

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação Lato Sensu
Especialização em Saúde – Toxinas de Interesse em Saúde**

Naiara da Silva Rosa

**Envenenamento por *Bothrops jararacussu*: aspectos
anatomopatológicos em músculo esquelético**

SÃO PAULO

2024

Naiara da Silva Rosa

**Envenenamento por *Bothrops jararacussu*: aspectos
anatomopatológicos em músculo esquelético**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de
Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde do
Programa de Pós-graduação Lato Sensu
da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito
básico para a obtenção do título de Especialista em
Toxinas de Interesse em Saúde.
Orientador (a): Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves

SÃO PAULO

2024

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Naiara da Silva Rosa, aluno(a) do Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 11 de janeiro de 2024

Naiara da Silva Rosa
.....

Aluno(a): Naiara da Silva Rosa

Luis Roberto de Camargo Gonçalves
De acordo:.....

Orientador(a): Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Luís Roberto De Camargo Gonçalves

Área: 0

Equipe envolvida: Naiara Da Silva Rosa - (executante);

Título da proposta: "Envenenamento por Bothrops jararacussu: Aspectos anatomopatológicos em músculo esquelético - Revisão Bibliográfica".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, na reunião de 18/01/2024, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.



Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Bothrops jararacussu* envenoming: Anatomopathological aspects in skeletal muscle - Bibliographical review)", protocol number CEUAX 8217170124 (ID 000609), under the responsibility Luís Roberto De Camargo Gonçalves, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute of São Paulo, and was approved in the meeting of day January 18, 2024.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Envenenamento por Bothrops jararacussu: Aspectos anatomopatológicos em músculo esquelético - Revisão Bibliográfica*", protocolado sob o CEUAX nº 8217170124, sob a responsabilidade de Luís Roberto De Camargo Gonçalves, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 18 de janeiro de 2024.



Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais
Instituto Butantan de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Rosa, Naiara da Silva

Envenenamento por Bothrops jararacussu: : aspectos anatomopatológicos em músculo esquelético / Naiara da Silva Rosa ; orientador(a) Luis Roberto de Camargo Gonçalves - São Paulo, 2024.

45 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde.
Versão corrigida final

1. Bothrops jararacussu 2. Fosfolipase A2. 3. Miotoxina. 4. Toxinas I. Gonçalves, Luis Roberto de Camargo. II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

Geração por Sistema Automatizado.
Bibliotecária Bruna Marques CRB8-9303 - Responsável Técnica

À minha mãe Marlene por sempre me apoiar e sem ela eu não estaria aqui, à minha filha Thainá que é a minha maior inspiração na vida, ao meu irmão que é meu melhor amigo e a todos que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Luis Roberto por seus ensinamentos, paciência e inspiração de como ser um professor que faz diferença na vida de suas alunas e alunos. Quando vi em sua mesa um exemplar de Paulo Freire, sabia que estava em boa companhia.

A todos do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan que me receberam com muito carinho, principalmente minhas amigas queridas Beatriz, Catharina, Maria Eduarda, Mariana, Raíssa, Sara, Tamires.

Aos amigos da Especialização da turma de Toxinas que sempre estiveram comigo, principalmente a Karine Marinheiro, que quero levar a amizade pra vida.

Ao Pedro Fontana, o Perereca, pelas dicas que me ajudaram muito.

Aos colegas e amigos que fiz durante este último ano, pessoas que tenho um carinho enorme e muitas estão no meu coração.

A minha professora Dra. Ana Tasaka por não ter deixado com que eu desistisse dos meus sonhos.

E por último, porém não menos importante aos meus amigos maravilhosos: Tamires, Gisele, Jéssica Portes, Maick, Jéssica França, Ana, que sei que sempre posso contar com eles pra tudo.

RESUMO

ROSA, Naiara da Silva. Envenenamento por *Bothrops jararacussu*: aspectos anatomopatológicos em músculo esquelético. 2024. 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

O ofidismo é uma questão importante de Saúde Pública, tanto que está classificado como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) na categoria A, pela Organização Mundial da Saúde (OMS). As maiores vítimas são jovens, principalmente trabalhadores rurais, que muitas vezes pela incapacidade temporária ou até permanente, acabam afetando não só sua família, mas toda a sua comunidade. Anualmente no Brasil, 90% dos casos notificados são causados pelo gênero *Bothrops*. A *Bothrops jararacussu* é provavelmente uma das mais temíveis e imponentes deste gênero. Sua picada é dolorosa e como principal efeito local temos a mionecrose, que pode ter como seqüela uma regeneração muscular deficiente. Seu veneno é composto principalmente por fosfolipases A₂, o motivo de ter um efeito miotóxico importante. Essas fosfolipases são componentes miotóxicos que desestabilizam diretamente a membrana plasmática das células musculares, causando o influxo de íons cálcio e conseqüentemente uma hipercontração e o aparecimento precoce de células com lesões delta. A compreensão da patogênese dos envenenamentos é de fundamental importância para estudos de melhores terapias.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*. Fosfolipase A₂. Miotoxina.

ABSTRACT

ROSA, Naiara da Silva. *Bothrops jararacussu* poisoning: anatomopathological aspects in skeletal muscle. 2024. 45 p. Monograph (Specialist in Toxins of Interest in Health) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

Snakebites are an important Public Health issue, so much so that they are classified as Neglected Tropical Diseases (NTDs) in category A, by the World Health Organization (WHO). The biggest victims are young people, mainly rural workers, who often, due to temporary or even permanent disability, end up affecting not only their family, but their entire community. Annually in Brazil, 90% of reported cases are caused by the *Bothrops* genus. *Bothrops jararacussu* is probably one of the most fearsome and imposing of this genus. Its bite is painful, and the main local effect is myonecrosis, which can result in deficient muscle regeneration. Its venom is mainly composed of phospholipases A₂, which is why it has an important myotoxic effect. These phospholipases are myotoxic components that directly destabilize the plasma membrane of muscle cells, causing the influx of calcium ions and so hypercontraction and the early appearance of cells with delta lesions. Understanding the pathogenesis of poisoning is of fundamental importance for studies of better therapies.

Keywords: *Bothrops jararacussu*. Phospholipase A₂. Myotoxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa com os índices de acidentes botrópicos no ano de 2021.....	13
Figura 2(A). <i>Bothrops jararacussu</i>	14
Figura 2(B). Mapa da distribuição geográfica de <i>Bothrops jararacussu</i>	14
Figura 3. Proporção das diferentes proteínas presentes nos venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	16
Figura 4. Grupo Controle	25
Figura 5. Corte longitudinal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 30 minutos após injeção de veneno <i>Bothrops jararacussu</i>	25
Figura 6. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 30 minutos após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	25
Figura 7. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 30 minutos após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	26
Figura 8. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 1 hora após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	27
Figura 9. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 1 hora após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	27
Figura 10. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 4 horas após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	28
Figura 11. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 24 horas após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	29
Figura 12. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 24 horas após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	30
Figura 13. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 48 horas após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	31
Figura 14. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 72 horas após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	33
Figura 15. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 7 dias após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	34
Figura 16. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 14 dias após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	36
Figura 17. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos com 14 dias após injeção de veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivos Gerais	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Análises histológicas	23
5 RESULTADOS	24
5.1 Avaliação histopatológica	24
5.1.1 Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 30 minutos após o envenenamento	24
5.1.2 Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 1 hora após o envenenamento	26
5.1.3- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 4 horas após o envenenamento.....	28
5.1.4- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 24 horas após o envenenamento.....	29
5.1.5- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 48 horas após o envenenamento.....	30
5.1.6- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 72 horas após o envenenamento.....	32
5.1.7- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 7 dias após o envenenamento.....	33
5.1.8- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 14 dias após o envenenamento.....	35
6 DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	40

INTRODUÇÃO

O envenenamento ofídico é uma questão de Saúde Pública (Gutiérrez et. al., 2017; Chippaux, 1998). Pelos números significativos de ocorrência e letalidade, principalmente nos países em desenvolvimento, acidentes ofídicos estão classificados como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) na categoria A, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Chippaux, 2017). Mundialmente todos os anos, aproximadamente 1,8 a 2,7 milhões de pessoas são acometidas (Gutiérrez et. al., 2017), podendo chegar a 138.000 óbitos e cerca de 400.000 casos após o acidente irão resultar em alguma sequela física ou psicológica (Gutiérrez et. al., 2017; Kasturiratne et. al., 2008).

Jovens, principalmente trabalhadores rurais, são as maiores vítimas. Porém, muitas vezes são eles que proveem a renda familiar e, como acidentes ofídicos podem resultar em uma incapacidade temporária ou permanente, toda a família e comunidade acabam sendo afetados (Ribeiro, 1990; Gutiérrez et. al., 2017; WHO, 2019).

Ao todo foram registrados no ano de 2021 no Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 257.073 casos de acidentes por animais peçonhentos, sendo 31.354 casos acidentes ofídicos, ou seja, 12,20% do total (Brasil, 2022). Neste mesmo ano, os estados do Pará, Bahia e Minas Gerais foram os de maiores números de notificações. A Região Nordeste e a Região Norte com mais casos de óbitos. Estes dados comprovam que a taxa de letalidade é proporcionalmente dependente do tempo no atendimento médico e na administração do antiveneno (Brasil, 2022).

Anualmente no Brasil, 90% dos casos notificados são causados pelo gênero *Bothrops* (Gutiérrez; Lomonte, 1989). Este gênero possui mais de 30 espécies, tendo uma importância significativa por motivos de sua ampla distribuição geográfica, sendo encontrada desde o México até a Argentina.

No país, esse gênero está presente por todo o território nacional e cada região possui uma espécie predominante. Nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, distribuindo-se do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, predomina a espécie *Bothrops jararaca*. Na Amazônia a *Bothrops atrox* é a principal causadora de acidentes e a nas regiões de Centro-Oeste e Sudeste a *Bothrops moojeni* (Melgarejo, 2003).

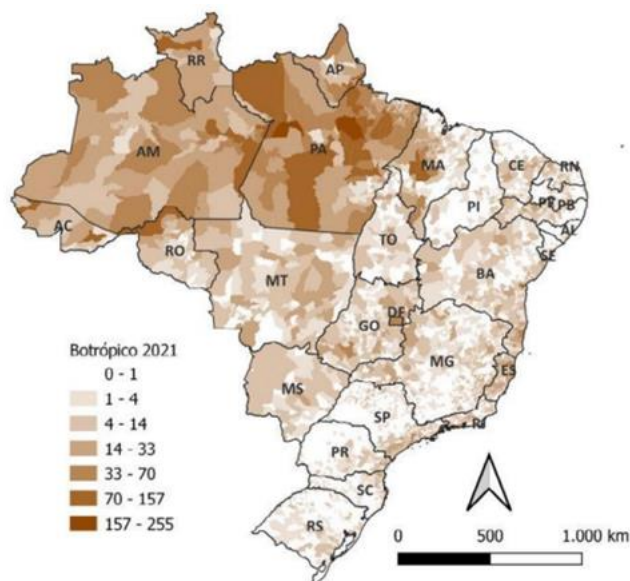


Figura 1: Mapa com os índices de acidentes botrópicos no ano de 2021.

Fonte: Sinan. Distribuição espacial dos acidentes botrópicos no Brasil, 2021 (Adaptado).

Constituído principalmente por proteínas, os venenos são misturas complexas, onde sua composição pode ter variações, inclusive entre um mesmo gênero (Melgarejo, 2003). Estas variações podem decorrer da própria singularidade de cada indivíduo, da sua idade, sexo, dietas, sazonalidade, distribuição geográfica (Jiménez-Porras, 1964). Suas toxinas presentes apresentam diversas funções, que irão influenciar na atividade tóxica, conseqüentemente no quadro fisiopatológico do envenenamento (Jiménez-Porras, 1964; Gutiérrez, Lomonte, 1989).

Nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* encontramos predominantemente as metaloproteinasas de veneno de cobra dependentes de zinco (SVMP), fosfolipases A₂ miotóxicas (PLA₂s), serinaproteinasas de veneno de cobra (SVSPs), e outros componentes ativos encontrados em menores quantidades como proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP), L-aminoácido oxidase (LAAO) (Albuquerque et al., 2020).

O veneno botrópico possui como características as atividades hemorrágicas, proteolíticas e coagulantes (Gutiérrez, Chaves, 1980; Gutiérrez, Lomonte, 1989; Cardoso, 1990; França, Málaque, 2003).

Como efeito clínico local ocorre uma resposta inflamatória significativa, com infiltrado inflamatório nos tecidos afetados (Gutiérrez, Lomonte, 2003). Há

a presença de hemorragia, edema proeminente, dor, equimoses e dermonecrose (Gutiérrez, Chaves, 1980; França, Málaque, 2003). Quando há a presença de edema, requer uma atenção em especial, pois rapidamente pode evoluir para uma síndrome compartimental, resultando em perda de função daquele membro que foi acometido (França, Málaque, 2003).

Os efeitos locais representam uma questão importante, e um dos motivos é que com o rápido desencadeamento das alterações locais, a neutralização pelo antiveneno possui uma adversidade, principalmente em relação ao tempo de sua administração que pode levar horas (França, Málaque, 2003).

Já em relação às manifestações sistêmicas, compreendem-se a presença de hemorragias, causadas principalmente pela ação das hemorraginas presentes no veneno, que são metaloproteínas dependentes de zinco de classe P-III, e também pelo quadro de incoagulabilidade sanguínea, causado pelo consumo dos fatores de coagulação (França, Málaque, 2003). Ocorre o aumento sérico de mioglobina e da enzima creatina quinase (CK), que está presente principalmente nos músculos esqueléticos (Cavalcante et al., 2023).

A insuficiência renal aguda pode acontecer como complicação nos envenenamentos botrópicos tanto por fatores diretos quanto por fatores indiretos do veneno, como exemplo o acúmulo da mioglobina, substância tóxica que pode afetar os túbulos renais (Jimenez et al., 2008; Albuquerque et al., 2020; Cavalcante et al., 2023).

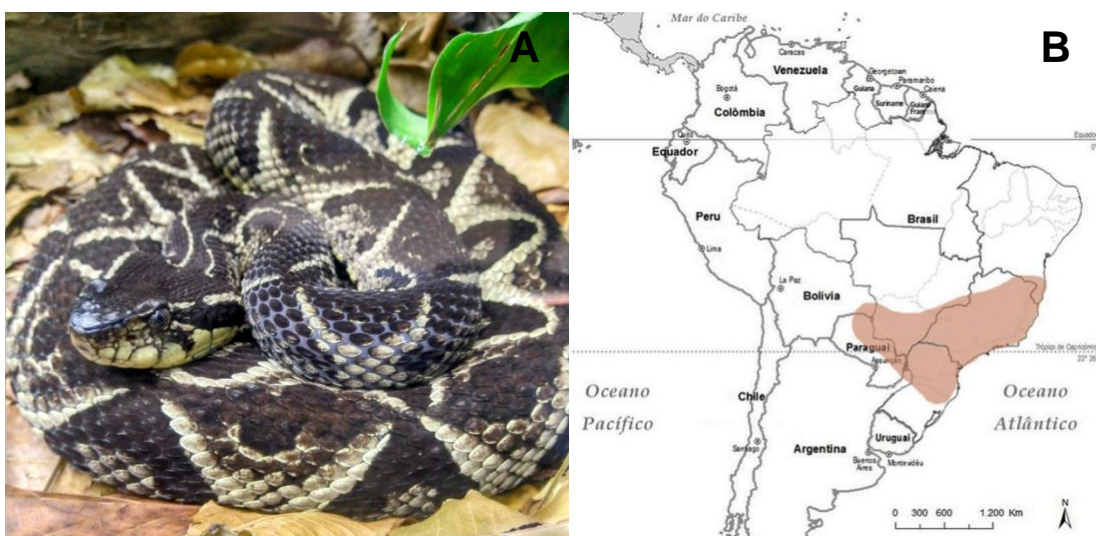


Figura 2: (A) *Bothrops jararacussu* (B) Mapa da distribuição geográfica de *Bothrops jararacussu*.

Fonte: Foto 2(A) Própria autora, 2023. Figura 2(B): da Silva Aguiar et al., 2020.

Jararacussu ou jararacuçu, também conhecida popularmente como urutu dourado ou surucucu-tapete, tem seu nome originado do tupi, significando “jararaca grande” (Milani et al., 1997). É provavelmente uma das mais temíveis e imponentes do gênero *Bothrops*, podendo atingir 1,8 a 2,2 m de comprimento (Milani et al., 1997; Melgarejo, 2003). Sua distribuição geográfica está entre Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (Figura 2B), sendo encontrada nas margens de rios, em ambientes de floretas tropicais (Milani et al., 1997; da Silva Aguiar et al., 2020). É corpulenta, tem uma cabeça triangular avantajada, e possui glândulas de veneno muito desenvolvidas, sendo de todas do seu grupo, a mais eficiente na produção de veneno (Milani et al., 1997). Isso impacta em ser responsável por muitos acidentes graves (Melgarejo, 2003).

Sua picada promove uma dor intensa. A mionecrose é o efeito local mais proeminente e uma das possíveis sequelas após o acidente por *B. jararacussu* é uma regeneração muscular deficiente (Santo Neto, Marques, 2005). Além da mionecrose, ocorre um aumento dos mediadores inflamatórios (Wanderley; Silva; Wong; Ximenes et al., 2014) com uma resposta pronunciada e presença de infiltrado inflamatório (Gutiérrez, Lomonte, 2003). Esta resposta inflamatória acaba amplificando os danos (Wanderley; Silva; Wong; Ximenes et al., 2014).

Em um estudo (Moura-da-Silva et al., 1990) foi feita a comparação de valores séricos de CK entre espécies diferentes do gênero *Bothrops* e foi visto que a miotoxicidade do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* chega a ser cinco a oito vezes maior do que *Bothrops jararaca*, *B. atrox*, *B. erythromelas*, *B. alternatus*, *B. cotiara*.

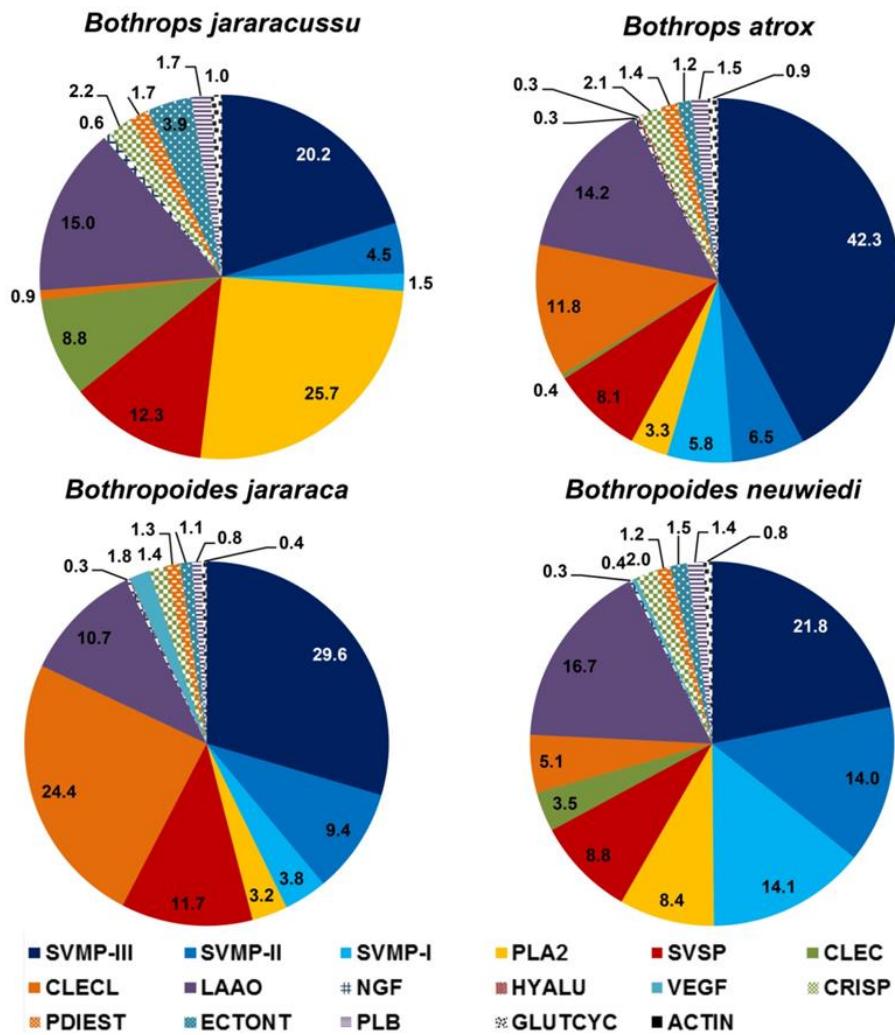


Figura 3: Proporção das diferentes proteínas presentes nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

Fonte: Sousa et al., 2013 (Adaptado).

Venenos possuem diferenças em suas composições e o veneno da *Bothrops jararacussu* é o que mais se diferencia dentre as serpentes deste gênero. Há a predominância das fosfolipases A₂ (PLA₂s) e uma menor quantidade de metaloproteínas de veneno de cobra (SVMPs). Esta proporção está diretamente relacionada com o quadro clínico dos acidentes, por este motivo o seu envenenamento possui uma importante atividade miotóxica (Sousa et al., 2013).

Efeitos locais e atividades de coagulopatia nos envenenamentos botrópicos estão relacionados com toxinas como as PLA₂s, SMVPs e as SVSPs (Sousa et al., 2013).

As PLA₂s são componentes miotóxicos que desestabilizam a membrana plasmática das células musculares, causando o influxo de íons cálcio (Ca²⁺) e consequentemente uma hipercontração (Gutiérrez, Ownby, 2003).

No veneno de *B. jararacussu* encontramos duas miotoxinas. Uma delas se chama Bothropstoxina I (BthTx-I) e por mais que ela tenha similaridade com uma fosfolipase, ela é destituída de atividade fosfolipídica. Diferentemente, a outra miotoxina denominada de Bothropstoxina II (BthTx-II), apresenta esta atividade enzimática (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Gutiérrez et al., 1991).

Já as SVMPs são enzimas dependentes de zinco, responsáveis principalmente pelo efeito hemorrágico dos venenos (Sousa et al., 2013).

E as serinaproteínases de veneno de cobra (SVSPs) são enzimas tipo-trombina, que são análogas à trombina, implicando nos distúrbios de coagulação (Sousa et al., 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nos envenenamentos por *Bothrops jararacussu* há como principal alteração a mionecrose, que ocorre precocemente, resultado da ação direta do veneno nas fibras musculares (Queiroz et al., 1984). As miotoxinas são as responsáveis por estas lesões celulares, que são irreversíveis (França, Málaque, 2003). Todavia, a necrose não é resultante apenas destas toxinas, mas há também o agravamento pelo distúrbio isquêmico e trombose, que ocorrem algumas horas depois (Queiroz et al., 1984; França, Málaque, 2003). Além disso, o veneno de *Bothrops jararacussu* provoca precocemente edema, como resultado da produção de metabólitos do ácido araquidônico e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos (Wanderley; Silva; Wong; Ximenes, et al.). Ou seja, os componentes da resposta imune também causam uma ação tecidual deletéria (Wanderley; Silva; Wong; Ximenes, et al.).

Possui predominantemente em sua composição fosfolipases A₂ ou sua homóloga, que juntas irão causar a degeneração das células musculares. Estas duas miotoxinas são: Bothropstoxina I (BthTx-I), que embora seja homóloga a uma fosfolipase, ela é destituída de atividade fosfolipásica, porém com propriedade para danificar fibras musculares (Homsí-Brandeburgo et al., 1988; Gutiérrez et al., 1991; López-Dávila et al., 2023). Então, a

Bothropstoxina I é uma variante Lys-49, ou seja, ela é cataliticamente não ativa (Gutiérrez et al., 1991). A outra miotoxina é denominada de Bothropstoxina II (BthTx-II), uma fosfolipase ativa Asp-49 (Gutiérrez et al., 1991).

Os estudos demonstram que a primeira ação das miotoxinas é se ligar na membrana plasmática da fibra muscular, rompendo a integridade do sarcolema (Gutierrez e Ownby, 2003).

As membranas plasmáticas das células musculares esqueléticas são acometidas morfológica e funcionalmente. Há uma desestabilização (Gutierrez e Ownby, 2003), a capacidade de regular sua permeabilidade será comprometida, e com isso há um influxo de cálcio, além da liberação de enzimas presentes no citosol, como a creatina quinase. Gutiérrez et al. (1984a) observou este influxo em um estudo com miotoxina de *Bothrops asper*. Como consequência deste aumento da concentração de cálcio, ocorre uma hipercontração dos miofilamentos, promovendo espaços vazios entre as células, uma ativação de fosfolipases e proteases dependentes de cálcio, degeneração de mitocôndrias, resultando em necrose (Gutierrez e Ownby, 2003).

Nas áreas em que a célula perdeu ou teve sua membrana plasmática descontinuada, há a formação focal de áreas degeneradas, que foram chamadas de “lesões delta”, possuem um formato de cunha e ocorrem precocemente, em um período de 15 minutos (Mokri; Engel, 1975).

Realizado estudo com a Bothropstoxina II (BthTx-II) isolada (Gutiérrez et al., 1991), constatou-se que injeções intramusculares desta fosfolipase faz com que haja um aumento de creatina quinase (CK) sérica, com o pico de sua concentração com 3 horas, vindo a diminuir posteriormente (Gutiérrez et al., 1991), além de um importante influxo de cálcio.

Os danos nas fibras musculares ocorrem precocemente, com 15 minutos. Como CK é uma enzima presente no citosol das células musculares esqueléticas e ocorre esse extravasamento nos primeiros momentos, é um reforço para dizer que a miotoxina afeta a membrana plasmática. A BthTx-II tem o comportamento de uma proteína anfifílica, interrompendo a carga negativa da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática.

Com 3 horas, notou-se que havia aglomerados de miofilamentos hipercontraídos com áreas citoplasmáticas ausentes destas. A partir de 6 horas

até 24 horas, o padrão começou a se tornar mais hialino com uma distribuição mais uniforme. O infiltrado inflamatório formado por polimorfonucleares e macrófagos, com 6 horas começou e teve seu pico com 24 horas. Estas células musculares possuíam a membrana plasmática interrompida, porém a lâmina basal permaneceu intacta. A Bothropstoxina II não afetou vasos sanguíneos e nem tecido nervoso intramuscular.

Com 24 horas a fagocitose do material necrótico começou a ocorrer, seguindo posteriormente para uma regeneração bem-sucedida. Com 7 dias já havia evidências de regeneração, e este processo foi ainda mais avançado com 28 dias, onde as fibras regeneradas possuíam diâmetro semelhante à fibras normais, porém seus núcleos eram centralizados, e sem sinais de fibrose (Gutiérrez et al., 1991).

Esta resposta eficiente de regeneração é dada por alguns motivos: a BthTx-II não afeta vasos sanguíneos e nem feixes musculares nervosos, o que é essencial para uma boa regeneração. Além disso, a membrana basal das fibras musculares não foi afetada, continua íntegra (Gutiérrez et al., 1991). Esta resposta se contrapõe com os danos causados pelo veneno total, em que há uma regeneração escassa, presumivelmente por motivos de que nesse caso os nervos, vasos sanguíneos e matriz extracelular são lesionados (Queiroz et al., 1984).

Os estudos demonstram que a primeira ação das miotoxinas é se ligar na membrana plasmática da fibra muscular, rompendo a integridade do sarcolema (Gutierrez e Ownby, 2003).

As membranas plasmáticas das células musculares esqueléticas são acometidas morfológica e funcionalmente. Há uma desestabilização (Gutierrez e Ownby, 2003), a capacidade de regular sua permeabilidade será comprometida, e com isso há um influxo de cálcio, além da liberação de enzimas presentes no citosol, como a creatina quinase. Gutiérrez et al. (1984b) observaram este influxo em um estudo com miotoxina de *Bothrops asper*. Como consequência deste aumento da concentração de cálcio, ocorre uma hipercontração dos miofilamentos, promovendo espaços vazios entre as células, uma ativação de fosfolipases e proteases dependentes de cálcio, degeneração de mitocôndrias, resultando em necrose (Gutierrez e Ownby, 2003).

Esses indícios evidenciam que o local predominante da ação da toxina é a membrana plasmática.

Nas áreas em que a célula perdeu ou teve sua membrana plasmática descontinuada, há a formação focal de áreas degeneradas, que foram chamadas de “lesões delta”, possuem um formato de cunha e ocorrem precocemente, em um período de 15 minutos (Mokri; Engel, 1975).

Queiroz et al. (1984) realizaram estudos *in vivo* para estudar a patogênese das lesões locais causadas por envenenamento de *Bothrops jararacussu*.

Em doses de 80 µg de veneno bruto, injetadas no músculo tibial de ratos swiss, em 10 minutos já apresentava fibras musculares em necrose, de aspecto hialino e miofibrilas condensadas, núcleos picnóticos, com espaços vazios. É um acontecimento precoce, o que demonstra uma ação direta da miotoxina nas fibras musculares. Em alguns animais foram encontrados trombos de fibrina nos vasos sanguíneos. Em um período de 6 horas, a área de necrose coagulativa estava localmente extensa. As fibras musculares afetadas não possuíam mais núcleo aparente e os vasos sanguíneos já não eram mais distinguidos. Hemorragia foi pouco observada em todos os momentos, mas havia vasculite e trombose. Neutrófilos e macrófagos estavam presentes dentro de 24 a 48 horas. O fluxo sanguíneo prejudicado é uma sugestão para essa fagocitose tardia. Com 2 semanas o tecido lesionado foi substituído por tecido fibroso recém-formado, rico em células mononucleares. Já em 2 meses a área necrosada foi totalmente substituída por tecido fibroso e adiposo.

Neste mesmo estudo (Queiroz et al., 1984) ao utilizarem a dose de 5 µg, foram observados núcleos centralizados foram com 4 dias. A maioria das fibras musculares tinha aparência normal, porém algumas possuíam vacúolos. Em 2 semanas já estava praticamente normalizado, com a arquitetura muscular pouco afetada com uma leve fibrose.

Ao utilizarem a dose de 20 µg, tiveram resultados semelhantes a dose de 5 µg, apenas se diferenciando na cicatrização fibrosa, que foi mais intensa e com algumas fibras atrofiadas. Inclusive haviam áreas com infiltrado gorduroso (Queiroz et al., 1984).

E com a dose de 200 µg, Queiroz et al. (1984) viram que os animais apresentaram ulcerações na pele com um ou dois dias. As alterações foram

comparáveis com as que ocorreram na dose de 80 µg, porém mais intensas. Mesmo algumas artérias e veias tendo uma aparência normal, as alterações vasculares foram mais pronunciadas em relação às doses menores. Após 2 semanas, alguns animais ainda apresentavam fibras musculares com restos necróticos. Não houve regeneração nesta dose. A regeneração das fibras musculares foi dose-dependente. Possivelmente esta resposta fraca na regeneração seja causada também por motivo das células satélites serem afetadas e pela isquemia (Queiroz et al., 1984).

No estudo, todos os animais, dos que receberam doses de 80 µg até os de 200 µg, a necrose foi resultado não apenas das miotoxinas, mas também da isquemia causada pelo processo inflamatório e trombose que o veneno promove (Queiroz et al., 1984).

A má regeneração das fibras musculares é uma das sequelas mais comuns no envenenamento por *Bothrops jararacussu*. Santo Neto e Marques (2005) ao estudarem a patogênese das lesões na microvasculatura dos músculos e a revascularização destes nos envenenamentos por *Bothrops jararacussu*, mostraram que para uma boa regeneração é necessário uma microvasculatura intacta, com aporte circulatório adequado, o que não ocorre nesses envenenamentos. Danos na vascularização irão ter correlação com a má regeneração (Santo Neto; Marques, 2005). O tempo das lesões na circulação pode iniciar já nos primeiros 5 minutos, progredindo até 6 horas, quando a degeneração estará completa dos capilares. A lâmina basal intacta impediu que eritrócitos escapassem (Santo Neto; Marques, 2005).

Um estudo clínico patológico (Milani Júnior et al., 1997) que reuniu 29 casos de picadas por *Bothrops jararacussu*, fez o levantamento que desses, 14 pacientes tiveram coagulopatia. O interessante é notar que a maioria deles foram vítimas de cobras menores (58%) o que demonstra a variação ontogenética que ocorre nesta espécie, onde animais mais jovens possuem na composição do seu veneno uma maior quantidade de enzimas pró-coagulantes (Milani Júnior et al., 1997).

Em relação às células satélites, a regeneração eficiente é dependente delas, que são células miogênicas (Tidball; Villalta, 2010) e esse processo inicia-se logo nos primeiros minutos após a lesão. Células inflamatórias, como os macrófagos, liberam fatores miogênicos para estimulá-las. Alterações nesse

processo de ativação das células satélites podem prejudicar a regeneração das fibras musculares (Tidball; Villalta, 2010). Porém com o colapso vascular local que ocorre até 6 horas após o envenenamento, com presença de trombos e degeneração de vasos, existe uma dificuldade de as células inflamatórias chegarem às áreas mionecróticas (Santo Neto; Marques, 2005). Concluíram que mesmo após 3 meses, a regeneração é deficiente e que está relacionado com esses danos na microvasculatura (Santo Neto; Marques, 2005).

Juntamente com a circulação deficitária e a ausência das células satélites, há a probabilidade da má regeneração também ter relação com os danos ao tecido nervoso (Queiroz et al., 2002). O veneno de *Bothrops jararacussu* causa danos progressivos ao tecido nervoso, com degradação de axônios (Queiroz et al., 2002). A desmielinização acontece de forma rápida, em minutos. O estudo de Queiroz et al. (2002) sugere que o veneno atua diretamente nos fosfolipídios da bainha de mielina. Um pequeno número de células inflamatórias foi observado, o que condiz com a ocorrência de trombose, impedindo o fluxo sanguíneo adequado e os leucócitos transportados (Queiroz et al., 1984). Aparentemente esta diminuição de axônios com a deterioração direta das bainhas de mielina pode explicar a atrofia muscular e a má regeneração das células musculares (Queiroz et al., 2002).

Em comparação a patogênese causada pelo veneno de *Bothrops jararaca*, Queiroz et al. (1985) estudaram as alterações causadas pelos fatores hemorrágicos e proteolíticos. O veneno causou hemorragia local, mionecrose e necrose em vasos sanguíneos. Doses mais baixas que 5 µg de veneno bruto não foram observadas mionecrose. Já hemorragia a menor dose de veneno que induziu foi de 1 µg. Isso demonstra que no envenenamento por *Bothrops jararaca*, os fatores hemorrágicos possuem uma maior importância do que as proteases. A primeira alteração foi a hemorragia, a mionecrose em seguida. A mionecrose pode ser, portanto, causada por danos secundários (Queiroz et al., 1985). Com 6 semanas o músculo apresenta regeneração, com diâmetro variável e núcleos centralizados, além de presença de fibrose.

Há uma diferença no envenenamento por *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca*, onde a primeira possui a presença de mionecrose praticamente sem hemorragia.

Vale ressaltar a grande quantidade de PLA₂ presentes no veneno de *B. jararacussu* em comparação a presente no veneno de *B. jararaca* (Moura da Silva et al, 1990; Souza et al., 2013). O veneno de *B. jararacussu* induz uma miotoxicidade direta e local, pela ação dessas miotoxinas. Por outro lado, o veneno de *B. jararaca* induziria uma lesão muscular por via indireta, devido a distúrbios vasculares locais que resultariam em queda de fluxo sanguíneo e isquemia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Discorrer sobre a patogênese e a progressão dos efeitos locais causados pela ação do veneno de *Bothrops jararacussu* em seus diferentes tempos, levando em consideração as alterações anatomopatológicas observadas em tecido muscular esquelético. Abordar a resposta inflamatória local em períodos precoces, assim como o reparo das fibras musculares em tempos mais tardios.

- Verificar em diferentes tempos a progressão do processo inflamatório no tecido muscular esquelético;
- Analisar a mionecrose presente nos envenenamentos por *Bothrops jararacussu*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises histológicas

Nesse trabalho não foram utilizados animais de experimentação. As lâminas utilizadas para a obtenção das imagens utilizada nesse estudo foram obtidas em protocolo aprovado anteriormente pela Comissão e Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo CEUAIB nº3411060821).

Análise histológica do músculo gastrocnêmio de camundongos swiss sob microscópio de luz, com lâminas de cortes corados por meio de H&E, com tempos de 30 minutos, 1, 4, 24, 48 e 72 horas, 7 e 14 dias.

Fotomicrografias das áreas de interesse, utilizando a câmera DFC420 (Leica Microsistemas) acoplada ao microscópio DMLB (Leica Microsystems) em zoom de 100x e 400x (objetivas de 10x e 40x) associados ao software LAS computerized image system – versão 4.5.0 (Leica Microsystems DM).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação histopatológica

5.1.1- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de *VBjussu* 30 minutos após o envenenamento.

Nos cortes histológicos das figuras 5, 6 e 7, temos os efeitos após 30 minutos da injeção intramuscular de 40 µg do veneno de *Bothrops jararacussu* no músculo gastrocnêmio de camundongos. Podemos notar uma extensa área de mionecrose. Nas imagens observamos uma desorganização e ruptura das fibras musculares, com aumento nos espaçamentos entre elas (Figuras 5, 6 e 7). Há o início de leve infiltrado inflamatório (Figura 5). Precocemente vemos alterações chamadas de “lesões delta” (Figura 6 e 7) e uma leve hemorragia (Figura 7B).

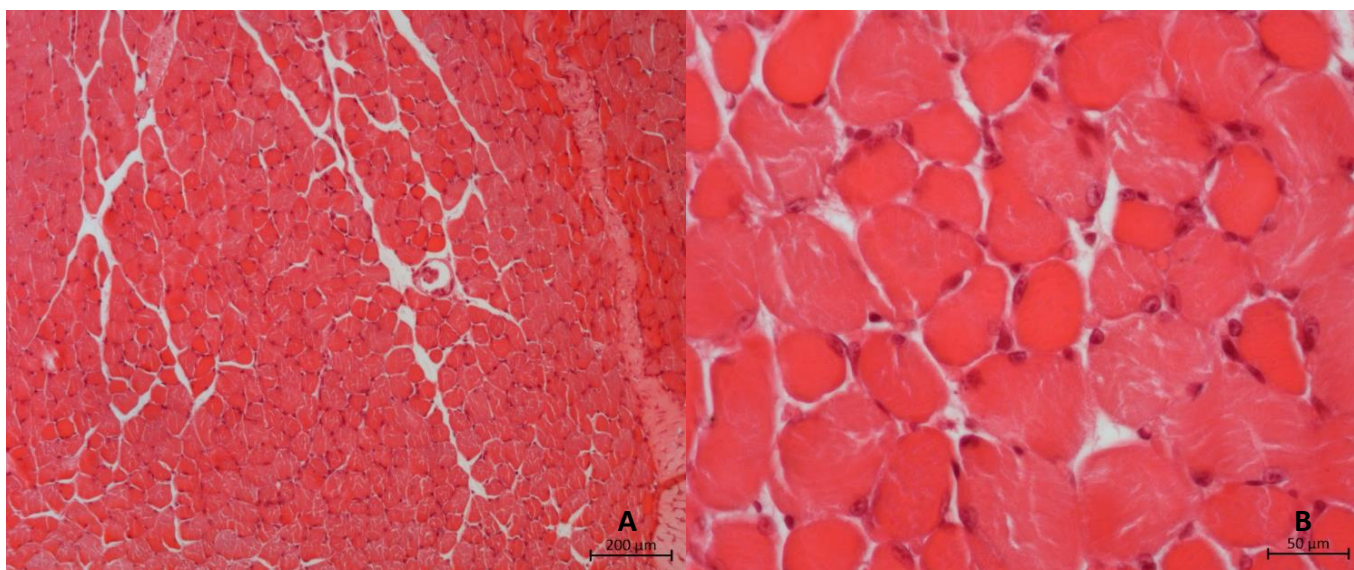


Figura 4: Grupo controle. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, analisados sob microscópio de luz. Aumento de 10x, escala de 200 μm (A) e 40x, escala de 50 μm (B).

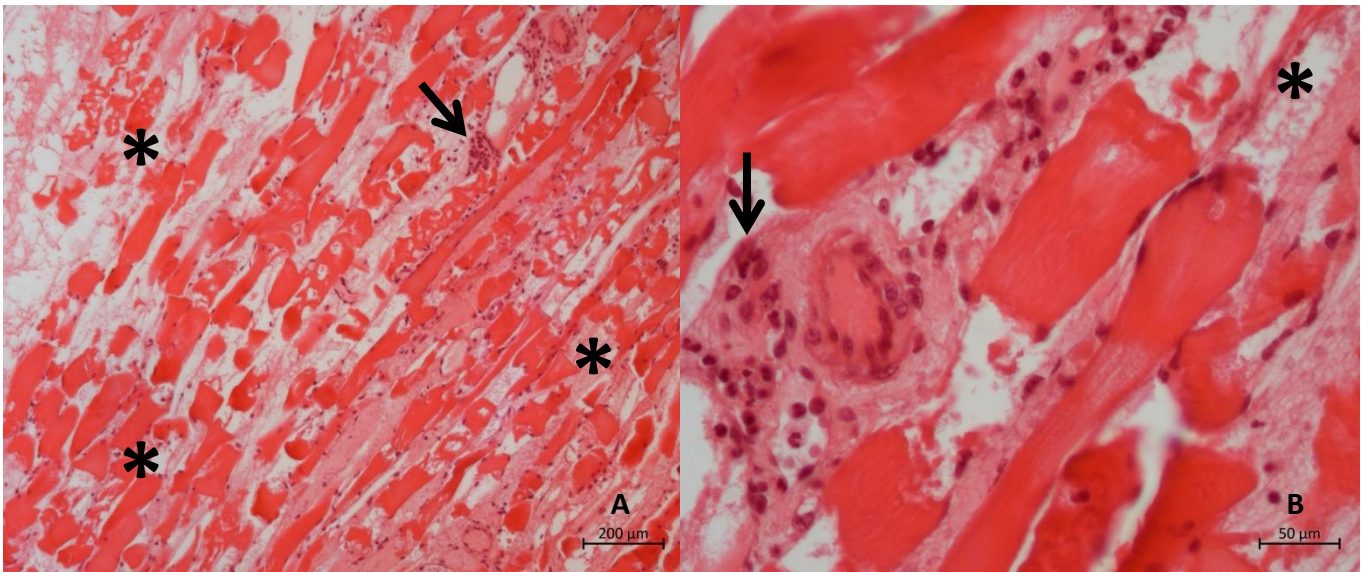


Figura 5: Corte longitudinal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 30 minutos após injeção de 40 μg de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Observa-se área extensa de mionecrose (asterisco) e início de infiltrado inflamatório (seta preta). Aumento de 10x escala de 200 μm (A) e 40x escala de 50 μm (B).

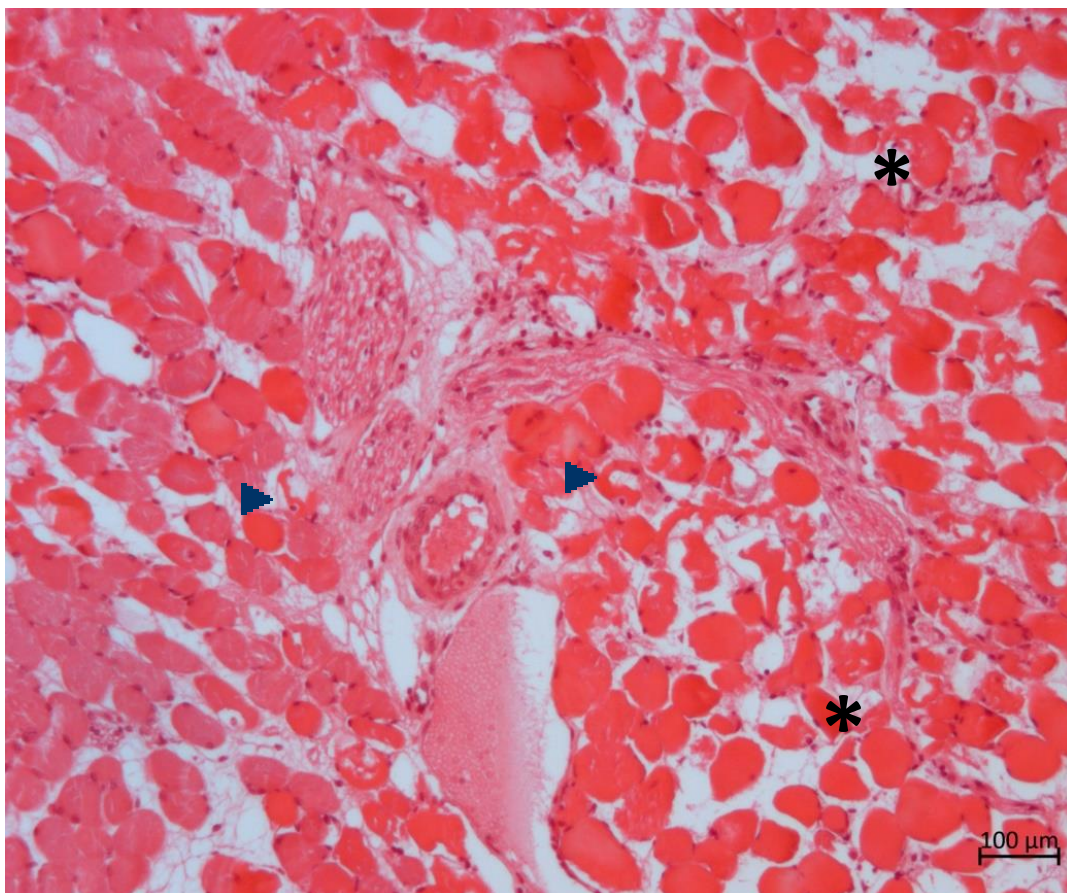


Figura 6: Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 30 minutos após injeção de 40 µg de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Aumento de 10x, escala de 100 µm. Observa-se área extensa de mionecrose (asterisco), onde podemos ver o espaçamento entre as fibras musculares. Células com lesão delta (ponta de seta).

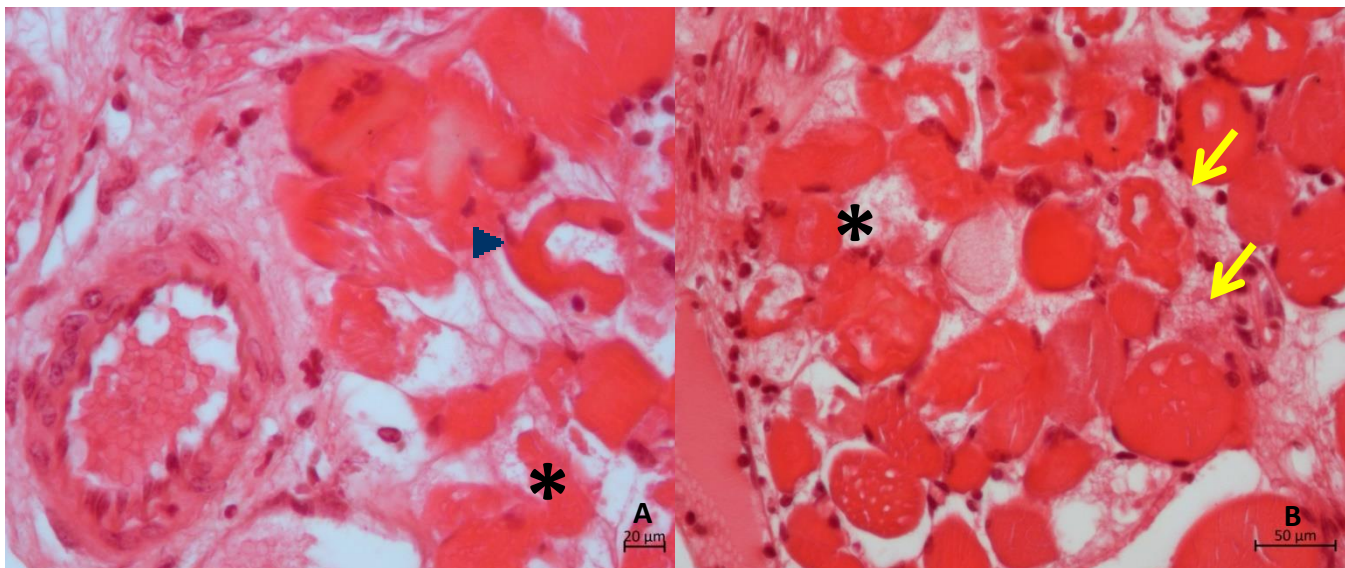


Figura 7: Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 30 minutos após injeção de 40 µg de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Célula com lesão em delta (ponta de seta). Mionecrose (asterisco) e hemorragia (seta amarela). Aumento de 40x, escala de 20 µm (A) e escala de 50 µm (B).

5.1.2- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 1 hora após o envenenamento.

Cortes transversais do músculo gastrocnêmio de camundongos após 1 hora da injeção intramuscular de 40 µg do veneno de *Bothrops jararacussu*. Podemos notar uma extensa e progressiva área de mionecrose (Figura 8 e 9), com o aumento no espaçamento entre as fibras musculares (Figura 8). Temos a presença de células com lesão delta (Figura 8), além de um moderado infiltrado inflamatório e hemorragia (Figura 8 e 9).

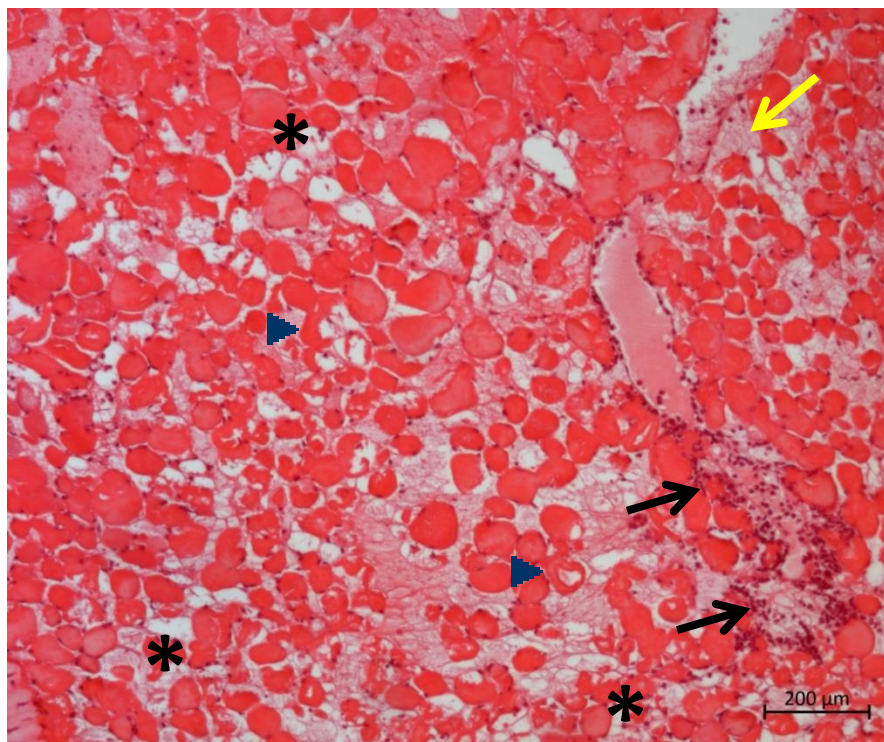


Figura 8: Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 1 hora após injeção de 40 µg de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Aumento de 10x, escala de 200 µm. Observa-se área extensa de mionecrose (asterisco), infiltrado inflamatório (seta preta), hemorragia (seta amarela), célula com lesão delta (ponta de seta).



Figura 9: Na imagem, mionecrose (asterisco) e hemorragia (seta amarela). Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 1 hora após injeção de 40 µg

de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Aumento de 40x, escala de 50 μm .

5.1.3- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 4 horas após o envenenamento.

Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos após 4 horas da injeção intramuscular de 40 μg do veneno de *Bothrops jararacussu*. A área de mionecrose é evidente (Figura 10) e muito extensa. Há um maior aumento no espaçamento intersticial, consequente da hipercontração de miofilamentos e muitas das fibras musculares estão rompidas e sem núcleos aparentes, com uma arquitetura desorganizada (Figura 10). Observamos na figura 10 leve infiltrado inflamatório e a presença de edema.

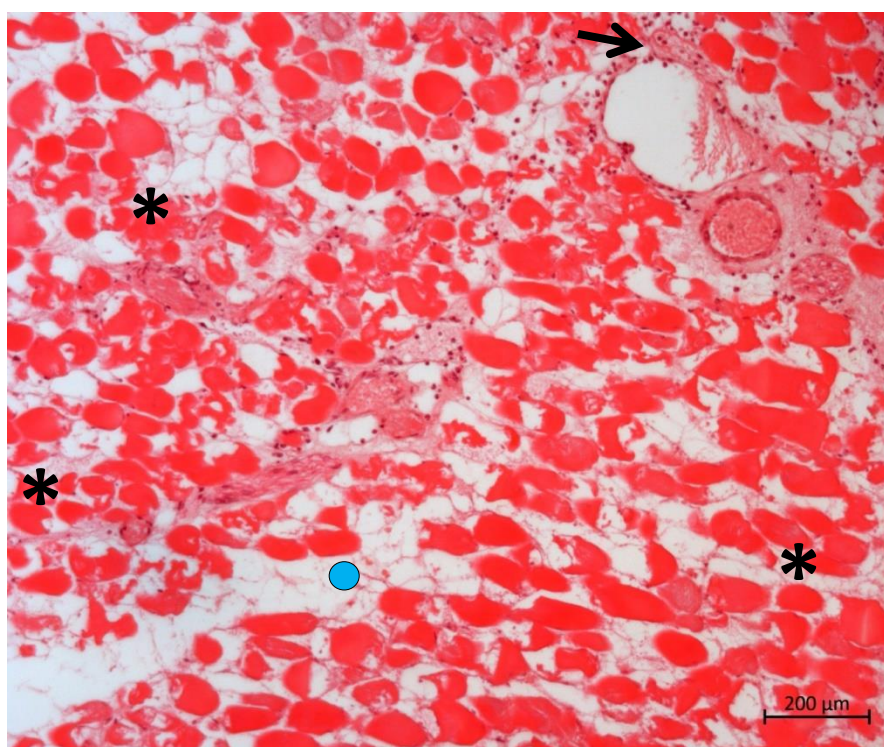


Figura 10: Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, tempo de 4 horas após injeção de 40 μg de veneno de *Bothrops jararacussu*. Observa-se área extensa de mionecrose (asterisco), onde podemos ver o espaçamento entre as fibras musculares, edema (círculo azul), leve infiltrado inflamatório (seta preta). Aumento de 10x, escala de 200 μm .

5.1.4- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBJussu 24 horas após o envenenamento.

Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos após 24 horas da injeção intramuscular de 40 µg do veneno de *Bothrops jararacussu*. Observamos uma extensa área de mionecrose e um elevado infiltrado inflamatório (Figuras 11 e 12). Na figura 11 há infiltrado inflamatório, presença de edema e a arquitetura das fibras musculares necrosadas foi perdida. Também na figura 11, observamos uma área de fibras musculares normais, que não foram afetadas.

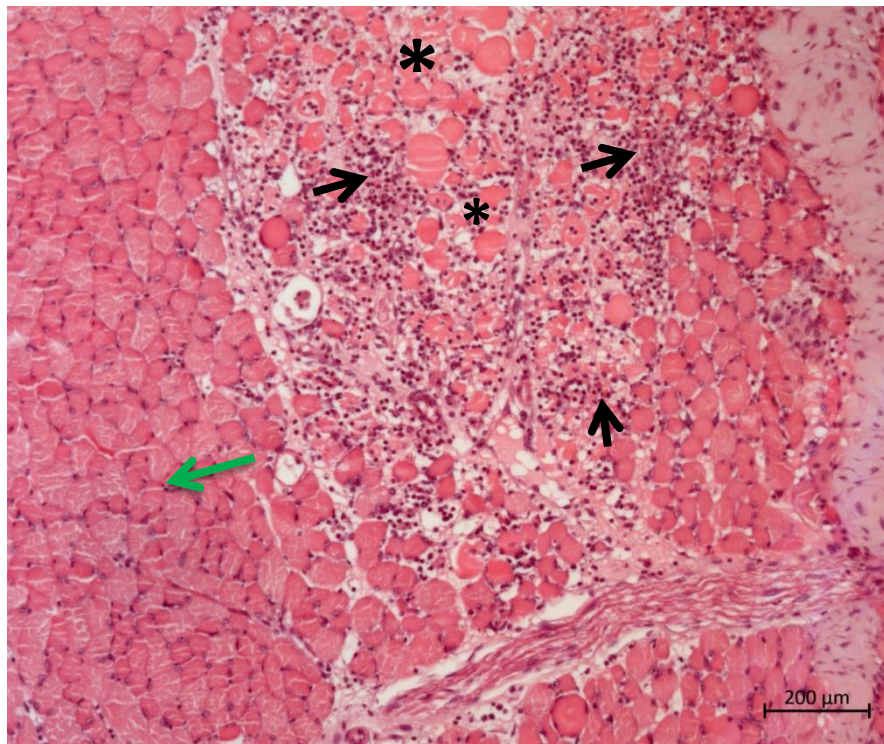


Figura 11: Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 24 horas após injeção de 40 µg de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Aumento de 10x, escala de 200 µm. Observa-se mionecrose (asterisco), infiltrado inflamatório (seta preta). Fibras musculares normais (seta verde).

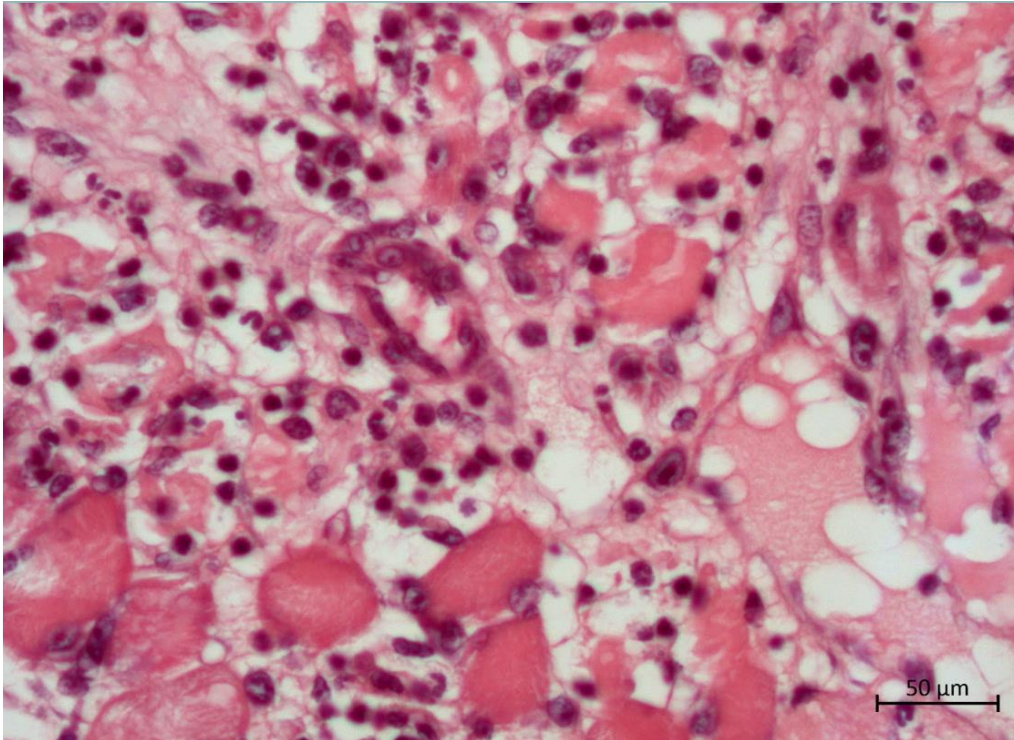


Figura 12: Infiltrado inflamatório 24 horas após injeção. Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 24 horas após injeção de 40 μ g de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Aumento de 40x, escala de 50 μ m.

5.1.5- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 48 horas após o envenenamento.

Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos após 48 horas da injeção intramuscular de 40 μ g do veneno de *Bothrops jararacussu*. Observamos nas figuras 13A e 13B uma abundante área de mionecrose. Algumas fibras musculares de aparência normal na região que não foi afetada pelo veneno. Vasos sanguíneos encontram-se congestionados. Notamos um infiltrado inflamatório presente no espaço intersticial e nas fibras musculares necróticas.

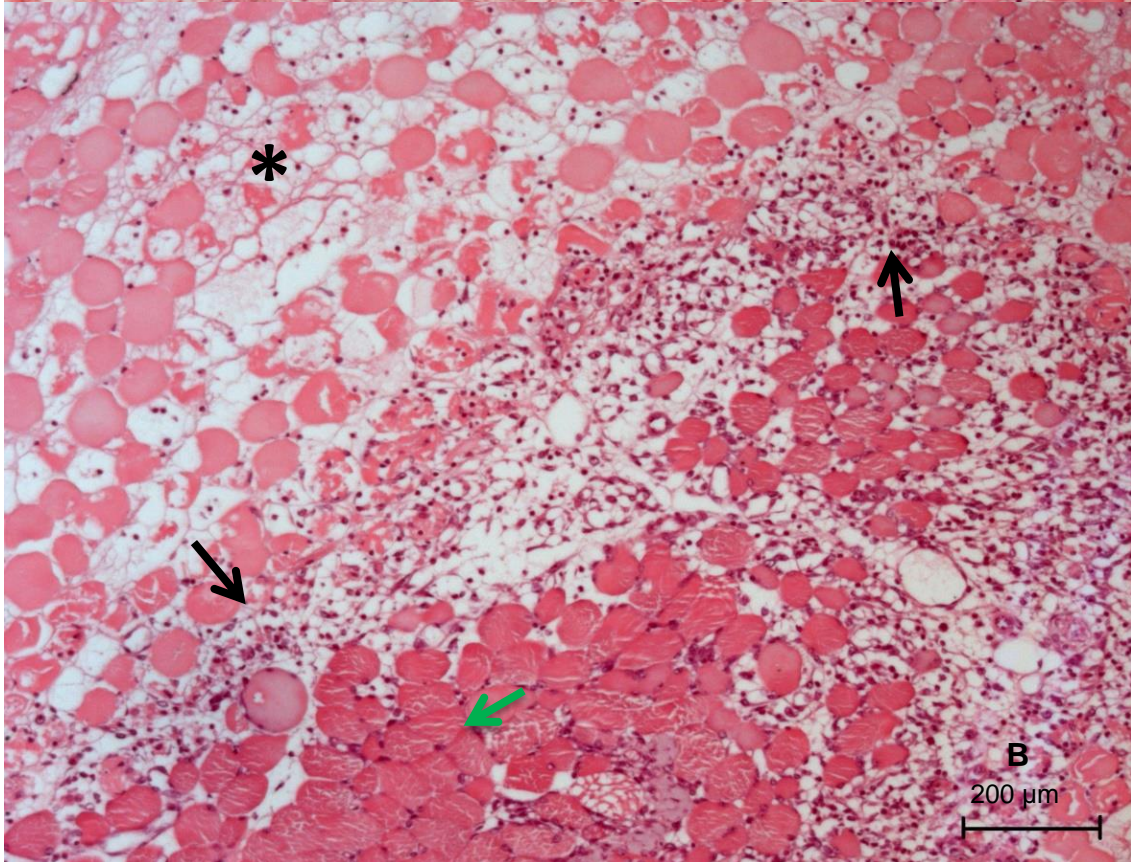
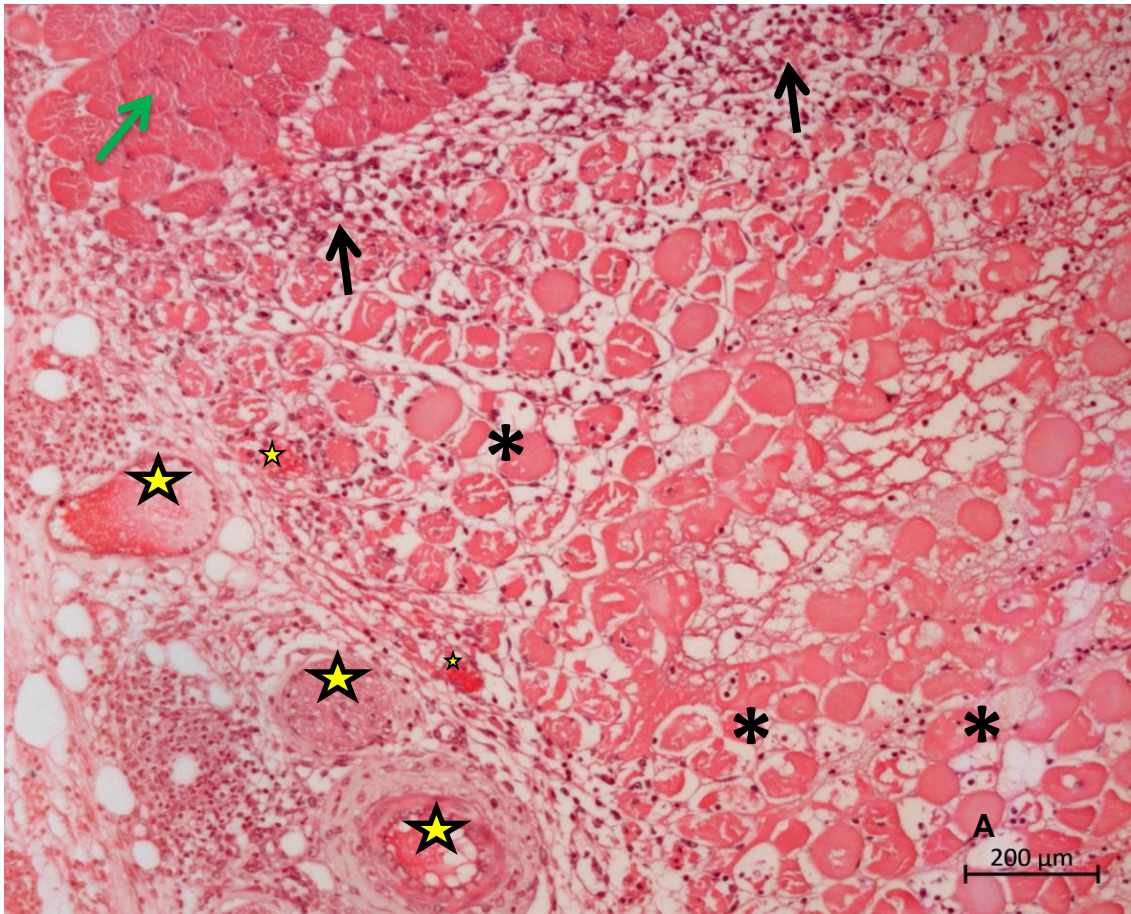
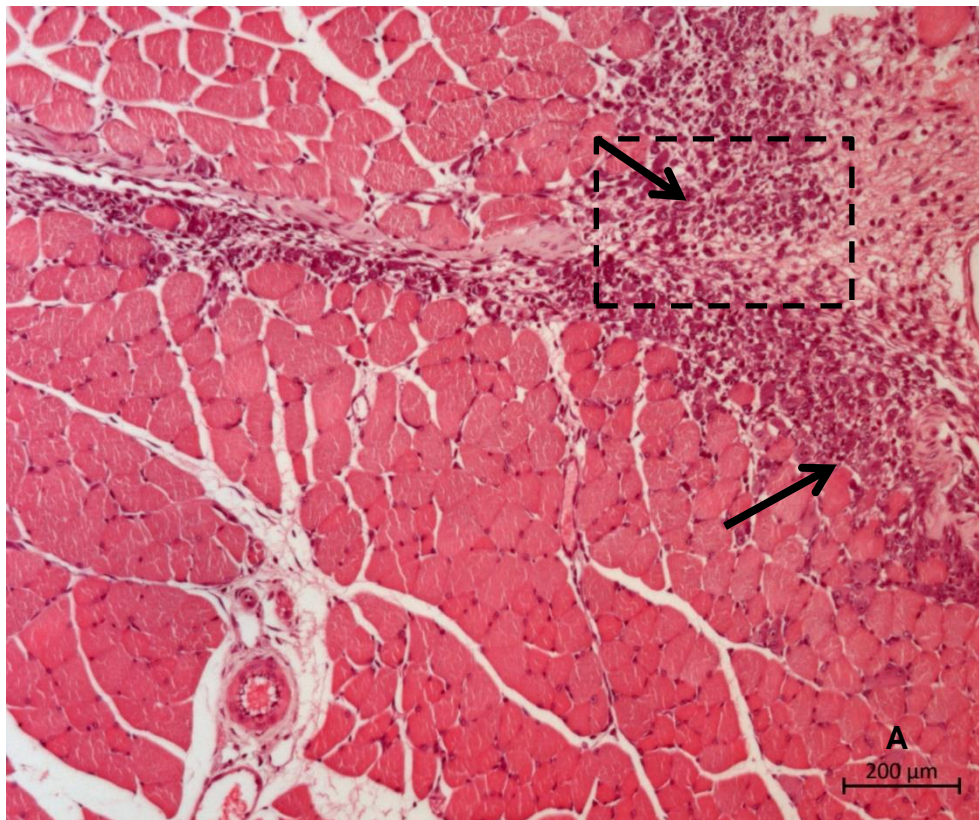


Figura 13: Observa-se área extensa de mionecrose (asterisco), infiltrado inflamatório (seta preta), fibras musculares normais (seta verde) e vasos sanguíneos congestionados (estrela amarela) (A). Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 48 horas após injeção de 40 µg de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Aumento de 10x, escala de 200 µm (A e B).

5.1.6- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 72 horas após o envenenamento.

Nas figuras 14A e 14B, corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos após 72 horas da injeção intramuscular de 40 µg do veneno de *Bothrops jararacussu*. Observamos um acentuado infiltrado inflamatório composto por células mononucleares em sua maioria (Figuras 14A e 14B).



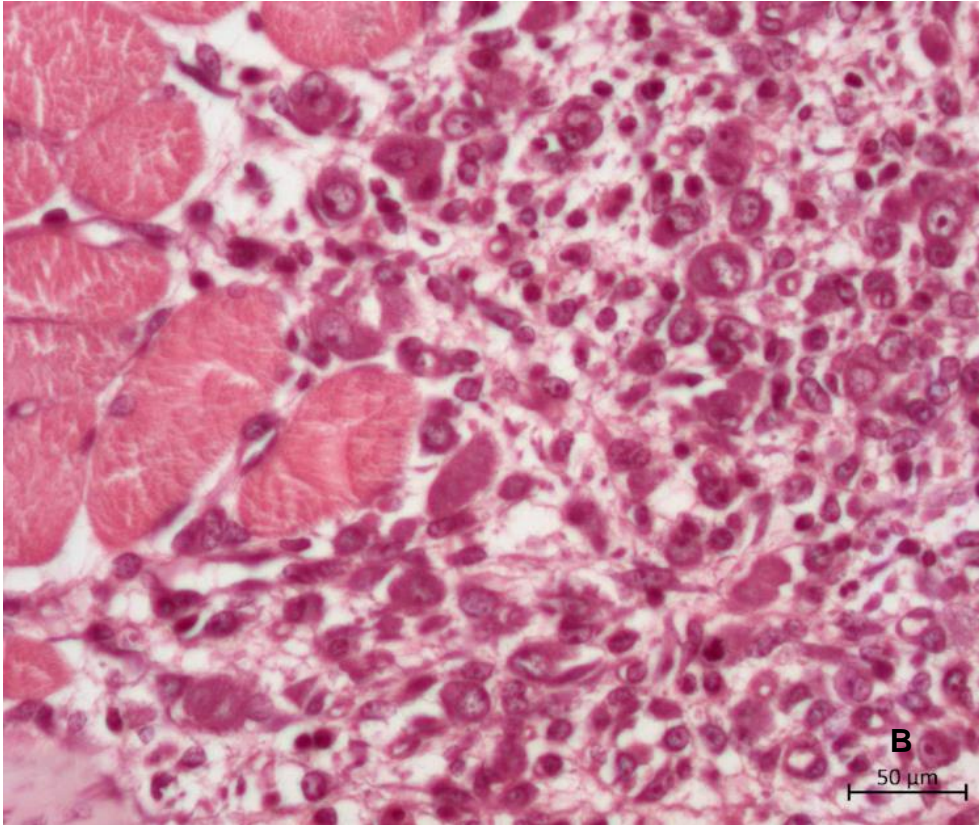


Figura 14: Corte transversal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 72 horas após injeção de 40 µg de veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Observa-se intenso infiltrado inflamatório (seta preta) Aumento de 10x escala de 200 µm (A) e 40x escala de 50 µm (B).

5.1.7- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 7 dias após o envenenamento.

Observamos nas figuras 15A e 15B as alterações que ocorreram no músculo gastrocnêmio de camundongos 7 dias após a injeção com 40 µg do veneno de *Bothrops jararacussu*. As fibras musculares possuem tamanhos diferentes e seus núcleos estão centralizados, já evidenciando áreas de regeneração tecidual (Figuras 15A e 15B). Células de infiltrado inflamatório foram encontradas em número escasso (Figuras 15A e 15B).

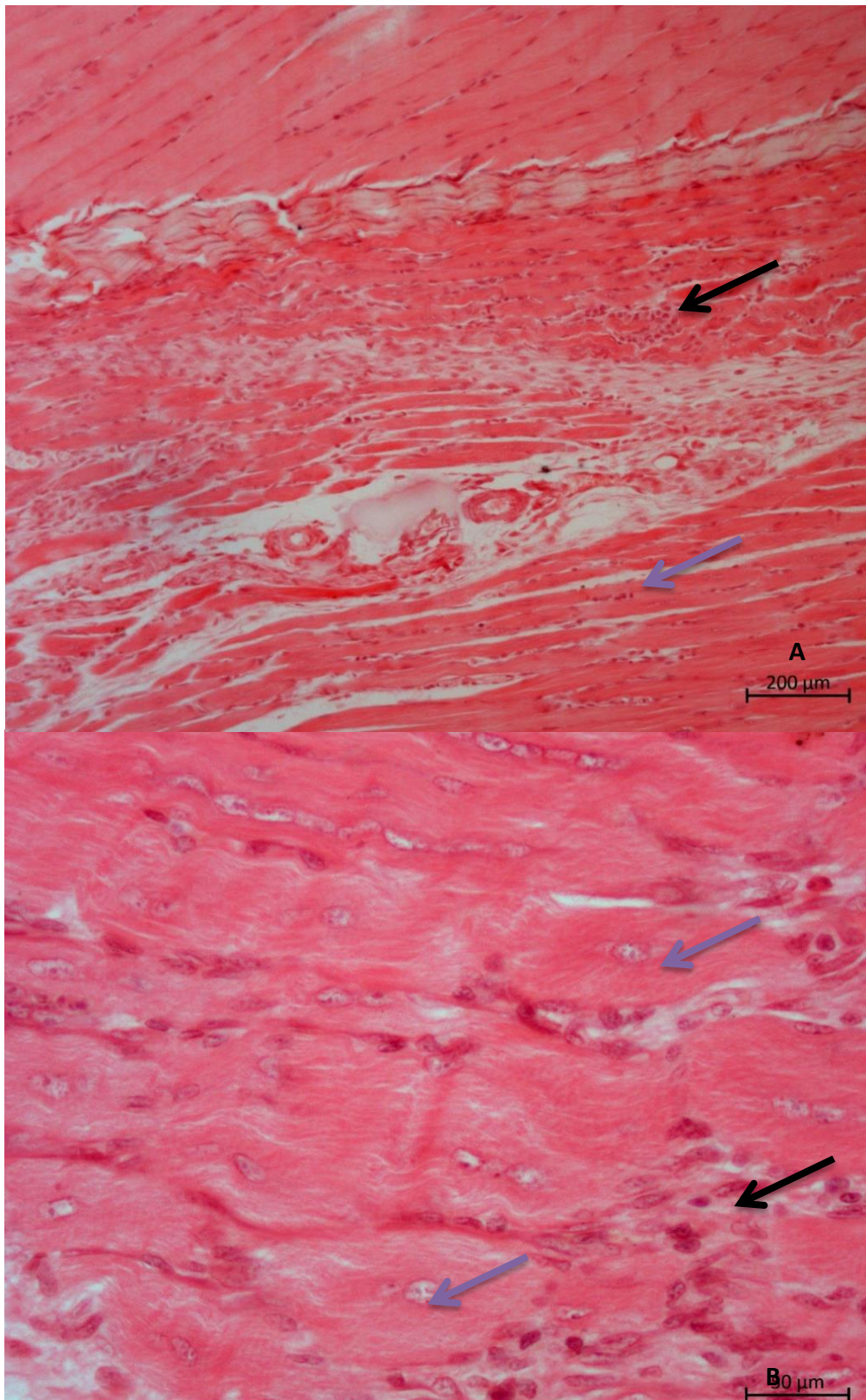


Figura 15: Corte longitudinal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 7 dias após injeção, analisados sob microscópio de luz. Observam-se fibras de diferentes tamanhos e com núcleos centralizados (setas roxas). Aumento de 10x e escala de 200 μm (A) 40x e escala de 50 μm (B) e células de infiltrado inflamatório (seta preta)

5.1.8- Avaliação histopatológica da lesão muscular esquelética induzida pelo veneno de VBjussu 14 dias após o envenenamento.

Nas figuras 16 e 17 observamos as alterações que ocorreram 14 dias após injeção no músculo gastrocnêmio de camundongos com 40 µg do veneno de *Bothrops jararacussu*. Algumas fibras musculares ainda possuem tamanhos diferentes, menores, porém mais próximos ao tamanho de fibras originais e seus núcleos encontram-se centralizados. Observamos também uma vasta área de tecido conjuntivo (Figura 16 A).

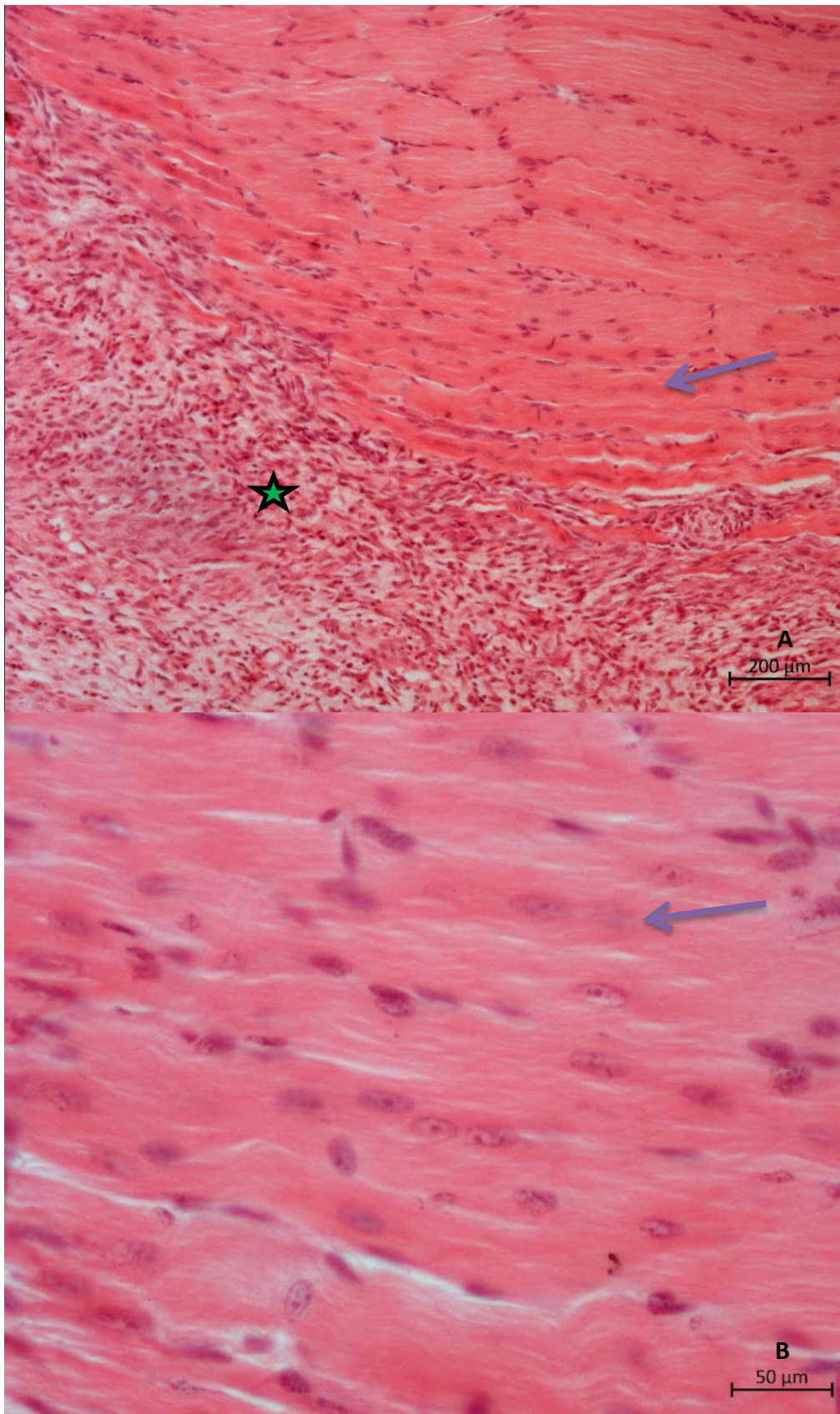


Figura 16: Corte longitudinal do músculo gastrocnêmio de camundongos, corados com H&E, 14 dias após injeção com 40 µg do veneno de *Bothrops jararacussu*, analisados sob microscópio de luz. Observam-se núcleos centralizados (seta roxa) nas fibras musculares e

vasto tecido conjuntivo (estrela verde). Aumento de 10x e escala de 200 μm (A) 40x e escala de 50 μm (B)

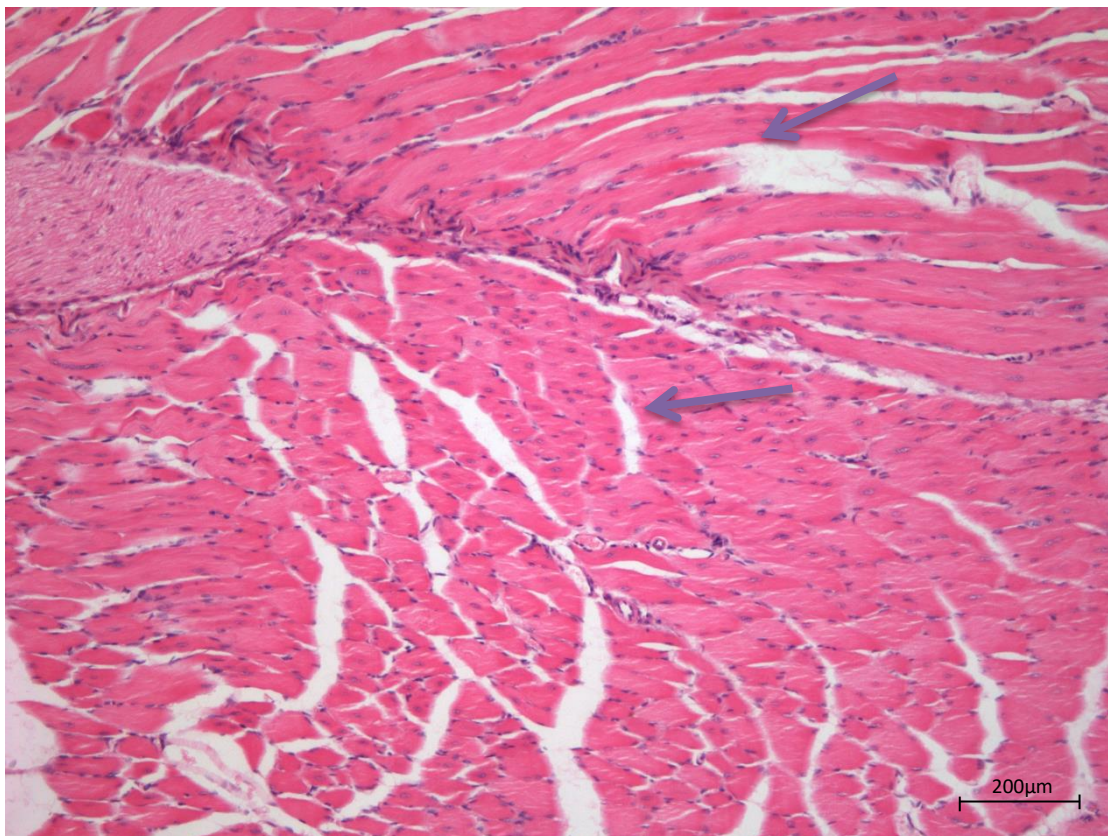


Figura 17: Observam-se núcleos centralizados (seta roxa) nas células de tecido muscular, 14 dias após injeção. Aumento de 10x e escala de 200 μm .

6. DISCUSSÃO

O veneno de *Bothrops jararacussu* possui predominantemente miotoxinas, que são classificadas como fosfolipases A_2 ou então homólogas de fosfolipase, que possui estrutura de uma, porém não a atividade fosfolipásica (Sousa et al., 2013). A histologia nos demonstra uma vasta área de mionecrose, de início rápido. Isso reforça que a ação das miotoxinas atua de forma direta nas membranas plasmáticas das fibras musculares, rompendo sua integridade (Gutierrez e Ownby, 2003). Neste período inicial, também verificamos células com lesões delta (Mokri; Engel, 1975), com sua característica forma de cunha.

O tempo difere, porém notamos assim como no estudo in vivo de Queiroz et al. (1984), que precocemente as fibras musculares já apresentavam núcleos

picnóticos, e que as miofibras estavam condensadas, deixando espaços vazios entre as células. Como há a perda da regulação de permeabilidade da membrana plasmática, ocorre o influxo de cálcio, promovendo esta hipercontração (Gutierrez e Ownby, 2003).

Queiroz et al. (1984) encontraram em alguns animais trombos de fibrina nos vasos sanguíneos, porém isso não foi verificado nos resultados desta revisão. A dose injetada entre ambos é diferente, então talvez essa seja uma das causas para essa divergência.

Verificou-se pontos de hemorragia, porém são de pouca extensão, o que está de acordo com a literatura (Queiroz et al., 1985). Como vemos, a quantidade de metaloproteinases de veneno de cobra (SVMPs) presentes no veneno de *Bothrops jararacussu* é bem menor. Isso explica mionecrose ser mais evidente ao invés da hemorragia, quase não presente.

Com 1 hora após a injeção do veneno, já observamos o infiltrado inflamatório. No estudo de Queiroz et al. (1984) há a descrição da presença de vasculite em 6 horas, assim como no estudo da Bothropstoxina II (BthTx-II) isolada (Gutiérrez et al., 1991). Trombose não foi verificada em nenhum dos momentos e nem vasos sanguíneos sem mais distinção.

Após o período de 4 horas, a mionecrose ficou ainda mais extensa, núcleos não eram mais visualizados nas células afetadas, havia a hipercontração, um maior espaçamento e massas hialinas.

Dentre as lâminas, o pico do infiltrado inflamatório foi no período de 24 horas, estando de acordo com os relatos da literatura (Gutiérrez et al., 1991). Notamos que a fagocitose do material necrótico começa a ser feita e que com 48 horas a presença do infiltrado permanece. Com 72 horas a área necrótica praticamente não é visualizada.

Com 7 dias já existe um início de regeneração (Gutiérrez et al., 1991), onde observamos núcleos centralizados, as fibras ainda com tamanhos diferentes uma das outras. Há presença de tecido conjuntivo.

Ao 14 dias, os núcleos das células do tecido muscular ainda encontram-se centralizados, porém os tamanhos são mais semelhantes às fibras normais. Houve uma leve cicatrização fibrosa, assim como a dose de 20 µg utilizada em estudo por Queiroz et al. (1984).

Percebemos o quão as espécies podem ter suas diferenças e isso implica nos tratamentos que serão utilizados. Os envenenamentos por *Bothrops jararacussu* possuem uma característica miotóxica importante, muitos casos podem resultar no óbito, ou o indivíduo pode ficar com sequelas graves, necessitando muitas vezes da amputação de membros.

O estudo da patogênese dos envenenamentos é de fundamental importância, pois seu conhecimento pode implicar em melhores terapias, como por exemplo, novos estudos de terapias pró-angiogênicas visto que a vascularização melhora a regeneração do tecido muscular.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; PAIVA, J. H. H. G. L.; MARTINS, A. M. C.; MENESES, G. C.; SILVA JÚNIOR, G. B. D.; BUCKLEY, N.; DAHER, E. D. F. Clinical assessment and pathophysiology of *Bothrops* venom-related acute kidney injury: a scoping review. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, 2022, v. 53, n. 36, set.

CARDOSO, J. L. C. *Bothropic* accidents. **Mem. Inst. Butantan**, 1990, v. 52, p. 43-44.

CAVALCANTE, J. S. et al. Crosstalk of Inflammation and Coagulation in *Bothrops* Snakebite Envenoming: Endogenous Signaling Pathways and Pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**. 1998, p. 515–524.

CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 2017.

DA SILVA AGUIAR, W. et al. Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, 2020, v. 186, p. 67-77.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD, JR., V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo, p. 72-86, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M., NÚÑEZ, J., CINTRA, A. C. O., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Experimental and Molecular Pathology**. 1991, 55(3), p. 217–229.

GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J.; HABIB, A. *et al.* Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers** 3, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. **Revista de Biología Tropical**, 1980, v. 28, n. 2, p. 341-351.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, 1989, p. 211-223.

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Efectos locales em el envenenamento ofídico em América Latina. In: CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O., HUI WEN, F., MÁLAQUE, C.M., HADDAD JR., V., **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**, 2003 São Paulo, Sarvier-FAPESP, p. 310-323.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. 2003, v. 42, n. 8, p. 915-931.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, 1984b, v. 22, n. 1, p. 115-128.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Experimental and molecular pathology**. 1984a v. 40, n. 3, p. 367-379.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., QUEIROZ, L. S., SANTO-NETO, H., RODRIGUES-SIMIONI, L., & GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 1988. 26(7), 615–627.

JIMENEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: Acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. **J. Investig. Dermatol.** 2008, p. 2421–2428.

JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. **Toxicon**. 1964, v. 2, p.187-195.

KASTURIRATNE, A. *et al.* The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS medicine**, 2008, v. 5, n. 11, p. 218.

LÓPEZ-DÁVILA, A. J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Alterations of the skeletal muscle contractile apparatus in necrosis induced by myotoxic snake venom phospholipases A₂: a mini-review. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, 2023, p. 1-9.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., WEN, F.H., MÁLAQUE, C.M.S., HADDAD, JR., V. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2003 Sarvier, São Paulo, p. 33–61.

MILANI J., R. *et al.* Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, 1997. v. 90, n. 5, p. 323-334.

MOKRI, B.; ENGEL, A. G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. **Neurology** ,1975.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, 1990. v. 28, n. 11, p. 1293-1301.

QUEIROZ, L. S. et al. Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 23, n. 2, p. 341-345, 1985.

QUEIROZ, L. S. et al. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 22, n. 3, p. 339-346, 1984.

QUEIROZ, L.S.; MARQUES, M.J.; SANTO NETO, H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. 2002. **Toxicon** , v. 40, p. 1483–1486.

RIBEIRO, L. A. Epidemiology of ophidic accidents. **Mem. Inst. Butantan**, 1990, 52 (supl.).

SANTO NETO, H.; MARQUES, M. J. Microvessel damage by *B. jararacussu* snake venom: pathogenesis and influence on muscle regeneration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 814-819, 2005.

SOUSA, L. F. et al. Comparação da filogenia, composição do veneno e neutralização por antiveneno em diversas espécies do complexo *Bothrops*. **PLoS doenças tropicais negligenciadas**, 2013 , v. 9, p. 2442.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 298, n. 5, p. 1173-1187, 2010. DOI: 10.1152/ajpregu.00735.2009

WANDERLEY, C. W.; SILVA, C. M.; WONG, D. V.; XIMENES, R. M. et al. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoïd and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, n. 90, p. 134-147, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.08.001

WHO. World Health Organization. Snakebite Envenoming. A Strategy for Prevention and Control. **World Health Organization**, Geneva: 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324838/9789241515641-eng.pdf>. Acesso em: 02 set. 2023.