom are crotoxin and A2 phospholipase, whereas bothropic venom consists in metalloproteinases and bothropsin. Crotalic poison can cause glomerular and proximal tubules alterations, and among the main causes of ARI due to ATN is rabdomiolysis, whereas bothropic venom can cause to thrombus formation, causing kidney ischemia due to sanguineous perfusion reduction. Renal compromising because of ofidic accidents, due to presenting systemic compromising, still keeps unclear, as regards the pathogenesis, the venom direct action poison, as well as anti-ofidic serum therapy, and there is not a clear description about how to reduce the potential direct action of the venom in renal tissue.

KEYWORDS: Renal toxicity, Ofidic accidents, Venomous animals

RESUMEN: La mortalidad mundial de los accidentes ofidicos alcanza 2.3% y en el Brasil alcanza el 6%. En accidentes crotalicos y botrópicos, la insuficiencia renal aguda (IRA) puede sobrevenir, causado principalmente por la necrosis tubular aguda (NTA). Las fracciones tóxicas principales en venenos crotalicos son la crotoxina y el fosfolipase A2, mientras que el veneno botrópico consiste en metaloproteinases y bothrops. El veneno crotalico puede causar alteraciones glomerulares y en los tubulos proximales, y entre las causas principales de IRA debido a NTA está la rabdomiolisis, mientras que el veneno botrópico puede causar la formación de trombos, causando la isquemia del riñón debido a la reducción de la perfusión sanguínea. El comprometimiento renal debido a los accidentes ofidicos, por presentar comprometimiento sistêmico, todavia es confuso en lo que concierne a la patogênese, la acción directa del veneno, tan bien como la terapia con suero anti-ofidico, y no hay una descripción clara sobre cómo reducir la acción directa potencial del veneno en el tejido renal.

PALABRAS-LLAVE: Toxicidad renal, Accidentes ofidicos, Animales venenosos

Introdução

A convivência do homem com serpentes remonta ao próprio processo evolucionário, desde a época em que o fogo não era dominado por nossos ancestrais. Ainda no século XXI nos preocupamos com as serpentes, e por certo estas conti-

nuam a povoar o nosso imaginário e a causar acidentes entre os humanos, como em eras passadas. Com o desbravamento das últimas reservas naturais do globo terrestre, os acidentes ofídicos têm marcado sua presença de maneira constante, e certamente, ainda nos acompanharão por muitos séculos.

Serpentes peçonhentas

São serpentes com capacidade de inocular veneno, dentre estas as consideradas de interesse médico, são aquelas denominadas tanatofídeas, aquelas que podem causar morte aos seres humanos. A posição do dente inoculador na cavidade bucal da serpente é o ele-

* Especialista em Bioestatística pelo Conselho Federativo de Biologia – CFBIO. Biólogo pela Universidade Presbiteriana Mackenzie, Mestre e Doutor em Medicina pela Universidade Federal de São Paulo. Docente do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário São Camilo. E-mail: egito@usp.br

mento diferenciador entre serpentes peçonhentas ou não: as serpentes proteróglifas (dente inoculador fixo na região anterior bucal) e as solenóglifas (dente inoculador móvel na região anterior bucal) são as que oferecem real risco quanto a inoculação de veneno na ocorrência da mordedura do animal (Borges, 2001). Podem ocorrer variações na ação da peçonha que, em geral, é a mesma dentro de um mesmo gênero, mas podem ocorrer diversas variações: ontogênicas, sazonais, regionais e relacionadas ao dimorfismo sexual (Glen et al, 1983: 34;44).

Epidemiologia

Existem no mundo cerca de 3.000 espécies de serpentes, sendo que 410 são consideradas peçonhentas e/ou venenosas. A Organização Mundial de Saúde calcula que ocorram no mundo 5.400.000 acidentes ofídicos por ano com 125.345 óbitos, correspondente a uma taxa de letalidade de 2,3% (Chippaux, 1998).

No Brasil, em 1999, haviam sido cadastradas 256 espécies, sendo 69 consideradas venenosas e/ou peçonhentas, destas 32 pertencem ao gênero *Bothrops*, 6 ao gênero *Crotalus*, 2 ao gênero *Lachesis* e 29 ao gênero *Micrurus*. Estes quatro gêneros acrescidos das serpentes do gêneros *Porthidium* e *Bothriopsis* constituem a família Viperidae (Barravieira, 1995). A incidência de acidentes ofídicos no Brasil está em torno de 20.000 casos/ano conforme relatos do Ministério da Saúde em 1992. A taxa de mortalidade encontrada foi de aproximadamente 6% dos casos (Jorge, Ribeiro, 1992; Silveira, Nishioka, 1992), sendo os acidentes por animais do gênero *Bothrops* responsável por 86,16% dos casos, e os do gênero *Crotalus* 8,94%, *Lachesis* 2,39% e *Micrurus* 0,63% (Brasil, 1998). Nos acidentes crotálicos, o acometimento re-

nal ocorre por necrose tubular aguda (NTA) (Azevedo-Marques et al, 1985), sendo que a prevalência de insuficiência renal aguda varia de 9 a 31% nestes casos e de 12% nos acidentes por veneno botrópico (Cupo et al, 1985).

Veneno botrópico e crotálico

Cabe compreender a ação diferenciada entre o veneno botrópico e crotálico, identificando as suas principais frações e respectivas propriedades. No veneno crotálico encontra-se (Breithaupt, 1976:24;33;40): Fosfolipase A₂, Crotopotina, Crotoxina, Crotamina e Girotoxina. No veneno botrópico, as principais frações são (Homsí-Brandeburgo et al, 1998; Kawano et al, 2002): Botropsina I e II, Trombocitina, Jararacina, fator ativador da Bradicinina (Hawgood, 1997), metaloproteínas, Jararacafibrase, fração IV e V com ação miotóxica (Bruses et al, 1993), e outras enzimas pro-coagulantes. Por outro lado, sabe-se que uma das principais frações da peçonha da *Bothrops jararacussu* – a Bothropstoxin-1 (Bthtx-1), é uma fosfolipase A₂-“like” (Spencer et al, 2002). Assim, as fosfolipases são constituintes tanto do veneno botrópico como do crotálico.

Ações fisiopatológicas dos venenos

Veneno crotálico:

Atividade miotóxica:

Consiste na ação tóxica do veneno sobre o tecido muscular, esta se dá pela ação de duas substâncias específicas, a Fosfolipase A₂ e a Crotopotina, quando juntas recebem o nome de Crotoxina, constituindo assim um heterodímero. A ligação entre elas é fraca e reversível podendo ser encontrada no veneno sob a forma livre ou associadas entre si. A ação da Fosfolipase A₂

ocorre especificamente sobre a hidrólise de fosfolípidios na membrana plasmática que é potencializada pela ação da crotoxina (Fortes-Dias et al, 1994). A crotoxina pode levar à alteração nos canais de sódio da membrana plasmática das células musculares, com consequente elevação de níveis do sódio intracelular (Hendon et al, 1971). A ação miotóxica sistêmica caracteriza-se pela liberação de mioglobina no sangue e sistema linfático, podendo levar a rabdomiólise, com elevação nos níveis de creatinofosfoquinase (CPK), desidrogenase láctica (DHL) e aspartato amino transferase (TGP) (Silveira et al, 1992).

Atividade neurotóxica:

As frações responsáveis pela ação tóxica em neurônios são: crotoxina, convulxina e giroxina, sendo a primeira a de maior potencial lesivo. Sua principal ação é o bloqueio da ação sináptica, mais especificamente na pré-sinapse, bloqueando a ação da acetilcolina. As manifestações clínicas mais evidentes são: alterações neuromusculares, convulsões, perturbações respiratórias e circulatórias (Clark et al, 1997:48).

Atividade nefrotóxica:

A insuficiência renal aguda (IRA) ocorre sobretudo por necrose tubular aguda – NTA (Chugh et al, 1994). Os principais danos renais ocorrem por alterações glomerulares e na ultra-estrutura das células dos túbulos proximais e obstrução da luz tubular. Entre as principais causas que levam a IRA por NTA encontram-se a rabdomiólise, sendo a fração heme, a mais nefrotóxica (Zager, 1996; Schmidt et al, 1976).

Atividade hepatotóxica:

A ação tóxica sobre os hepatócitos é relevante manifestando-se por alterações das enzimas hepáticas

como alanina, alanintransferase, e a aminotransferase (Mohamed et al, 1981).

Veneno botrópico:

Atividade proteolítica local:

O veneno botrópico, inicialmente no local da picada, pode causar uma ação proteolítica intensa com subsequente processo inflamatório generalizado, ocasionando edema e até necrose local. A Jararacina e outras metaloproteinasas respondem por esta ação proteolítica (Costa et al, 2002), que também conta com a ação miotóxica da PLA₂ - "like" (Bonfim et al, 2001).

Atividade hemorrágica:

O evento hemorrágico ocorre pela ação direta do veneno sobre a parede dos vasos, causando desde um aumento maior na permeabilidade – pela destruição da membrana basal – até a sua ruptura levando a sangramento. A hemorragia é dependente da concentração de veneno inoculada, podendo ocorrer até mesmo distalmente do local da picada. As frações hemorrágicas foram identificadas e denominadas de hemorraginas (Farsky et al, 1999).

Atividade nefrotóxica:

A ocorrência da insuficiência renal aguda se dá em processos de envenenamento em que há comprometimento circulatório intenso, bem como o da hemostasia, levando a formação de trombos principalmente pela ação da hemorragina (Kamigreti et al, 1991). Ocorre também a participação das miotoxinas e das frações proteolíticas do veneno sobre o rim (Barbosa et al, 2002; Boer-Lima et al, 2002).

Alterações hemostáticas dos venenos ofídicos (crotálico e botrópico)

Entre as ações dos venenos ofídicos, a que possui maior letalidade

é a que diz respeito às alterações hemostáticas (Figura 1).

Quanto aos efeitos na coagulação, as alterações podem ocorrer principalmente em três locais distintos: diretamente no Fator X (FX); sobre a protrombina, formando trombina; e alterando o fibrinogênio, levando a formação de fibrina. As modificações plaquetárias podem ocorrer precocemente pelo elevado consumo de plaquetas, afetando a coagulação. De maneira indireta, ocorre a formação de fibrinólise do trombo e desencadeamento de fibrinólise primária (Nahas, 1979) (Hutton, Warrell, 1993). Ainda cabe ressaltar a ação lesiva do veneno sobre a vasculatura principalmente na região da camada íntima (proteólise) (Hati et al, 1999).

Um mesmo veneno pode agir em pontos diversos do mecanismo hemostático e com intensidade variável, dependendo do tipo do ve-

veno e de sua concentração (Hati et al, 1999).

As aparentes discrepâncias no modo de ação do veneno ofídico decorrem do fato de que diferentes concentrações foram usadas nas pesquisas *in vitro* e *in vivo*. Um outro enfoque para melhor compreensão do veneno ofídico é observar o tipo de ação predominante da peçonha, levando-se em conta a quantidade de veneno inoculado, bem como o acesso deste a circulação sanguínea. O veneno botrópico ao penetrar lentamente na circulação desfibrina o sangue, tanto pela geração de trombina como pela ação direta sobre o fibrinogênio. Se a penetração é rápida e a concentração total é pequena, essa desfibrinação é precedida de hipercoagulabilidade que dura alguns minutos. Se a concentração é elevada, e pela via venosa, há morte rápida, dentro de minutos, por coagulação intravascular maciça, seguida de liquefação do sangue

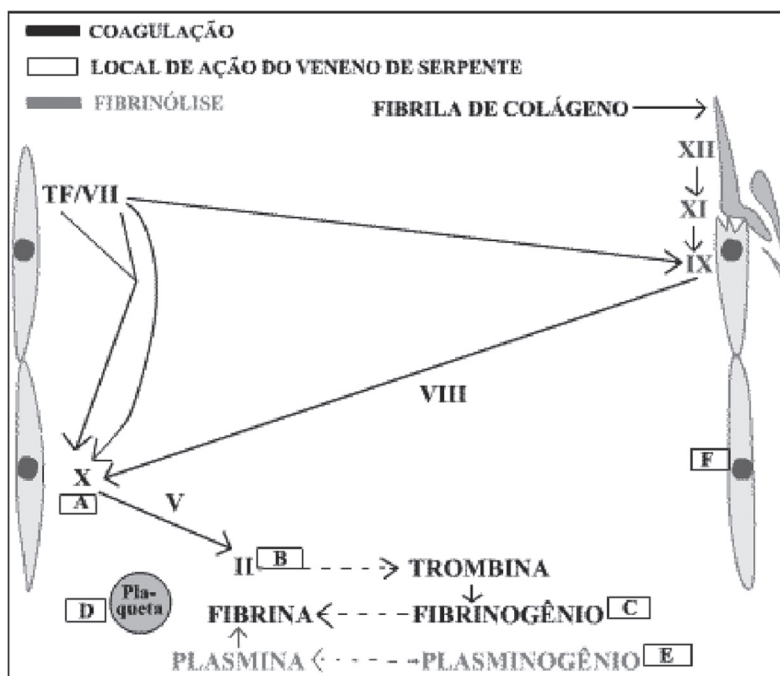


Figura 1. Diferentes modos de ação dos venenos de serpente no mecanismo hemostático. A = ativando o FX, B = ativando o FII, C = atuando diretamente sobre o fibrinogênio, D = agregando as plaquetas, E = ativando diretamente o mecanismo fibrinolítico, F = lesando o vaso sanguíneo (proteólise) (Nahas, 1979).

pela fibrinólise posterior (Rosenfeld et al, 1970).

O Quadro 1 demonstra os diversos pontos de ação, bem como o mecanismo de coagulação entre diversas espécies do gênero

Crotalus e *Bothrops*. Nota-se que o veneno botrópico possui uma ação predominante no eixo da coagulação, enquanto o crotálico predomina na ação fibrogênica e plaquetária.

Soroterapia

Outro aspecto importante refere-se aos efeitos da soroterapia em pacientes vítimas destas peçonhas (Barravieira, 1995). Não está defi-

Quadro 1. Alterações hemostáticas de acordo com a espécie de serpente do gênero *Crotalus* e *Bothrops*

Espécie	Efeito	Fração representativa
<i>Bothrops jararaca</i>	ativação do fator I, II, V, VII e X ^a ; trombomodulina dependente ^b	Batroxobina ^b , Botrojararacina ^a
<i>Bothrops Atrox</i>	ativação do fator V, VIII e XIII ^a ; trombomodulina dependente ^b ; ativação do fator Von Willebrand ^d	Trombocitina ^a Batroxobina ^b Botrocetina ^{b,d}
<i>Crotalus adamenteus</i>	Enzima com atividade trombina-like ^a	Crotalase
<i>Crotalus Atrox</i>	Digestão da cadeia beta e gama ^c	Protease II e III e Atrolysin ^c
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Proteólise ^d	Crotalocitina ^d
<i>Crotalus horridus horridus</i>	Ativação da fosfolipase A ₂ endógena ^d	Convulxina ^d

(^a) ação pró-coagulante, (^b) ação anticoagulante, (^c) ação fibrinogênica direta, (^d) estímulo da agregação plaquetária (Hati et al, 1999:38;77).

nitivamente estabelecido se o soro antiofídico poderia ter alguma ação deletéria a nível renal em acidentes ofídicos, excluindo-se neste caso, os processos de reação anafilática ao soro anti-ofídico (Boghner, 1991).

O comprometimento renal por acidentes ofídicos, em especial a necrose tubular aguda, tem a patogênese ainda não bem estabelecida. Verifica-se que diversos fatores poderiam contribuir para a instalação de IRA, entretanto, ainda não foi demonstrado um possível efeito tóxico direto da peçonha sobre túbulos renais, nem se a soroterapia anti-ofídica poderia prevenir estes efeitos tóxicos tubulares diretos.

Veneno crotálico e a evidência da toxicidade renal

A evidência de que o acometimento renal ocorre de maneira

precoce no acidente ofídico se revela pelo fato dos rins serem o primeiro órgão-alvo em que a peçonha é detectada, estando depois presente em outros órgãos, como baço e cérebro. Além disto, o rins apresentam concentrações do veneno até 50% maiores do que a concentração plasmática, acarretando maior risco de lesão renal (Gomes et al, 2002).

A peçonha é de excreção predominantemente renal, fazendo com que os mecanismos de concentração e transporte tubular favoreçam a ocorrência de toxicidade celular direta. A rapidez com que a IRA pode ocorrer e a alta prevalência de falências renais após acidentes crotálicos corroboram para esta hipótese. Além deste efeito tóxico tubular, outros fatores estão certamente envolvidos na patogênese da IRA, como a mioglobínúria decorrente de rhabdomiólise acentuada, diag-

nosticada por elevações significativas do CPK, TGO e DHL, e pela hemólise demonstrada pela elevação da hemoglobina livre na presença de hematócrito normal (Ownby et al, 1984:53).

Diversos fatores contribuem para a vasoconstrição e hipoperfusão renal na rhabdomiólise. A necrose muscular causa dramática formação de terceiro espaço, levando a depleção de volume intravascular. Além disso, a rhabdomiólise ativa a cascata de citocinas e endotoxinas, acentuando as alterações hemodinâmicas renais e alterando a função ventricular esquerda. Trabalhos posteriores demonstraram que o pigmento heme era o principal componente nefrotóxico da mioglobina (Zager, 1991; Sharma et al, 1987). Três mecanismos constituem a base da toxicidade da proteína heme: vasoconstrição renal, formação de cilindros intralumi-

nais e citotoxicidade direta (Zager, 1992). Finalmente, Zager e colaboradores (1993) demonstraram que a infusão de mioglobina provocou redução da concentração de adenosina trifosfato (ATP) no córtex renal de animais hipotensos, causando acentuada piora da lesão tissular com o desenvolvimento de IRA anúrica (Azevedo-Marques et al, 1985).

A proteína heme liga-se ao óxido nítrico (NO) que é um importante vasodilatador endógeno renal (Sharma et al, 1987). Maree demonstrou que os inibidores da NO sintase agravam enquanto a suplementação de NO protege contra o desenvolvimento de IRA no modelo do glicerol (Maree et al, 1994).

A vasoconstrição renal pode também potencializar a toxicidade da proteína heme, aumentando a formação de cilindros e promovendo maior reabsorção tubular proximal desta proteína, e consequentemente maior lesão celular.

O veneno da *Naja haje* produz alterações renais importantes, mais especificamente na córtex renal, onde produz exuberantes alterações em túbulos proximais: comprometimento lisossomal, lesão das cristas mitocondriais e necrose das células dos túbulos proximais. Na fase inicial da lesão tubular pelo veneno ocorre a diminuição da atividade da succinato desidrogenase na mitocôndria em células epiteliais proximais. Esta enzima está relacionada a transformação do succinato em fumarato na cadeia de formação do malato dentro do ciclo do ácido cítrico da respiração mitocondrial. Os ácidos graxos insaturados parecem estar relacionados a esta disfunção mitocondrial decorrente da ação da fosfolipase A_2 que gera a formação de peróxidos como subproduto oxidativo (Rahmy, 2001:66).

Dentre os vários componentes do veneno, a fosfolipase A_2 é prova-

velmente o mais forte candidato a agente desta lesão celular direta. A fosfolipase A_2 constitui-se em uma família de enzimas que atuam sobre fosfolípidos gerando ácidos graxos livres e lisofosfolípidos. A sua ativação está associada à degradação da membrana plasmática e mitocondrial, comprometendo as reservas energéticas e a permeabilidade das membranas. Em muitas células, a fosfolipase A_2 é a enzima que regula a liberação do ácido aracdônico, cuja metabolização gera radicais livres que tem potencial lesivo e podem causar vasoconstrição renal comprometendo o fluxo sanguíneo e a liberação de oxigênio para os tecidos (Siesjo et al, 1989).

Monteiro e cols. demonstraram que o veneno crotálico em rim isolado tem a capacidade de aumentar a pressão de perfusão e o fluxo urinário, bem como, diminuir a filtração glomerular e o transporte de sódio tubular, evidenciando que o veneno crotálico tem a capacidade de causar toxicidade glomerular direta, bem como, alterar a reabsorção de sódio em túbulos proximais. A lesão tubular parece estar envolvida com a ativação de mediadores lipídicos e aminas vasoativas sensíveis a dexametasona, enquanto a lesão glomerular e a vasoconstrição renal estariam envolvidas com a formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano, sensíveis a indometacina. Além disto, a inibição dos canais de cálcio nifedipina-sensíveis reverte o processo lesivo da peçonha crotálica no glomérulo e vasculatura renal (Martins et al, 1998).

A crotoxina e a girotóxina, frações do veneno crotálico, parecem ter um papel importante como responsáveis pela toxicidade direta renal. A crotoxina tem como alvo a vasculatura renal, os glomérulos e túbulos renais. Esta toxina age aumentando a permeabilidade da vasculatura renal e causa lesão em

células endoteliais, possivelmente mediada pela fosfolipase A_2 , principal componente da crotoxina, que ataca as membranas celulares, aumenta a permeabilidade e libera radicais peróxidos (Monteiro et al, 2001). Por outro lado, a girotóxina apresenta toxicidade tubular, manifestada pela diminuição da reabsorção tubular de sódio, sem diminuição do ritmo de filtração glomerular. (Martins et al, 2002).

Veneno botrópico e evidência da toxicidade renal:

O veneno botrópico, após a sua inoculação, permanece na pele (mais de 50% do volume total), sendo este o primeiro órgão acometido, agindo posteriormente em músculos e rins, não alcançando neste último órgão concentrações maiores do que em músculos. A alta concentração na pele é condizente com os efeitos clínicos causados pelo veneno, incluindo inchaço, dor, pústulas, equimoses e hemorragia, podendo causar necrose local. Outros efeitos do veneno incluem: choque cardiovascular, mioglobulinúria, e mais especificamente nos rins glomerulonefrite, necrose tubular aguda e necrose cortical (Feitosa et al, 1997:50;70).

O veneno botrópico, em concentração subletal, causa alterações funcionais renais, como diminuição da filtração glomerular, da diurese e do fluxo plasmático renal em ratos. A diminuição dos níveis de fibrinogênio e hematócrito e a presença de hemólise intravascular são bem marcantes. O aumento do DHL plasmático e da hemoglobina livre também são observadas, ficando evidenciada a participação massiva da deposição de fibrina nos capilares glomerulares e da hemólise intravascular como os fatores mais importantes na etiopatogenia da insuficiência renal aguda por

acidente botrópico (Burdmann et al, 1993).

O efeito direto do veneno botrópico foi descrito por Monteiro e cols. em estudo de rim isolado, em que se observou diminuição da pressão de perfusão, do fluxo urinário, da reabsorção proximal de sódio e da redução do clearance osmolar. Fica claro que a lesão renal ocorre independentemente da mioglobinúria e de outros fatores inflamatórios sistêmicos. Os túbulos proximais renais perdem a capacidade funcional, demonstrada pela maior excreção de sódio (Serra et al, 1999). Os estudos *in vitro* com túbulos renais isolados e portanto, na ausência de fatores hemodinâmicos e sistêmicos, possibilitou a demonstração de efeitos tóxicos diretos do veneno encontrados por Collares-Buzato e cols. em células epiteliais imortalizadas MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), em que o veneno botrópico aumentou a liberação de DHL e diminuiu a incorporação do Vermelho Neutro. Este efeito lesivo sobre a viabilidade celular veio acompanhado de alterações do citoesqueleto, especificamente sobre ocludinas e caderinas, envolvidas nas junções entre as células (Collares-Buzato et al, 2002).

Outros estudos demonstraram na análise histológica a ocorrência de dilatação de túbulos proximais e necrose tubular aguda. Interessante notar que a indometacina, inibidor da ciclo-oxigenase, não teve nenhum efeito em reverter a perda funcional dos túbulos proximais (Havt et al, 2001:62).

A atividade tóxica direta do veneno botrópico ficou bem evidenciada em túbulos renais isolados de rins de ratos oxigenados porém em túbulos submetidos à hipóxia/reoxigenação encontrou-se uma atenuação da lesão da hipóxia e reoxigenação ao adicionar veneno botrópico em baixa concentração, achados estes de Zager e cols. (Zager

et al, 1993) também encontraram efeito protetor semelhante com os venenos da *Naja Haje* e da *Apis mellifera*. Estes venenos ao sofrerem contínuas diluições apresentavam efeito protetor frente aos efeitos deletérios da hipóxia. Quando a fosfolipase A₂ foi adicionada aos túbulos proximais oxigenados, ocorreu lesão celular, mas esta enzima foi protetora em túbulos hipóxicos. Zager justifica que tanto o excesso quanto a depleção de fosfolipase A₂ são deletérios para as células epiteliais. A homeostase celular se manteria durante a hipóxia através da suplementação desta enzima à célula, previamente depletada pela falta de oxigenação. Outras frações do veneno botrópico parecem estar envolvidas na nefrotoxicidade renal, como a lecitina que inibe a proliferação de células renais (Pereira-Bittencourt et al, 1999). A lecitina poderia ter um papel prejudicial na isquemia renal causada pelo acidente botrópico, através da inibição da regeneração celular.

Efeito das isoformas da fosfolipase A₂ dos venenos crotálico e botrópico

A lesão e/ou proteção promovida pelo veneno botrópico é acompanhada de alterações na produção de radicais peróxidos, os quais se correlacionaram com a liberação de DHL. O excesso de fosfolipase A₂ promove em células oxigenadas acúmulo de ácidos graxos, bem como, estimula a produção de radicais superóxidos e a quebra de fosfolípidos de membranas celulares, causando lesão celular (Zeller, 1997). O isolamento de uma fosfolipase A₂ "like" da fração IV do veneno botrópico foi obtida por Bonfim e cols., através de cromatografia por HPLC. Esta fosfolipase é dependente de cálcio e inibida na presença de cobre com zinco e cobre com magnésio. Foi demons-

trado que a crotapotina da *Crotalus durissus terrificus* inibe a atividade desta fosfolipase da *Bothrops jararacussu*, indicando que ambas devem competir pelo mesmo sítio de ligação *in vivo*.

Para Sapirstein e cols. o papel da fosfolipase A₂ na citotoxicidade fica bem evidenciada pelo aumento de cálcio citosólico, pela depleção de ATP e geração de espécies reativas de oxigênio. Muitas isoformas estão presentes em vários tipos de células, sendo que especificamente nestes estudos foi demonstrada a presença de uma isoforma de fosfolipase A₂ que está expressa na isquemia renal, no cérebro e na necrose tumoral. Em células que não expressam esta isoforma basalmente, ela pode ser estimulada pela adição exógena de peróxidos, contribuindo para lesão celular (Chaitidis et al, 1998:60).

Em seu modelo Zager diferencia a fosfolipase A₂ secretória e a fosfolipase A₂ do grupo II citosólica, sendo a segunda responsável pela lesão celular, e a primeira apresentando apenas papel fisiológico na célula, Zager demonstrou que o aumento de água oxigenada somente ocorre quando há aumento de ácido aracdônico citosólico, o mesmo não ocorrendo quando ácido aracdônico é exógeno; por outro lado o cálcio citosólico é necessário, mas não suficiente em produzir aumento da toxicidade celular causada pelo hidroperoxido em células que secretam fosfolipase A₂ (Sapirstein et al, 2003). Estes trabalhos vem esclarecer que as isoformas da fosfolipase A₂ que constituem tanto o veneno crotálico como o botrópico não são as mesmas e possuem efeitos distintos, e muitas vezes antagonicos.

Papel do cálcio na atividade tóxica dos venenos ofídicos

O papel do cálcio fica bem evidenciado no estudo do citrato, pois

este elemento esta presente na composição do veneno de serpentes, abelhas, vespas, escorpiões, tarântulas e formigas, possuindo um efeito tampão e quelante de ions de metais divalentes, entre eles figuram o cálcio e zinco de maior importância em venenos ofídicos, pois o cálcio é necessário para ação das fosfolipases A₂ neurotóxicas e miotóxicas, e sem a presença do zinco as metaproteases hemorrágicas tóxicas ficam inativas. Outro papel importante do citrato é a sua propriedade anticoagulante em veneno ofídico correspondendo a 25% do seu peso seco. Em veneno da *Bothrops hasper* o citrato bloqueou completamente a ação da fosfolipase A₂ M II na presença de cálcio, em *Crotalus adamanteus* atenuou a ação tóxica da 5'-nucleotidase e fosfodiesterase (Odell et al, 1998). A respiração mitocondrial sofre ação deletéria da fosfolipase A₂ da *Crotalus durissus terrificus* interferindo na fase F1, F2 e F3 da cadeia respiratória, levando ao edema mitocondrial porem ao adicionarmos EGTA, um sabido quelante de cálcio, o efeito deletério desta fosfolipase A₂ é completamente inibida (Valente et al, 1998). Este achado vem ao encontro do observado em túbulos proximais oxigenados e submetidos a hipóxia/reoxigenação quando adicionado veneno crotálico, claramente a fosfolipase A₂ inibe a respiração mitocondrial em 3 fases distintas, este dano é muito relevante em células do túbulo proximal uma vez que estas são ricas em mitocôndrias pelo alto gasto energético necessário pela reabsorção proximal.

Outras frações do veneno botrópico são dependentes de cálcio, como a Newiedase, uma metaprotease não hemorrágica e fibrinolí-

tica, extraída do veneno da *Bothrops neuwiedi*. Esta metaloprotease é inibida com EDTA, e possui um importante papel de componentes da matriz celular (Rodrigues et al, 2001; Rodrigues et al, 2000). O anticoagulante fator I da *Angkistrodon acutus* que possui marcadamente atividade anticoagulante e esta envolvida com forte atividade hemorrágica, possui dois sítios específicos à cálcio, sem os quais o anticoagulante fica inativo, requerendo, para tanto, de concentrações de cálcio maiores do que 1 mM (Xu et al, 2001). Denotadamente a presença do cálcio parece "despertar" muitas das frações dos venenos ofídicos que estão inativas dentro da bolsa de veneno das serpentes, que ao serem inoculadas no organismo da vítima encontra um meio rico em cálcio (próximos a 1mM) e desencadeiam vários degradativos responsáveis pela toxicidade de muitas frações da peçonha crotálica.

Soro antiofídico

A administração parenteral de soro purificado de cavalos previamente imunizados com o veneno de determinado gênero de serpente, constitui a principal terapia utilizada em todo o mundo para o acidente ofídico, constituindo na sua parte ativa de várias imunoglobulinas que carregam a especificidade para as diferentes frações tóxicas do veneno (Theakston et al, 1991). A capacidade do veneno de inativar as diferentes frações, muitas delas ainda desconhecidas, ainda é obscuro. Outro fator importante a ser considerado é o comprometimento hemodinâmico do paciente, colocando em dúvida como ocorreria a biodisponibilidade do soro (Barral-Netto et al, 1991; Dart et al, 1988).

O soro antibotrópico foi capaz de inativar ação deletéria do veneno botrópico seja em túbulos oxigenados ou submetidos a hipóxia e reoxigenação, adiconado imediatamente após, ou terapêuticamente (5, 10 e 15 minutos); tal ação foi confirmada pela queda da peroxidação lipídica causada pela ação do veneno botrópico. Battellino e colaboradores (2003), em ratos Wistar, também demonstraram que o soro antibotrópico reverte a maioria dos efeitos e distúrbios sistêmicos causados pelo veneno da *Bothrops Jararaca*, como a coagulação, intensa, lesões hemorrágicas e reações inflamatórias; mas quando administrado o soro simultaneamente e até 15 minutos após o veneno ter sido injetado houve reversão do quadro lesivo. Cabe ressaltar que o soro não conseguiu reverter os sintomas locais, como distúrbios na coagulação, lesões hemorrágicas, aumento da permeabilidade vascular e aumento da interação leucócito-endotélio (Battellino et al, 2003). Outro achado relevante se mostra quando avaliada a hiperalgesia local causada pela *Bothrops Jararaca*, em modelo animal, em que o soro botrópico adiminstrado até 15 minutos depois do veneno neutralizou a ação deste (Picolo et al, 2002).

Em estudo prospectivo controlado, os pacientes picados pela *Crotalus atrox* que tiveram posterior soroterapia até 1 hora, tiveram uma sobrevida significativamente maior do que os pacientes que foram tratados após este período (Dart et al, 1988), demonstrando que o tempo de latência entre o acidente ofídico e a soroterapia é de grande importância, seja para a sobrevida do paciente, ou para diminuir a probabilidade de insuficiência renal (Dos Santos, et al, 1992).

REFERÊNCIAS

- Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laurence CJ. Myonecrosis, Myoglobinuria and acute renal failure induced by South America rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* 1985;23:631-6.
- Barbosa PS, Havt A, Faco PE, Sousa TM, Bezerra IS, Fonteles MC, et al. Renal toxicity of Bothrops moojeni snake venom and its main myotoxins. *Toxicon* 2002 Oct;40(10):1427-35.
- Barral-Netto M, Schriefer A, Barral A, Almeida AR, Mangabeira A. Serum levels of bothropic venom in patients without antivenom intervention. *Am J Trop Med Hyg* 1991 Dec;45(6):751-4.
- Barravieira. Disfunção Hepática em pacientes picados por cobras botrópicas e crotálicas em Botucatu Departamento de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de Botucatu; 1995.
- Barraviera B. Ofídios, estudo clínico dos acidentes. 1 ed. Rio de Janeiro: EPUB; 1999.
- Battellino C, Piazza R, da Silva AM, Cury Y, Farsky SH. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by Bothrops jararaca snake venom. *Toxicon* 2003 Apr;41(5):583-93.
- Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Hofling MA. Bothrops moojeni snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Aug;67(2):217-22.
- Boghner BS, Lichtenstein L.M. Anaphylaxis. *New Engl J Med* 1991;324:8297-301.
- Bonfim VL, Toyama MH, Novello JC, Hyslop S, Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, et al. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom. *J Protein Chem* 2001 Apr;20(3):239-45.
- Borges RC. Serpentes Peçonhentas Brasileiras. Belo Horizonte: Atheneu; 2001.
- Breithaupt H. Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus phospholipase A* and its complex with crotafotin. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1976 Mar 16;292(3):271-8.
- Bruses JL, Capaso J, Katz EJ, Pigar G. Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. *J Neurochem* 1993;60(3):1030-42.
- Burdmann EA, Woronik V, Prado EB, Abdulkader RC, Saldanha LB, Barreto OC, et al. Snakebite-induced acute renal failure: an experimental model. *Am J Trop Med Hyg* 1993 Jan;48(1):82-8.
- Chaitidis P, Schewe T, Sutherland M, Kuhn H, Nigam S. 15-Lipoxygenation of phospholipids may precede the sn-2 cleavage by phospholipases A2: reaction specificities of secretory and cytosolic phospholipases A2 towards native and 15-lipoxygenated arachidonoyl phospholipids. *FEBS Lett* 1998 Sep 4;434(3):437-41.
- Chippaux JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ* 1998;76(5):515-24.
- Chugh KS, Jha V, Sakhuja V, Joshi K. Acute renal cortical necrosis--a study of 113 patients. *Ren Fail* 1994;16(1):37-47.
- Clark RF, Williams SR, Nordt SP, Boyer-Hassen LV. Successful treatment of crotalid-induced neurotoxicity with a new polyspecific crotalid Fab antivenom. *Ann Emerg Med* 1997 Jul;30(1):54-7.
- Collares-Buzato CB, de Paula LS, Cruz-Hofling MA. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by Bothrops moojeni snake venom in cultured renal tubular epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002 Jun 1;181(2):124-32.
- Costa EP, Clissa PB, Teixeira CF, Moura-da-Silva AM. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. *Inflammation* 2002 Feb;26(1):13-7.
- Cupo P, Azevedo-Marques MM, Hering SE, Menezes JB. Acidentes ofídicos: análise de 102 casos. 21º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [4], 23. 1985. Ref Type: Abstract
- Dart RC, Goldner AP, Lindsey D. Efficacy of delayed administration of crotalid antivenom and crystalloid fluids. *Toxicon* 1988;26(12):1218-21.
- Dos-Santos MC, Goncalves LR, Fortes-Dias CL, Cury Y, Gutierrez JM, Furtado MF. [The efficacy of the bothropic-crotalic antivenom in the neutralization of the main Bothrops jararacussu venom effects]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992 Mar;34(2):77-83.
- Farsky SH, Goncalves LR, Cury Y. Characterization of local tissue damage evoked by Bothrops jararaca venom in the rat connective tissue microcirculation: an intravital microscopic study. *Toxicon* 1999 Jul;37(7):1079-83.
- Faure G, Villela C, Perales J, Bon C. Interaction of the neurotoxic and nontoxic secretory phospholipases A2 with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. *Eur J Biochem* 2000 Aug;267(15):4799-808.
- Feitosa RF, Melo IM, Monteiro HS. [The epidemiology of accidental bites by venomous snakes in the state of Ceara, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997 Jul;30(4):295-301.
- Fortes-Dias CL, Lin Y, Ewell J, Diniz CR, Liu TY. A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. *J Biol Chem* 1994 Jun 3;269(22):15646-51.

- Glenn JL, Straight RC, Wolfe MC, Hardy DL. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon* 1983;21(1):119-30.
- Gomes RT, Camargos RP, Viotti AP, Tavares AP, Revelo MP, Freitas TV. Comparison of the biodistribution of free or liposome-entrapped *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002 Mar;131(3):295-301.
- Hati R, Mitra P, Sarker S, Kumar Bhattacharyya K. Snake Venom Hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology* 1999 Jan;29(1):1-19.
- Havt A, Fonteles MC, Monteiro HS. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. *Toxicon* 2001 Dec;39(12):1841-6.
- Hawgood BJ, Mauricio Rocha e Silva MD: snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology. *Toxicon* 1997 Nov;35(11):1569-80.
- Hendon RA, Fraenkel-Conrat H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971 Jul;68(7):1560-3.
- Hendon RA, Tu AT. The role of crotoxin subunits in tropical rattlesnake neurotoxic action. *Biochim Biophys Acta* 1979 May 23;578(1):243-52.
- Herzig V, John WR, Ferreira dos SW. Intersexual variations in the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891). *Toxicon* 2002 Oct;40(10):1399-406.
- Homsi-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Giglio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988;26(7):615-27.
- Hutton RA, Warrell DA. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Rev* 1993 Sep;7(3):176-89.
- Jorge MT, Ribeiro LA. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992;34:347-54.
- Kamiguti AS, Theakston RD, Desmond H, Hutton RA. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 1991;29(9):1097-105.
- Kawano J, Anai K, Sugiki M, Yoshida E, Maruyama M. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; non-significance of hemorrhagic metalloproteinase. *Toxicon* 2002 Nov;40(11):1553-62.
- Lomonte B, Angulo Y, Rufini S, Cho W, Giglio JR, Ohno M, et al. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon* 1999 Jan;37(1):145-58.
- Maree A, Peer G, Schwartz D, Serban I, Blum M, Wollman Y, et al. Role of nitric oxide in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9 (suppl):78-81.
- Martins AM, Monteiro HS, Junior EO, Menezes DB, Fonteles MC. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 1998 Oct;36(10):1441-50.
- Martins AM, Toyama MH, Havt A, Novello JC, Marangoni S, Fonteles MC, et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon* 2002 Aug;40(8):1165-71.
- Mebis D, Kornalik F. Intraspecific variation in content of a basic toxin in eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. *Toxicon* 1984;22(5):831-3.
- Ministério da Saúde do Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 131. 1998. Brasília, Fundação Nacional de Saúde do Brasil. Ref Type: Generic
- Mohamed AH, Fouad S, El Aasar S, Salem AM, Abdel-Aal A, Hassan AA, et al. Effects of several snake venoms on serum and tissue transaminases, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase. *Toxicon* 1981;19(5):605-9.
- Monteiro HS, da Silva IM, Martins AM, Fonteles MC. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Braz J Med Biol Res* 2001 Oct;34(10):1347-52.
- Moss ST, Bogdan G, Dart RC, Nordt SP, Williams SR, Clark RF. Association of rattlesnake bite location with severity of clinical manifestations. *Ann Emerg Med* 1997 Jul;30(1):58-61.
- Nahas L. Emergência nas Doenças Hemorrágicas. 1 ed. Santa Catarina: Centro de Hematologia Santa Catarina; 1979.
- Nishioka SA, Silveira PV. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am J Trop Med Hyg* 1992 Dec;47(6):805-10.
- Odell GV, Ferry PC, Vick LM, Fenton AW, Decker LS, Cowell RL, et al. Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon* 1998 Dec;36(12):1801-6.
- Ownby CL, Colberg TR, Odell GV. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon* 1984;22(2):227-33.
- Patten BR, Pearn JH, DeBuse P, Burke J, Covacevich J. Prolonged intensive therapy after snake bite. A probable case of envenomation by the rough-scaled snake. *Med J Aust* 1985 Apr 15;142(8):467-9.

- Pereira-Bittencourt M, Carvalho DD, Gagliardi AR, Collins DC. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res* 1999 Sep;19(5B):4023-5.
- Picolo G, Chacur M, Gutierrez JM, Teixeira CF, Cury Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res* 2002 Oct;35(10):1221-8.
- Rahmy NA. Action of cobra venom on the renal cortical tissues: electron microscopic studies. *J Venom Anim Toxins* 2001;7(1):261-71.
- Rodrigues VM, Soares AM, Andriao-Escarso SH, Franceschi AM, Rucavado A, Gutierrez JM, et al. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 2001 Jun;83(6):471-9.
- Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sa R, Rodrigues V, Fontes MR, Giglio JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch Biochem Biophys* 2000 Sep 15;381(2):213-24.
- Rosenfeld G, Cintra PRJ, Valle JR. Envenenamento por serpentes e escorpiões. 8 ed. São Paulo: Artes Médicas; 1970.
- Sapirstein A, Spech RA, Witzgall R, Bonventre JV. Cytosolic phospholipase A2 (PLA2), but not secretory PLA2, potentiates hydrogen peroxide cytotoxicity in Kidney Epithelial Cells. *J Biol Chem* 2003;271(35):21505-13.
- Schmidt ME, Abdelbaki YZ, Tu AT. Nephrotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: an electron-microscopic study. *J Pathol* 1976 Feb;118(2):75-81.
- Serra H, Monteiro A, Fonteles MC. The effect of *Bothrops jararaca* venom on rat kidney after short-term exposure: preliminary results. *Pharmacol Toxicol* 1999 Oct;85(4):198-200.
- Sharma VS, Traylor TG, Gardiner R. Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 1987;26:3837-43.
- Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression an unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:127.
- Silveira PVP, Nishioka AS. South America rattlesnake bite in Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors predictive of renal failure. *Trans R Trop Med Hyg* 1992;86:562-4.
- Speijer H, Giesen PL, Zwaal RF, Hack CE, Hermens WT. Critical micelle concentrations and stirring are rate limiting in the loss of lipid mass during membrane degradation by phospholipase A2. *Biophys J* 1996 May;70(5):2239-47.
- Spencer PJ, Aird SD, Boni-Mitake M, Nascimento N, Rogero JR. A single-step purification of bothropstoxin-1. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(9):1125-7.
- Theakston RDG, Warrell DA. Antivenoms: A list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. *Toxicon* 1991;29(12):1419-70.
- Valente RH, Novello JC, Marangoni S, Oliveira B, Pereira-da-Silva L, Macedo DV. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A2 isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon* 1998 Jun;36(6):901-13.
- Vasconcelos CM, Valenca RC, Araujo EA, Modesto JC, Pontes MM, Brazil TK, et al. Distribution of ¹³¹I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. *Braz J Med Biol Res* 1998 Mar;31(3):439-43.
- Xu X, Liu Q, Xie Y. The Effect of Calcium (II) on the Binding of Anticoagulation Factor I with Activated Coagulation Factor X. *J Protein Chem* 2001;20:33-7.
- Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric ARF. *Kidney* 1996;49:314-26.
- Zager RA. Myoglobin depletes renal adenine nucleotide pools in the presence and absence shock. *Kidney Int* 1991;39:111-9.
- Zager RA. Heme protein ischemic interactions at the vascular, intraluminal, and renal tubular cell levels: Implications of therapy of myoglobin-induced renal injury. *Renal Failure* 1992;14:341-4.
- Zager RA, Schimpf BA, Gmur DJ, Burke TJ. Phospholipase A2 activity can protect renal tubules from oxygen deprivation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Sep 1;90(17):8297-301.
- Zeller AE. Snake venom action: are enzymes involved in it? *Experientia* 1977 Feb 15;33(2):143-50.
- Zingali RB, Jandrot-Perrus M, Guillin MC, Bon C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 1993 Oct 12;32(40):10794-802.

Recebido em 5 de junho de 2006
Aprovado em 27 de junho de 2006