

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CREOLINA® NA
REVERSÃO DOS QUADROS CAUSADOS POR
ENVENENAMENTO DE *Bothrops jararaca* EM RATOS**

Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho

Areia, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CREOLINA® NA
REVERSÃO DOS QUADROS CAUSADOS POR
ENVENENAMENTO DE *Bothrops jararaca* EM RATOS**

Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Medicina Veterinária, pela
Universidade Federal da Paraíba, sob
orientação do Prof. Ricardo Romão Guerra.**

Areia, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CREOLINA® NA REVERSÃO DOS QUADROS
CAUSADOS POR ENVENENAMENTO DE *Bothrops jararaca* EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em:
Nota:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra – UFPB (Orientador)

Prof. Dr. Sara Vilar Dantas Simões – UFPB

Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena – UFPB

Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Coordenação de TCC

“Dedico a meus pais, minha família, meus amigos e educadores. Obrigado a todos pelo apoio, confiança e incentivo em todos os momentos, obrigado por sempre estarem comigo.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, por me agraciar com saúde, paz, pela oportunidade de viver e contemplar todas as maravilhas desta terra.

Aos meus pais, Verônica Ribeiro Antonino e Elias Carvalho Gomes, os meus mais sinceros votos de agradecimento e a eles dedico esse trabalho. Pelo exemplo como pessoas e profissionais, pela educação, as oportunidades, os ensinamentos, por tudo que me tornei, sou eternamente grato.

A minha família que confiou e acreditou em mim desde o começo, me dando forças nos momentos mais difíceis. Em especial as minhas afilhadas Maria Elisa e Maria Júlia por toda luz e paz que me proporcionam a cada encontro.

Muito obrigado a Tia Rosi, minha primeira professora, agradeço por acreditar no meu potencial e me ensinar os primeiros passos e as primeiras letras.

A minha amiga e namorada Maryanne Paulino, por sua paciência, força, luz, ajuda científica, companhia e por tudo que vivemos, muito obrigado, você é especial.

Minha gratidão aos meus amigos, que sempre me apoiaram e me incentivaram nessa jornada, dividiram tempo, risadas e aperreios comigo. Gostaria de agradecer em especial aos que participaram ativamente nesse trabalho, muito obrigado Hugo, Vinicius, Helder e o excelente profissional Antônio, pelo trabalho técnico em nossas pesquisas.

A todos os que compõem o grupo do Laboratório de Histologia Animal da UFPB-CCA, e fizeram esse projeto possível, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos e os companheiros na CASA AMARELA: Mateus e Vinicius, obrigado por tudo.

Agradeço também a Givanildo Filho e Pedro Henrique, meus primeiros amigos nessa passagem pelo CCA-UFPB. Obrigado a todos da Turma 10 (2013.1) e aos que compõem essa instituição, vocês fizeram esse sonho possível.

Agradeço aos profissionais que fizeram parte do meu crescimento acadêmico em especial aos professores Ricardo Barbosa de Lucena e Gisele Castro Menezes, por acreditarem no meu potencial e serem meus orientadores nos primeiros projetos de pesquisa e extensão, proporcionando uma importante experiência quanto a carreira acadêmica e vida pessoal.

Agradecimento em especial ao professor e amigo Ricardo Romão Guerra por confiar em mim, acreditar no meu trabalho, por ajudar no meu crescimento pessoal e profissional e me orientar de forma brilhante por tanto tempo.

Expresso aqui minha gratidão para com a equipe da Farmácia Veterinária Agroserrana por todo ensinamento compartilhado ao longo do tempo, com toda certeza fazem parte da minha família, espero manter essa relação por muitos anos, obrigado.

Agradeço a Central de Venenos do Instituto Butantan-SP, pelo apoio e incentivo a realização da pesquisa.

Obrigado a todos que contribuíram de alguma forma em minha vida pessoal e carreira acadêmica, e fizeram desse sonho possível, vocês foram e são muito importantes para mim.

RESUMO

L. R. R. A. CARVALHO, Universidade Federal da Paraíba, Julho de 2017. Potencial terapêutico da Creolina® na reversão dos quadros causados por envenenamento de *Bothrops jararaca* em ratos. Orientador: Ricardo Romão Guerra.

Os acidentes ofídicos representam um grave problema em saúde pública no Brasil, além de prejuízos econômicos nos sistemas de produção. Os componentes do gênero *Bothrops* são considerados os maiores responsáveis (cerca de 90% dos casos). Atualmente o único tratamento preconizado pelos órgãos responsáveis é a utilização de soro antiofídico, que não é eficaz na remissão da sintomatologia local, e apresenta dificuldades quanto a obtenção e custo do produto comercial. Nesse âmbito, alternativas a essa terapia fazem-se necessárias. Várias substâncias vêm ganhando notoriedade na medicina popular como antiofídicas, entre elas a Creolina®. Com isso, esse trabalho tem como objetivo a avaliação do potencial terapêutico da Creolina®, por três vias de acesso, para os efeitos induzidos pela peçonha de *Bothrops jararaca*. Em ratos Wistar machos, todos os grupos (A, B, C e D) receberam veneno inoculado por via intramuscular (3,2 mg/kg). A Creolina® (0,1 ml) foi administrada por via oral, tópica e intramuscular nos grupos “B”, “C” e “D”, respectivamente. A atividade antiofídica desse composto foi avaliada por meio de avaliação clínica a cada uma hora e laboratorial oito horas após a inoculação. Os animais que tiveram contato com a Creolina® por via oral e tópica desenvolveram a sintomatologia local e achados laboratoriais semelhantes ao grupo controle que recebeu apenas o veneno, já os animais inoculados com veneno junto à Creolina® por via intramuscular não apresentaram sinais característicos da ação local do veneno (necrose, hemorragia) e apresentaram parâmetros hematológicos dentro da normalidade para espécie. Esses resultados indicam um possível efeito antiofídico da Creolina® quando usada por via intramuscular, evidenciado pelo efeito neutralizante dos efeitos do veneno principalmente no local de inoculação. Esses achados, acrescidos de mais estudos, sustentam a justificativa para o uso desse produto comercial na medicina tradicional.

Palavra-chave: *B. jararaca*; atividade antiofídica; antiveneno

ABSTRATC

L. R. R. A. CARVALHO, Federal University of Paraiba, July 2017. Therapeutic potential of Creolina® in the reversion of the clinical condition caused by poisoning of *Bothrops jararaca* in rats. Advisor: Ricardo Romão Guerra.

The ophidian accidents represent a serious public health problem in Brazil, as well as economic damages in the production systems. The components of the *Bothrops* genus are considered the most responsible (about 90% of the cases). Currently the only treatment recommended by the responsible organs is the use of antiophidic serum, which is not effective in remission of local symptomatology, and presents difficulties in obtaining and cost of the commercial product. In this scope, alternatives to this therapy are necessary. Several substances have been gaining notoriety in popular medicine as antiophidics, among them the Creolina®. Therefore, this work aims to evaluate the Creolina®'s therapeutic potential, by three access routes, for the effects induced by the *Bothrops jararaca* venom. In male Wistar rats, all groups (A, B, C e D) received venom inoculated intramuscularly (3.2 mg/kg). Creolina® (0.1 ml) was administered orally, topically and intramuscularly in the "B", "C" and "D" groups, respectively. The antiophidic activity of this compound was evaluated by means of clinical evaluation at each hour and laboratory eight hours after inoculation. Animals that had contact with Creolina® orally and topically developed local symptoms and laboratory findings similar to the control group wich received only the venom, while the animals inoculated with Creolina® venom intramuscularly did not show signs characteristic of the venom's local action (necrosis, hemorrhage) and presented hematological parameters within normality for the species. These results indicate a possible antiophidic effect of Creolina® when used intramuscularly, evidenced by the neutralizing effect of the venom effects mainly at the inoculation site. These findings, along with more studies, support the justification for the use of this commercial product in traditional medicine.

Keyword: *B. jararaca*, antiophidic activity, antipoison

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rato da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar.

Figura 2: Membro posterior de rato Wistar. (Linha tracejada: Área de aferição pelo paquímetro para quantificação do edema). Esquematização de uma elipse e fórmula para calcular área.

Figura 3: Rato Wistar com suspensão do membro direito, duas horas após inoculação do veneno botrópico (*Bothrops jararaca*).

Figura 4: (A) Membro posterior direito inoculado com veneno botrópico por via intramuscular apresentando edema e hemorragia evidentes. (D) Membro posterior direito inoculado com veneno botrópico e Creolina® por via intramuscular apresentando leve edema e nenhuma alteração de coloração e conformação tecidual.

Figura 5: Amostras de urina dos 4 grupos experimentados após centrifugação, evidenciando ausência de sedimentação.

Figura 6: Tubos capilar usados para técnica de microhematócrito. (A) Amostra de animal do grupo A com evidente hemólise; (D) Amostra de animal do grupo D com plasma translúcido sem indícios de hemólise.

Figura 7: Fotomicrografia da região cortical do rim esquerdo de rato Wistar, oito horas após inoculação do veneno botrópico. Presença de cilindros granulosos em túbulos contorcidos distais (setas), e cilindros hialinos em túbulos contorcidos proximais (ponta de setas) (HE, 40x).

Figura 8: Fotomicrografia de região medular do rim esquerdo de rato Wistar, oito horas após inoculação do veneno botrópico. Presença de cilindros hialinos em túbulos (setas) (HE 40x).

Figura 9: Fotomicrografias da musculatura da parte posterior da coxa direita de ratos Wistar, oito horas após inoculação do veneno botrópico. (A) Hemorragia difusa (setas) e edema acentuado após ação do veneno (HE, 10x); (D) Presença de infiltrado inflamatório (a) e edema leve após inoculação do veneno botrópico e Creolina® por via intramuscular na parte posterior da coxa direita (HE, 10x).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações identificadas em grupo de ratos Wistar após envenenamento botrópico experimental (*B. jararaca*) e tratamento com Creolina® por via oral, tópica e intramuscular.

Tabela 2: Valores hematológicos de ratos Wistar machos, oito horas após inoculação experimental (*B. jararaca*) por via intramuscular e tratamento com Creolina® (0,1ml) por diferentes vias de administração. Valores expressos em médias \pm S.D. Referências: BRANCO et al. (2011); *UNOESTE (2008).

Tabela 3: Média das alterações histopatológicas de rim e músculo de ratos Wistar após oito horas da inoculação do veneno botrópico e administração da Creolina®.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Evolução da atividade edematogênica causada pela inoculação de veneno botrópico em ratos Wistar tratados com Creolina®.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 IMPORTÂNCIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS	12
1.2 JARARACA (<i>Bothrops jararaca</i>).....	12
1.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DO VENENO BOTRÓPICO	13
1.4 CREOLINA®	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 LOCAL.....	16
2.2 ANIMAIS	16
2.3 VENENO E CREOLINA®	16
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	17
2.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA	17
2.6 AVALIAÇÃO LABORATORIAL	18
2.6.1 PATOLOGIA CLÍNICA	18
2.6.2 HISTOPATOLOGIA	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	19
3.1.1 ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS	19
3.1.2 LOCOMOÇÃO.....	21
3.1.3 DOR E HEMORRAGIA	22
3.1.4 INGESTÃO DE ALIMENTOS	22
3.1.5 ALTERAÇÕES URINÁRIAS.....	23
3.1.6 ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA.....	23
3.2 PATOLOGIA CLÍNICA	24
3.2.1 LEUCOGRAMA	24
3.2.2 ERITROGRAMA	25
3.2.3 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT) E FIBRINOGENIO.....	26
3.2.4 PLAQUETOGRAMA	26
3.3 HISTOPATOLOGIA.....	27
4. CONCLUSÕES.....	34
5. REFERÊNCIAS	34
ANEXOS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS

O ofidismo no mundo representa um grave problema de saúde pública, principalmente nos países tropicais, devido a alta morbimortalidade que ocasionam. Estima-se que ocorram em humanos distribuídos por todo o globo, aproximadamente 1.250.000 a 1.665.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, sendo 30.000 a 40.000 casos fatais. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (MS), estima-se que ocorram entre 19 a 22 mil acidentes em humanos por ano, fazendo do Brasil o país da América do Sul com maior número de acidentes dessa natureza (PINHO & PEREIRA, 2001). Ainda acredita-se que mais de 85% destes sejam causados por serpentes do gênero *Bothrops* (BOCHNER & STRUCHINER, 2003).

Na medicina veterinária, os acidentes ofídicos também representam importante problema de saúde pública, pois podem causar graves lesões irreversíveis nos animais de estimação e prejuízos econômicos incalculáveis nos rebanhos de produção (CINTRA et al., 2014).

Os criadores de bovinos rotineiramente relatam perdas econômicas devido a acidentes ofídicos, em números, no Brasil esse prejuízo chega a aproximadamente 130 mil cabeças por ano (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006; CINTRA et al., 2014). Contudo, a importância dos acidentes ofídicos como causa da morte em bovinos é tratada pelos médicos veterinários de forma divergente em todo território nacional. Alguns acreditam que esse tipo de acidente é sim responsável por grande prejuízo econômico dentro da bovinocultura, outros alegam que são pouco importantes ou que sua relevância é muito menor do que se imagina, talvez pela errônea prática de atribuir como acidente ofídico, as mortes com etiologia desconhecida ou as causadas por outras condições patológicas, como por exemplo, carbúnculo sintomático ou trauma, que podem desenvolver sintomatologia semelhante. Alguns veterinários ainda acham que se trata de um ponto não esclarecido, mas os fazendeiros e produtores quase sempre se posicionam favoráveis a grande importância etiológica dos acidentes ofídicos (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006).

1.2 JARARACA (*Bothrops jararaca*)

No Brasil, a família *Viperidae* é a de maior interesse entre as famílias de serpentes peçonhentas existentes no país, devido à gravidade dos acidentes que causam. Essa família é composta pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerophis*, *Crotalus* e *Lachesis* (MORAIS, 2015).

A espécie *Bothrops jararaca* compõe o gênero responsável pela maior quantidade de acidentes, como supracitado. Tem como característica a presença de um aparelho inoculador do tipo solenóglifo, cabeça triangular, cauda sem maiores modificações (sem guizo). Possui coloração variada, apresentando tons castanhos claros a preto, com manchas em forma de “v” invertido ao longo do corpo. Essas serpentes medem em média um metro, mas podem chegar até 1,5 metro, os filhotes nascem com cerca de 20 cm, de ninhadas de 3 a 35 indivíduos, principalmente entre os meses de fevereiro e março. Habitam zonas rurais, perímetros urbanos, tem preferência por ambientes úmidos e locais com propagação de roedores. Apresentam hábito predominantemente noturno e quando ameaçadas são muito agressivas (FUNASA, 2001; PINHO & PEREIRA, 2001; YAMASHITA, 2013; SENISE, 2014).

1.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DO VENENO BOTRÓPICO

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são misturas complexas, compostas por diversas proteínas e compostos não-proteicos (carboidratos, lipídios, nucleotídeos, aminas biogênicas e vários íons) que têm potencial para ocasionar quadros inflamatórios locais e distúrbios hemostáticos sistêmicos. Todos estes componentes sofrem grande variabilidade, tanto inter como intraespecífica, as quais são decorrentes da idade, sexo, sazonalidade, variação geográfica e alimentação das serpentes (SENISE, 2014; MORAIS, 2015; GOMES, 2015).

A fisiopatologia do veneno botrópico é dividida por França et al. (2009) em três mecanismos: o efeito coagulante (1), decorrente da ação dos ativadores de fator X e II (protrombina) da cascata de coagulação e de enzimas trombinas-símiles; o efeito proteolítico (2), relacionado à atividade pró-inflamatória e o efeito hemorrágico (3), devido à ação de hemorraginas que provocam lesões na membrana basal dos capilares, podendo ocasionar sangramento sistêmico. Segundo Yamashita (2013), as toxinas presentes no veneno podem ativar-se sinergicamente para induzir um efeito específico, podem produzir determinado efeito a partir de um grupo específico de componentes ou apenas uma determinada toxina que pode apresentar atividades distintas, tornando o veneno botrópico um composto de alta complexidade.

De acordo com Tokarnia et al. (2008), a suscetibilidade entre os animais domésticos quanto ao veneno botrópico é diferente, em ordem decrescente os bovinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos e suínos são mais sensíveis, sendo os felinos mais resistentes, contudo, a gravidade também depende do tamanho da vítima e da quantidade de veneno inoculado. A ocorrência de acidentes ofídicos está, em geral, relacionada a fatores climáticos e ao aumento a

atividade humana em trabalhos a campo, sendo que os cães e gatos são mais acometidos no focinho, enquanto bovinos e equinos são nos membros e abdômen (FUNASA, 2001).

Comumente a picada nos acidentes ofídicos constitui em inoculação subcutânea ou intramuscular da peçonha na vítima, causando sinais locais e sistêmicos. O processo de envenenamento local por serpentes do gênero *Bothrops* é caracterizado pelo quadro de dor, edema, sangramento, linfadenomegalia, equimose, aparecimento de bolhas e necrose tecidual. A necrose é a complicação mais grave pois está relacionada aos casos de amputação de membros e distúrbios funcionais permanentes (YAMASHITA, 2013; SENISE, 2014).

Ribeiro et al. (1988) estudaram a relação entre o comprimento da *B. jararaca* com o desenvolvimento de necrose, e concluíram que no envenenamento por filhotes a formação de edema ou necrose são ocorrências raras, já quando o acidente é causado por animais adultos um dos fatores prognósticos é a formação de necrose acentuada.

A sintomatologia sistêmica, ou seja, aqueles sintomas manifestados distantes do local da picada incluem os sangramentos (gengivorragia, hematúria, epistaxe, petéquias, equimoses e púrpuras), incoagulabilidade sanguínea, devido ao consumo dos fatores de coagulação e plaquetopenia. Além desses a literatura ainda evidencia outros sintomas como vômito, sudorese, hipotensão arterial, insuficiência renal aguda e mais raramente, choque (PINHO & PEREIRA, 2001; MOTTA, 2008; YAMASHITA, 2013; SENISE, 2014; MORAIS, 2015).

A avaliação laboratorial dos efeitos do veneno botrópico foi realizada por Senise (2014), onde observa que seres humanos e animais envenenados apresentam consumo de fibrinogênio circulante, disfunção plaquetária e plaquetopenia, consumo de fatores de coagulação V, VIII e II, geração de trombina intravascular, e ativação secundária do sistema fibrinolítico.

As manifestações clínicas e laboratoriais do envenenamento, atualmente, permitem classificar os acidentes ofídicos quanto a sua gravidade em: leves, moderados e graves. Essa determinação permite a indicação do número de ampolas do soro antibotrópico que serão utilizadas na soroterapia, de acordo com o Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (FUNASA, 2001), onde a recomendação da quantidade de soro antibotrópico a ser administrado nos casos leves é de 2 a 4 ampolas, nos moderados 4 a 8 ampolas e nos casos graves 12 ampolas.

Atualmente a soroterapia por via endovenosa é o único tratamento cientificamente validado para se tratar acidentes ofídicos (MOTTA, 2008; GOMES, 2015). Nos acidentes causados pelo gênero *Bothrops* é usado o soro específico antibotrópico, que apresenta algumas limitações como, por exemplo, não neutralizar os efeitos locais causados pela peçonha, difícil

acesso, alto custo, risco de reação imunológica e eficiência até determinado tempo após inoculação do veneno (YAMASHITA, 2013; GOMES, 2015; BITENCOURT, 2015).

Devido suas limitações do tratamento usando o soro antiofídico a busca por um antídoto que cure o paciente em tempo hábil e que seja de fácil acesso, tem sido um desafio dentro das ciências médicas. As plantas e seus extratos têm sido utilizados pela medicina popular no tratamento do ofidismo e mais uma gama de condições patológicas, como estudado por Gomes (2015), onde conclui que o extrato aquoso das folhas de *Jatropha mollissima* possui substâncias ativas capazes de inibir alguns efeitos causados pelo veneno ofídico. E Bitencourt (2015), que observou os efeitos do extrato aquoso da *Mimosa tenuiflora* sobre o veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Diversas substâncias, desde origem animal, vegetal ou mineral são comumente usadas de forma empírica na tentativa de conseguir reverter a sintomatologia causada pela inoculação da peçonha (MOTTA, 2008; GOMES, 2015).

1.4 CREOLINA®

A Creolina® foi lançada no mercado nos anos 30 pela empresa WILLIAM PEARSON LTDA. Atualmente é produzida e comercializada pela EUROFARMA LABORATÓRIOS LTDA. Considerada um desinfetante preto, possui em sua natureza química uma mistura de hidrocarbonetos derivados do “coal-tar”, cresóis e fenóis. Aparentemente se apresenta em forma líquida ligeiramente turva de cor âmbar escuro, homogêneo, isento de partículas, odor forte característico e pH 8.5-9.5. Tem ampla utilização na medicina veterinária como solução germicida, antisséptica e anti-helmíntica, além disso, há relatos do uso da Creolina® na produção de explosivos, perfumes, na fabricação de reveladores fotográficos e controle de patógenos e pragas agrícolas (WIEST, 1984; STEFFEN et al., 2010).

A Creolina® é usada de forma empírica, em bovinos e pequenos ruminantes no cariri da Paraíba com finalidade de reverter o quadro clínico causado pelo envenenamento de picadas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. A medicina popular e o conhecimento empírico difundem que o produto é administrado em pequena quantidade, puro na língua do animal ou no focinho para inalação, imediatamente após a constatação do possível acidente. Atualmente essa prática é bastante difundida entre os fazendeiros e vaqueiros da Paraíba, fazendo desse o único recurso nos casos de acidentes ofídicos (dados não publicados).

O mecanismo de ação da Creolina® ainda não é totalmente esclarecido, porém alguns autores afirmam que seus compostos químicos atuam no mecanismo de coagulação das

proteínas de membrana de microrganismos, inativando as enzimas e desnaturando proteínas favorecendo a morte celular (WIEST, 1984; JAIGOBIND et al., 2007).

Tais suspeitas associadas ao histórico do uso empírico, embasam a teoria de um possível efeito desse composto sobre o veneno botrópico circulante na vítima nos casos de envenenamento, sua possível capacidade de desnaturar proteína e inativar enzimas, fornecem um amplo campo de estudo a fim de atestar a inativação do veneno em tempo hábil que podem favorecer o desenvolvimento de protocolos emergenciais, de fácil acesso e baixo custo, que seriam de grande valia dentro da medicina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Histologia Animal PPGCAN/CCA, Campus II da Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB, protocolo n° 038/2016).

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos, pesando entre 150 a 250g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George, Campus I da UFPB, João Pessoa-PB. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas de 40x50x20 centímetros (cm), sob temperatura controlada (22-24°C) e ciclo natural de luz. Água e ração comercial seca (Purina – Roedores) foram fornecidas ad libitum.

2.3 VENENO E CREOLINA®

Foram utilizadas peçonhas liofilizadas de *Bothrops jararaca* (Bja – Lote 01/08-10), fornecidas pela Central de Venenos- NEVAS do Instituto Butantan. O veneno foi mantido a -20°C e no momento do uso, pesado e dissolvido em solução salina estéril chegando a concentração de 1 mg/ml. A inoculação do veneno foi feita no terço médio da face lateral do membro posterior direito do rato, na dose de 3,2 mg/kg de peso vivo por via intramuscular, após tricotomia e antissepsia do local.

Esta dose foi determinada em experimento piloto, onde foram administradas doses crescentes do veneno botrópico (*B. jararaca*) de 0,4mg/kg a 4mg/kg em ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 300g seguindo o mesmo padrão de avaliação deste experimento, a fim de

determinar a menor dose capaz de desencadear sintomatologia local e sistêmica condizente com o envenenamento, sem óbito após 36 horas da inoculação.

A dose utilizada e avaliação dos efeitos benéficos da Creolina® sobre o veneno foram desenvolvidas com base nas informações da população, que são consolidadas na medicina popular, onde em casos de acidentes ofídicos, os produtores administram uma quantidade não conhecida do produto puro por via oral, ou em caso de ruminantes administram na narina relatando que os animais inalam o composto apresentando efeitos mais rapidamente (dados não publicados). Por não haver conhecimento a respeito da dose da Creolina® utilizada pelos produtores, foi preconizado inicialmente neste estudo a avaliação com o volume de 0,1ml em todos os grupos experimentais, por ser proporcionalmente a média do que relatam utilizar no campo sem base científica.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental objetivou abordar três diferentes vias de acesso do produto ao sistema circulatório: oral, tópica e intramuscular. Assim, quatro grupos experimentais, foram organizados de acordo com a via de administração da Creolina®, exceto o grupo controle onde foi apenas inoculado o veneno liofilizado da serpente *Bothrops jararaca*, por via intramuscular. Os animais foram identificados por números cardinais de um a cinco, dentro do grupo (Figura 1).

Cada grupo foi composto por cinco animais distribuídos aleatoriamente, sendo:

Grupo A: Inoculados com veneno botrópico (3,2mg/kg), por via intramuscular;

Grupo B: Inoculados com veneno botrópico (3,2mg/kg), por via intramuscular e administrado Creolina® (0,1ml) por via oral;

Grupo C: Inoculados com veneno botrópico (3,2mg/kg), por via intramuscular e administrado Creolina® (0,1ml) por via tópica com auxílio de gaze estéril;

Grupo D: Inoculados com veneno botrópico (3,2mg/kg), por via intramuscular e administrado Creolina® (0,1ml) também por via intramuscular na mesma seringa.

2.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A cada uma hora, desde a inoculação do veneno até o momento da eutanásia, realizada oito horas após a inoculação, usando adaptações no modelo de avaliação apresentado por Motta (2008), os animais foram inspecionados para identificar alterações no comportamento, na locomoção (ambulação e claudicação), manifestação de dor e presença de anorexia. O local da

inoculação foi também examinado para identificação de hemorragias e edemas. A urina foi inspecionada para identificação de alterações macroscópicas.

As alterações neurológicas foram avaliadas por escores: **leve/ausente** – o animal não apresentava sinais ou pouco sinais de depressão ou nenhuma alteração no estado mental, **moderado** - o animal apresentava sinais de depressão e alteração no estado mental mas respondia a estímulos e **grave** - o animal não respondia a estímulos e apresentava alteração evidente no estado mental. A locomoção foi avaliada como presente ou ausente, com ou sem apoio do membro. As alterações musculoesqueléticas, presença de dor, anorexia, hematúria e hemorragia local foram analisados como presente ou ausente. Quando presentes, o intervalo de tempo onde essas alterações foram encontradas foi notificado.

A atividade edematogênica foi medida com auxílio de um paquímetro a cada uma hora, obtendo em centímetros a largura e altura do terço médio da coxa direita dos animais usando como referência o terço médio da tíbia. Ao traçar um corte sagital imaginário na região da aferição, obtém-se uma elipse, forma geométrica que permite o cálculo da área utilizando a fórmula abaixo (Figura 2).

$$A_{elipse} = \pi \cdot ab$$

Onde, A_{elipse} = área da elipse, a = maior raio, b = menor raio e $\pi = 3,14$ (SILVA, 2014). As medidas obtidas pela fórmula foram usadas, para quantificar a evolução do edema causado pelo veneno botrópico com o passar do tempo.

2.6 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

2.6.1 PATOLOGIA CLÍNICA

O sangue foi coletado por punção intracárdica momentos antes da eutanásia por deslocamento cervical como preconiza o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015), as amostras foram acondicionadas de acordo com o exame laboratorial a ser realizado como determinado pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário (HV/CCA/UFPB) da Universidade Federal da Paraíba, onde os exames foram realizados.

O eritrograma e contagem total de leucócitos foram realizados usando o analisador hematológico veterinário pochH-100iV Diff SYSMEX, que utiliza o método de detecção por impedância para contagem. A dosagem de hemoglobina foi feita pelo método livre de cianeto, utilizando o mesmo contador de células. A determinação do volume globular foi feita pelo

método de microhematócrito usando tubos capilares. A dosagem do fibrinogênio plasmático foi feita pela técnica de precipitação pelo calor e a proteína plasmática total foi determinada por refratometria. A contagem de plaquetas foi realizada em esfregaços corados com panótico rápido.

2.6.2 HISTOPATOLOGIA

Os animais foram eutanasiados após oito horas da inoculação do veneno botrópico e realizado necropsia com coleta de rins, fígado, baço, coração e tecido muscular de cada animal. As alterações foram avaliadas e classificadas de acordo com sua intensidade em: ausente (-), leve (+), moderado (++) e intenso (+++).

As amostras foram fixadas em formol 10% por 24 horas, após isso foram desidratadas usando álcool etílico em concentrações crescentes, diafinizadas pelo xilol e impregnadas em parafina líquida na estufa (60°C), em seguida foram incluídas em blocos uniformes contendo uma amostra de cada tecido para que pudesse ser realizado cortes transversais usando micrótomo modelo LEICA RM2255. Em sequência as lâminas foram submetidas a coloração pela hematoxilina-eosina (HE) de acordo com o protocolo utilizado no Laboratório de Histologia Animal PPGCAN/CCA para posterior montagem e análise histopatológica em microscopia de luz utilizando o microscópio modelo ZEISS SPOCE A1, sendo a avaliação feita pelo mesmo profissional a fim de evitar variações analíticas (BERÇAK & PAULETE, 1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

3.1.1 ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS

Em relação as alterações neurológicas, o grupo A composto por animais que receberam apenas o veneno botrópico, apresentou achados que corroboram os encontrados na literatura. Nestes animais não houve alteração do estado de consciência, apenas prostração leve, provavelmente devido a inoculação do veneno e dor, que levou a ausência de locomoção durante as duas primeiras horas após inoculação, porém com resposta a estímulos normal (FUNASA, 2001; CASTRO, 2006; COSTA, 2010; TOKARNIA et al., 2014).

Já nos grupos B, C e D os animais que receberam a Creolina® por alguma via apresentaram grau de sedação moderado a grave que variaram até quatro horas após inoculação. Foram considerados graves os casos em que os animais não respondiam aos estímulos. Os componentes desse grupo também apresentaram espasmos musculares involuntários severos

que persistiram por duas horas após a inoculação, após isso os animais foram gradativamente voltando ao estado de consciência normal, adotando postura quadrupedal sem o apoio do membro posterior direito e respondendo a estímulos (Tabela 1).

Esses achados confirmam o potencial tóxico da Creolina® como causador de sonolência, vertigem e tremores entre outros efeitos, como descrito pelo fabricante na Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ, 2011). Os mecanismos que envolvem os efeitos tóxicos da Creolina® ainda não são completamente descritos, porém seu potencial danoso ao sistema nervoso é evidente. O grupo A que não teve contato com a Creolina® não desenvolveu nenhuma alteração dessa natureza, diferentemente dos outros grupos, esse efeito tóxico não é relatado pelos produtores que utilizam o composto de forma empírica com suposta finalidade antiofídica.

Tabela 1: Alterações identificadas em grupo de ratos Wistar após envenenamento botrópico experimental (*B. jararaca*) e tratamento com Creolina® por via oral, tópica e intramuscular.

Alterações	GRUPO A ¹	GRUPO B ²	GRUPO C ³	GRUPO D ⁴
CLAUDICAÇÃO DE APOIO	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE
AMBULAÇÃO	AUSENTE 0H-2H	AUSENTE 0H-3H	AUSENTE 0H-3H	AUSENTE 0H-4H
ALTERAÇÃO NEUROLÓGICA	AUSENTE	MODERADA 0H-4H	GRAVE 0H-3H	GRAVE 0H-2H MODERADA 2H-4H
MIOCLONIA	AUSENTE	0H-2H	0H-2H	0H-2H
HEMORRAGIA	2H-8H	2H-8H	2H-8H	AUSENTE
DOR	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE
HEMOGLOBINÚRIA	1H-3H	2H-3H	2H-3H	2H-3H
ANOREXIA	AUSENTE	0H-5H	0H-3H	0H-5H
MORTE	0/5	0/5	2/5	0/5

¹ Grupo controle que recebeu apenas o veneno botrópico (3,2mg/kg)

² Grupo que recebeu o veneno botrópico por via intramuscular (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via oral.

³ Grupo que recebeu o veneno botrópico por via intramuscular (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via tópica.

⁴ Grupo que recebeu o veneno botrópico por via intramuscular (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via intramuscular.

Ao efeito tóxico da Creolina® é atribuída a morte de dois animais do grupo C, que receberam o produto por via tópica, três horas após a inoculação do veneno. Os animais apresentavam tremores e alteração da consciência graves, não se mantinham em estação, nem respondiam a estímulos. Na necropsia apresentavam edema pouco considerável no membro

direito, grau mínimo de necrose e hemorragia, e órgãos livres de qualquer alteração macroscópica.

O veneno botrópico não possui atividade neurotóxica direta, seu mecanismo de intoxicação baseia-se em ação proteolítica, coagulante e hemorrágica, porém alguns autores observaram efeitos neurológicos nos acidentes causados por *Bothrops spp.*, e relatam que tais efeitos estão relacionados com casos de acidente vascular cerebral (AVC), provavelmente devido as lesões no endotélio vascular provocadas pelo veneno (PINHO & PEREIRA, 2001; MOTTA, 2008; SENISE, 2014). Mosquera et al. (2003) avaliaram pacientes que sofreram envenenamento por este gênero de serpentes e observaram uma prevalência de AVC de 2,6% em humanos, sendo mais de 80% de origem hemorrágica, mesmo sendo uma prevalência baixa, é importante ressaltar essa possibilidade visto o prognóstico ruim dessa ocorrência, com alta mortalidade e graves sequelas sendo correlacionado com envenenamento de serpentes sem ação neurotóxica direta. Para avaliação de possível acometimento nervoso, mais estudos são necessários, como por exemplo a histologia do encéfalo e diagnósticos por imagem (MOTTA, 2008).

3.1.2 LOCOMOÇÃO

Ao início da avaliação clínica, após administração dos compostos, todos os animais apresentaram prostração, relutância ao movimento e desconforto ao movimentar o membro inoculado com veneno. Animais do grupo A, começaram a apresentar locomoção com suspensão do membro após duas horas da inoculação (Figura 3), os componentes do grupo B e C apresentaram locomoção também com suspensão do membro após três horas da inoculação e por último, o grupo D apresentou locomoção só após quatro horas da inoculação, também com suspensão do membro acometido (Tabela 1). Até o final do experimento, oito horas após a inoculação todos os animais ainda permaneciam com suspensão do membro acometido.

O veneno botrópico apresenta ação miotóxica e proteolítica (PINHO & PEREIRA, 2001; SOUZA, 2008) que leva a um dano grave ao tecido muscular, que pode muitas vezes levar a alterações da estrutura e função, devido ação direta das fosfolipases A2 (GOMES, 2015). Essa lesão aguda pode ser a causa da relutância ao movimento evidenciada nas primeiras horas da inoculação, não corroborando os resultados obtidos por Motta (2008), que relata a presença de locomoção em animais inoculados com veneno botrópico na dose 10mg/kg. Na avaliação da locomoção entre os animais dos grupos B, C e D, que receberam a Creolina®, a diferença em uma e duas horas entre os grupos, seja provavelmente devido a alterações no grau de sedação

que está diretamente envolvido com a locomoção, sendo essa a possível causa do prolongamento da ausência de locomoção e reversão seguinte.

Os marcadores citosólicos como a enzima creatina quinase (CK), são liberados logo após lesão muscular por ruptura da membrana celular causada pelo excesso de cálcio no interstício (GOMES, 2015). A dosagem de CK pode servir de marcador para avaliação dos efeitos miotóxicos do veneno botrópico em experimentos posteriores.

3.1.3 DOR E HEMORRAGIA

Quanto a presença de hemorragia analisada neste estudo, os animais dos grupos A, B e C apresentaram uma hemorragia tecidual no membro onde foi inoculado o veneno duas horas após o procedimento (Tabela 1). A lesão ficou restrita a região da coxa do membro direito, onde o veneno parece ter sido difundido. A musculatura apresentou aspecto friável, enegrecida com áreas hemorrágicas; porções da pele também apresentaram hemorragias e alterações vasculares. A extremidade do membro não foi acometida. Os animais do grupo D não apresentaram alterações na coloração e textura do membro, nem hemorragia e necrose. Supõe-se que o composto administrado por via intramuscular em contato direto com o veneno tenha inibido a destruição celular, evidente nos outros grupos, porém mais estudos são necessários para confirmar essa relação (Figura 4).

O veneno botrópico quando inoculado naturalmente induz no local da mordida uma reação inflamatória intensa, caracterizada por edema, hemorragia com posterior necrose, dor e infiltração leucocitária (FUNASA, 2001; ARAGÃO et al., 2010; YAMASHITA, 2013; GOMES, 2015). Na inoculação experimental usando peçonha de serpente da espécie *Bothrops jararaca*, houve reprodução dos efeitos locais, com evolução analisada a cada hora. Todos os animais apresentaram dor ao flexionar o membro, além de não o apoiar, desde imediatamente após a inoculação até oito horas após, quando foram eutanasiados (Tabela 1). Esses achados são semelhantes aos encontrados por Tokarnia et al. (2006) que também relataram o aparecimento de necrose, hemorragias e edema após o envenenamento botrópico tanto experimental como de ocorrência natural, em bovinos. Igualmente os resultados encontrados por Motta (2008) que observou a formação de hemorragia, edema e degeneração tecidual em ratos Wistar após inoculação experimental de veneno botrópico.

3.1.4 INGESTÃO DE ALIMENTOS

A anorexia e dificuldade na ingestão de alimentos foi relatada na literatura, como achado nos envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* em bovinos (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006). Neste experimento, os animais dos grupos B e D não buscaram alimento por cerca de cinco horas após a inoculação. Os componentes do grupo C apresentaram alimentação normal só após três horas a partir da inoculação, e no grupo A não foi evidente nenhuma alteração no consumo de alimentos e ingestão hídrica (Tabela 1). Esses achados sugerem que as alterações de consciência causadas pela Creolina®, sejam a causa da inapetência transitória, pois os animais que não receberam esse produto apresentaram normorexia e normodipsia.

3.1.5 ALTERAÇÕES URINÁRIAS

Todos os animais experimentados (Grupos A, B, C e D), apresentaram urina de cor vermelho escuro. O grupo A apresentou tal alteração após uma hora da inoculação e os demais, duas horas após. É sabido que o veneno botrópico pode causar hematuria devido sua ação vasculotóxica, mas que a hemólise intravascular pode desencadear o aumento da hemoglobina livre e como consequente, hemoglobinúria (PINHO & PEREIRA, 2001; TOKARNIA & PEIXOTO, 2006; SENISE, 2014; FARIAS JR. & CHALKIDIS, 2015).

A coloração enegrecida geralmente é causada pela presença de hemácias ou pigmentos na urina, como hemoglobina nos casos de hemólise, e mioglobina nas lesões musculares (SINK & FELDMAN, 2006). As amostras de urina foram coletadas por micção espontânea e centrifugadas, esse processo evidenciou não se tratar de hemácias íntegras pois não houve sedimentação (Figura 5). Os animais do grupo D, não desenvolveram sintomatologia vascular local, e nestes também não houve alterações nos valores hematológicos e lesões musculares, mas houve alterações urinárias similares aos demais, sugerindo acometimento renal, a Creolina® pode ter efeito tóxico sobre o rim, além da ação sistêmica do veneno com lesão direta ao parênquima renal.

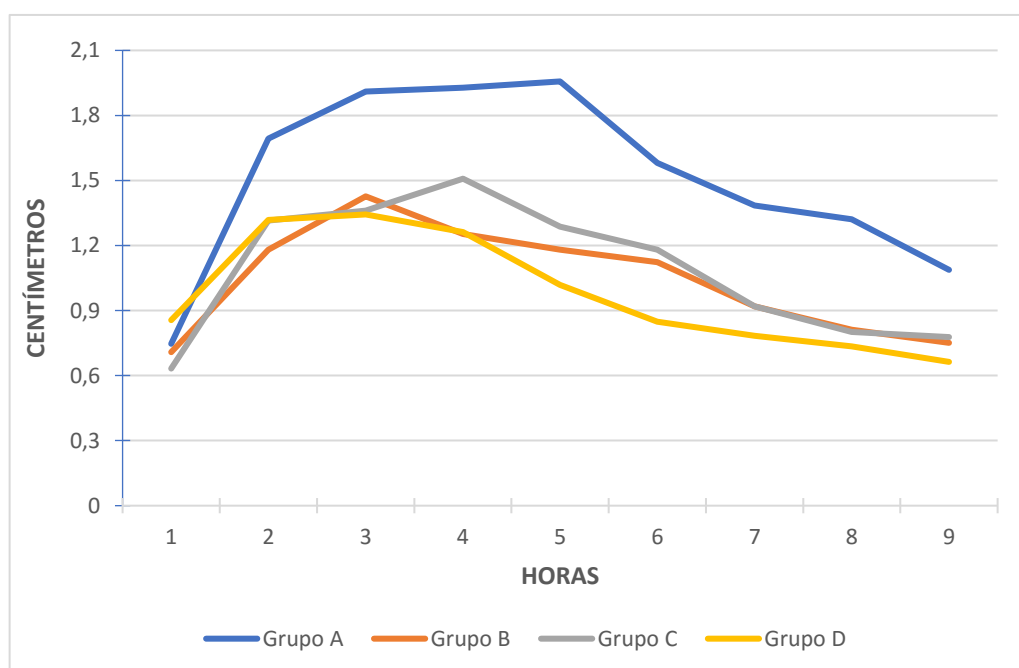
3.1.6 ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA

Seguindo o proposto para avaliação, foi possível acompanhar a evolução da atividade edematogênica causada pelo veneno a cada uma hora. Os resultados evidenciam um aumento significativo nas primeiras quatro horas após a inoculação, principalmente na primeira hora, em todos os grupos, após o pico de evolução o edema foi sendo reduzido gradativamente até oito horas após, quando os animais foram eutanasiados (Gráfico 1).

O grupo A apresentou as médias mais altas quando comparado aos outros grupos em cada hora analisada, este grupo recebeu apenas o veneno. Já os demais grupos que receberam a Creolina® por diferentes vias, obtiveram uma evolução menor do edema mas entre si não obtiveram grandes diferenças. Essa redução quando comparado ao grupo A, sugere uma possível ação da Creolina® sobre a atividade edematogênica do veneno botrópico, porém mais estudos são necessários para comprovar essa ação e quantificá-la com mais precisão.

No acometimento vascular causado pelos componentes do veneno botrópico principalmente as metaloproteases, há um aumento no fluxo sanguíneo e da permeabilidade dos vasos devido a lesão endotelial, assim há um extravasamento de líquido para o espaço intercelular caracterizando a formação de edema (CHAVES et al., 1995; SOUZA, 2008; MOTTA, 2008).

Gráfico 1: Evolução da atividade edematogênica causada pela inoculação de veneno botrópico em ratos Wistar tratados com Creolina®.



3.2 PATOLOGIA CLÍNICA

3.2.1 LEUCOGRAMA

Neste experimento, todos os animais apresentaram valores leucocitários dentro dos parâmetros para espécie (Tabela 2), este resultado pode ter sido encontrado devido a avaliação ter sido feita oito horas após a inoculação do veneno. Motta (2008) relatou a leucocitose por estresse agudo em animais inoculados com veneno botrópico com valores significativos após

24 horas do momento da inoculação. O veneno botrópico induz um aumento da permeabilidade vascular, característica a formação do edema, essa mudança estrutural na microvasculatura, permite que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação e se acumulem no local da injúria. Estudos sobre os efeitos hematológicos do veneno demonstram que sua ação causa um leucograma de estresse, caracterizado por leucocitose com neutrofilia linfopenia e eosinopenia (MOTTA, 2008; SANTORO et al., 2008).

3.2.2 ERITROGRAMA

Os animais dos grupos A, B e C tiveram considerável redução do número total de hemácias após oito horas da inoculação do veneno, estes animais também apresentaram hemólise evidente após centrifugação dos tubos capilares contendo amostras de sangue com EDTA (Figura 6). Em contrapartida, os animais do grupo D que receberam o veneno por via intramuscular juntamente com a Creolina®, apresentaram os valores dentro da normalidade para a espécie (Tabela 2).

A hemoglobina também apresentou um valor médio abaixo do referencial nos animais dos grupos A, B e C, diferentemente dos animais do grupo D, onde o valor médio se manteve dentro dos parâmetros. O hematócrito dos animais inoculados com veneno botrópico e Creolina® por via oral e tópica, ou seja, grupos A, B e C também teve os valores médios abaixo dos valores de normalidade, apenas o grupo D apresentou os valores médios de hematócrito normais compatíveis a espécie (BRANCO et al., 2011).

Tabela 2: Valores hematológicos de ratos Wistar machos, oito horas após inoculação experimental (*B. jararaca*) por via intramuscular e tratamento com Creolina® (0,1ml) por diferentes vias de administração. Valores expressos em médias \pm S.D. Referências: BRANCO et al. (2011); *UNOESTE (2008).

HEMOGRAMA	GRUPO A ¹	GRUPO B ²	GRUPO C ³	GRUPO D ⁴	REFERÊNCIAS
LEUCÓCITOS ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,2 \pm 1,4	6,9 \pm 0,7	4,4 \pm 0,5	6,2 \pm 0,3	6,3 \pm 0,5
HEMÁCIAS ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,6 \pm 0,4	4,6 \pm 0,4	4,8 \pm 0,3	6,4 \pm 0,3	7,3 \pm 0,1
HEMOGLOBINA (g/dL)	9 \pm 0,2	9,5 \pm 0,9	9,6 \pm 0,4	13,2 \pm 0,3	15,0 \pm 0,2
HEMATÓCRITO (%)	26 \pm 1	27 \pm 1	28 \pm 1	38 \pm 3	34,0 \pm 0,5
PPT (g/dL)	5,7 \pm ,1	5,7 \pm 0,3	5,6 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	6,1 \pm 0,1
FIBRINOGENIO (mg/dL)	200	200	200	400	100 – 400*
PLAQUETAS ($10^3/\mu\text{L}$)	51,5 \pm 28,8	83 \pm 37	97,2 \pm 25	810 \pm 247	730,0 \pm 30,0

¹ Grupo controle que recebeu apenas o veneno botrópico (3,2mg/kg)

² Grupo que recebeu o veneno botrópico (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via oral.

³ Grupo que recebeu o veneno botrópico (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via tópica.

⁴ Grupo que recebeu o veneno botrópico (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via intramuscular.

É atribuído ao veneno da *B. jararaca*, a atividade hemorrágica devido presença de metaloproteínases como a jararagina, capazes de provocar lesões na membrana basal dos capilares e vênulas, gerando um considerável sangramento local e sistêmico (YAMASHITA, 2013). Alterações hematológicas em pacientes que sofreram envenenamento botrópico são caracterizados pela queda no número de hemácias, volume globular (VG) e hemoglobina (MOTTA, 2008).

3.2.3 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT) E FIBRINOGÊNIO

Takahira (1999) quando observou os efeitos do veneno botrópico em cães, relatou que nas alterações hematológicas houve uma queda do valor médio da PPT e sugere que essa redução seja devido ao aumento na permeabilidade vascular provocada pelos componentes do veneno. Corroborando esses achados, os componentes dos grupos A, B e C tiveram valores reduzidos da PPT quando comparados aos valores de referência (Tabela 2). Os animais do grupo D, apresentaram seus valores médios dentro dos parâmetros de normalidade, e quando comparados aos dos demais grupos, foram consideravelmente mais elevados (Tabela 2).

A maioria dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, apresentam substâncias capazes de produzir ação coagulante por meio da hidrólise do Fator X (metaloproteínases), a protrombina (metaloproteínases) e/ou o fibrinogênio (serinaproteases). Essas substâncias causam alterações no processo de coagulação normal caracterizadas pelo consumo dos fatores de coagulação e conversão do fibrinogênio em fibrina, levando a uma incoagulabilidade sanguínea por consumo (MOTTA, 2008; YAMASHITA, 2014). O consumo do fibrinogênio é visto na maioria dos estudos *in vivo* feitos com veneno botrópico (SPADACCI-MORENA et al., 2006; TAKAHIRA, 1999). Neste experimento os valores do fibrinogênio não demonstraram alteração evidente e se mantiveram dentro dos padrões de normalidade para a espécie em todos os grupos experimentados, igualmente o encontrado por Motta (2008) que usou a mesma técnica de precipitação pelo calor, para quantificar o fibrinogênio em animais inoculados com veneno botrópico. Supõe-se que a hipofibrinogenemia encontrada por outros autores não foi observada devido as diferentes técnicas utilizadas para este fim. Outros métodos mais fidedignos podem ser usados para quantificar o fibrinogênio, como o método colorimétrico de Ratnooff e Manzie, utilizado por Senise (2014) e Yamashita (2013).

3.2.4 PLAQUETOGRAMA

Os resultados obtidos a partir da avaliação hematológica dos animais que tiveram contato com o veneno botrópico, evidenciam a ação vasculotóxica capaz de induzir queda nos valores analisados, semelhante ao encontrado em estudos utilizando essa peçonha, exceto os animais do grupo D (MOTTA, 2008; SANTORO et al., 2008; SENISE, 2014). As alterações nos grupos B e C que tiveram contato com a Creolina® por via oral e tópica, respectivamente e o veneno, sugerem que a Creolina® não foi capaz de alterar a capacidade do veneno em induzir alterações nos componentes sanguíneos nos animais. Os animais do grupo D receberam o veneno botrópico juntamente com a Creolina® por via intramuscular, e não apresentaram alterações do eritrograma condizentes com o envenenamento, sugerindo uma ação neutralizante da Creolina® sobre os componentes contidos no veneno que induzem lesões hemodinâmicas.

As plaquetas e os fatores de coagulação são os principais relacionados com o mecanismo de ação do veneno botrópico. Diversos componentes contidos na peçonha causam distúrbios na função plaquetária e plaquetopenia. A alteração da secreção plaquetária causada pelo veneno é temporária, já sua ação sobre os mecanismos que envolvem a agregação é duradoura (SANTORO et al., 2004; YAMASHITA, 2013). Neste experimento os grupos A, B e C tiveram uma contagem significativamente menor de plaquetas quando comparados aos valores de referência para espécie (Tabela 2), além da presença de agregação em todas as amostras, semelhante aos efeitos do veneno botrópico encontrados por diversos autores (PINHO & PEREIRA, 2001; TOKARNIA & PEIXOTO, 2006; SENISE 2014). Contudo, os animais do grupo D apresentaram os valores dentro dos parâmetros estipulados para espécie e sem formação de agregados. Esses resultados sugerem uma ação da Creolina® sobre a capacidade do veneno de induzir alterações neste tipo celular, assim reduzindo de maneira significativa as lesões produzidas pelo envenenamento botrópico.

3.3 HISTOPATOLOGIA

As amostras de baço, fígado e coração, de todos os grupos apresentaram-se sem alterações histopatológicas, resultados que sugerem a incapacidade da peçonha e da Creolina®, em causar lesões nestes tecidos após oito horas, resultados condizentes com a fisiopatogenia do veneno botrópico relatada na literatura (MOTTA, 2008; YAMASHITA, 2013; SENISE, 2014). Quanto aos efeitos tóxicos da Creolina®, estudos mais específicos são necessários pois devido seu potencial tóxico para alguns sistemas, alterações histopatológicas podem ser evidenciadas com o tempo.

Uma das complicações sistêmicas e frequente causa de morte nas vítimas de acidentes ofídicos causados por *B. jararaca*, é a insuficiência renal aguda (IRA) (PINHO & PEREIRA, 2001). A insuficiência renal com desenvolvimento agudo, pode ser reversível devido o envolvimento de nefrotoxinas, que muitas vezes são substâncias endógenas como o cálcio, hemoglobina, mioglobina, urato, entre outras. As características histopatológicas dessa lesão são a degeneração e necrose dos túbulos contorcidos renais, com deslocamento da membrana basal, e dilatação com posterior oclusão da luz tubular por cilindros hialinos ou granulosos (NUNES et al., 2010).

As amostras dos animais que recebem veneno botrópico experimentalmente apresentaram alterações que confirmam o efeito danoso do veneno sobre o sistema renal da vítima (degeneração hidrópica, necrose tubular aguda, presença de cilindros hialinos e granulosos), mas que entre os grupos experimentados apresentaram graus pouco variados (Tabela 3). A presença de cilindros hialinos e granulosos na luz dos túbulos renais foi evidente em todos os animais experimentados (Figura 7). Os animais do grupo D, apresentaram uma leve diminuição da proporção de cilindros quando comparado aos demais, sendo essa alteração classificada como moderada (++). A presença de necrose tubular e degeneração hidrópica nos grupos A e B sugerem uma lesão glomerular com perda de proteína, e corroboraram os achados de Motta (2008) e Takahira (1999) os quais encontraram alterações semelhantes nos estudos com veneno botrópico em ratos e cães, respectivamente.

Tabela 3: Média das alterações histopatológicas de rim e músculo de ratos Wistar após oito horas da inoculação do veneno botrópico e administração da Creolina®.

ALTERAÇÕES RENAIS	A¹	B²	C³	D⁴
Cilindros granulosos	+++	+++	+++	++
Cilindros hialinos	++	+++	+++	+
Degeneração Hidrópica	+	+	+	-
Necrose - Túbulos Proximais	+	+	-	-
ALTERAÇÕES MUSCULARES	A¹	B²	C³	D⁴
Hemorragia	+++	+++	+++	-
Edema	+++	+++	++	+
Infiltrado Neutrófilico	-	-	++	+++
Degeneração Hialina da Fibra	+	+	-	-

¹ Grupo controle que recebeu apenas o veneno botrópico (3,2mg/kg)

² Grupo que recebeu o veneno botrópico (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via oral.

³ Grupo que recebeu o veneno botrópico (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via tópica.

⁴ Grupo que recebeu o veneno botrópico (3,2mg/kg) e Creolina (0,1ml) por via intramuscular.

As avaliações histopatológicas das amostras de musculatura esquelética do local da lesão, confirmaram a capacidade do veneno botrópico de causar edema, hemorragia e necrose na região onde foi inoculado a peçonha (FARIAS JR. & CHALKIDIS, 2015; BITENCOURT, 2015; GOMES 2015). Essas lesões também confirmaram as suspeitas dos achados macroscópicos (Figura 4-A). A hemorragia e edema foram as alterações histopatológicas encontradas na musculatura, mas que se estenderam pelo subcutâneo e atingiram porções da pele (Figura 8-A), evidenciando a severidade da peçonha botrópica quanto aos distúrbios locais, diferentemente dos efeitos do veneno crotálico (FUNASA, 2001).

Os animais dos grupos A, B e C apresentaram hemorragia e edema graves (+++), diferente dos componentes do grupo D, que receberam o veneno e a Creolina® por via muscular, e na avaliação histopatológica apresentaram apenas edema leve e nenhum grau de hemorragia, sem presença de degeneração da fibra muscular (Figura 8), esses achados corroboram os achados clínicos e macroscópicos encontrados neste experimento (Figura 4). Além da hemorragia e edema, nos grupos A e B, algumas fibras apresentaram degeneração hialina da fibra muscular caracterizada por tumefação do feixe, aumento da eosinofilia, perda da angulosidade e estriações da fibra muscular (McGAVIN & ZACHARY, 2013).

Os animais dos grupos C e D que receberam a Creolina® por via tópica e intramuscular, respectivamente, apresentaram infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos na musculatura, indicando uma reação imunológica aguda. Nos animais do grupo C, o composto que foi aplicado sobre a pele, parece ter sido absorvido e capaz de induzir a resposta do sistema imunológico com migração leucocitária para o local, de forma similar ao grupo D onde a Creolina® foi aplicada diretamente na musculatura (Figura 8-D).

Os resultados obtidos a partir da avaliação histopatológica sugerem um efeito neutralizante da Creolina® sobre o veneno botrópico (*B. jararaca*), quando administrada por via intramuscular.

Os animais do grupo B não apresentaram diferença microscópica quando comparados aos do grupo A que receberam apenas o veneno. Levantando a hipótese de que a Creolina® por via oral, na dose utilizada, não foi capaz de desenvolver ação antiofídica, capaz de reverter os achados.

Os animais do grupo C que receberam por via tópica e apresentaram leves variações, sugere com isso uma absorção melhor do composto, quando comparado ao grupo B, mas que suas concentrações absorvidas pelo animal não foram capazes de neutralizar a ação do veneno tão efetivamente quando comparados aos resultados do grupo D.

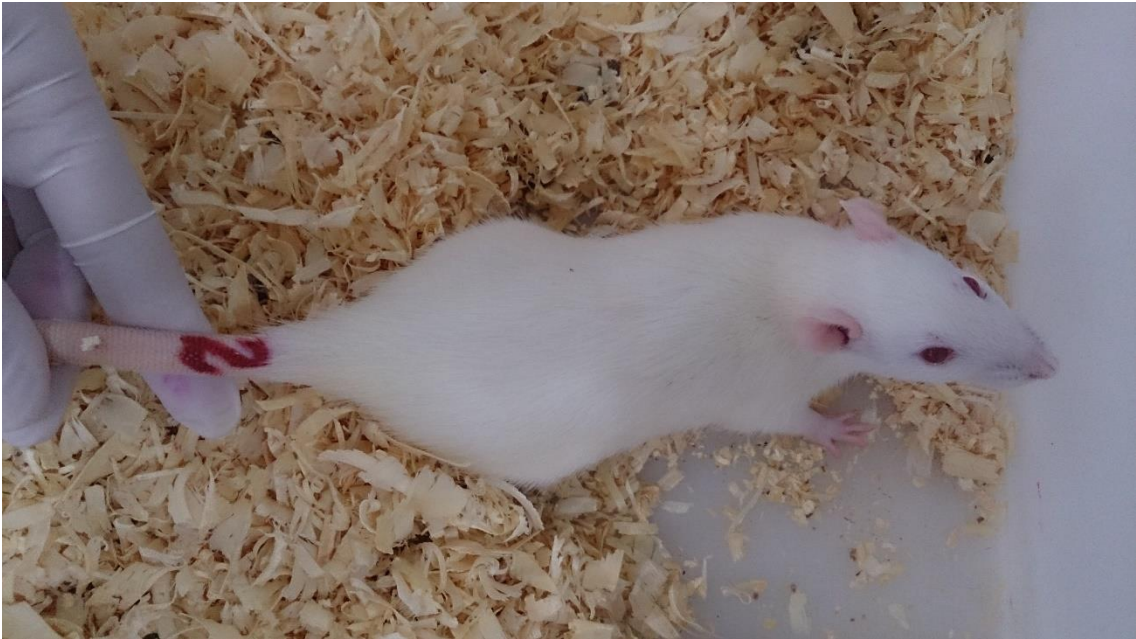


Figura 1: Rato da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar.

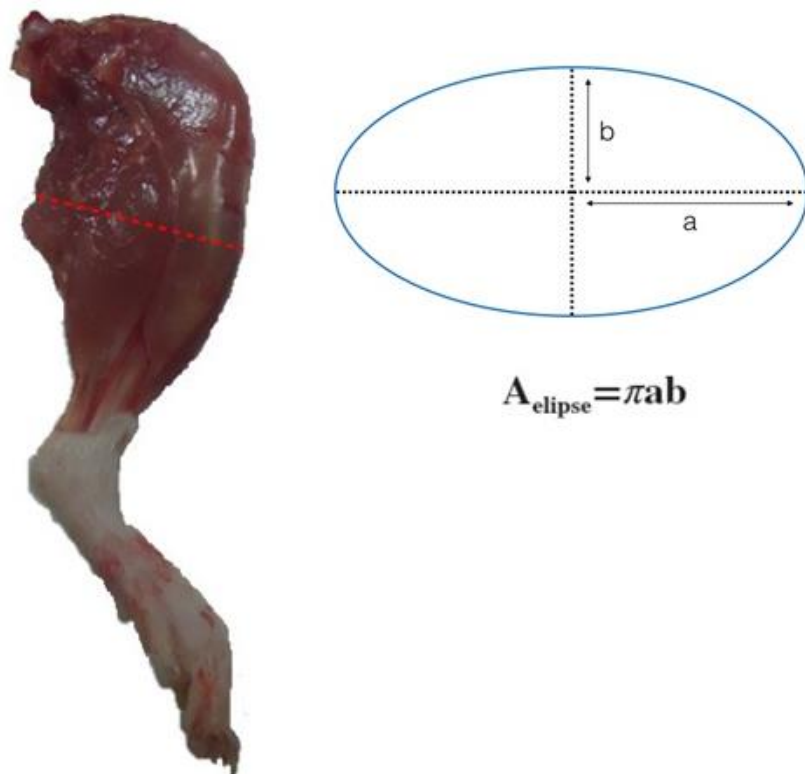


Figura 2: Membro posterior de rato Wistar. (Linha tracejada: Área de aferição pelo paquímetro para quantificação do edema). Esquematização de uma elipse e fórmula para calcular área.

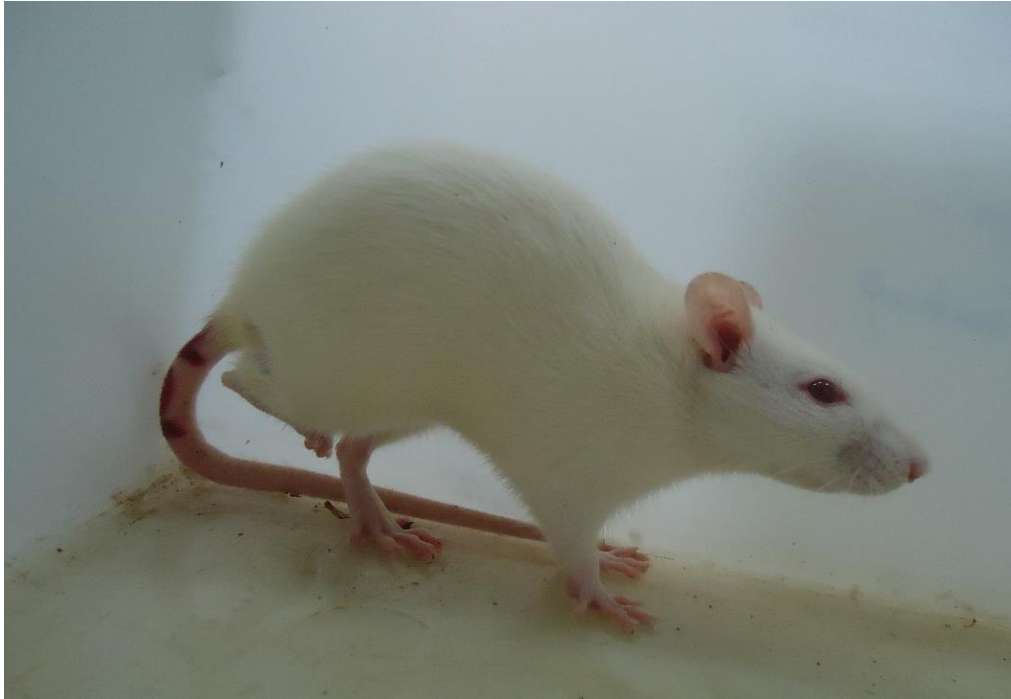


Figura 3: Rato Wistar com suspensão do membro direito, duas horas após inoculação do veneno botrópico (*Bothrops jararaca*).

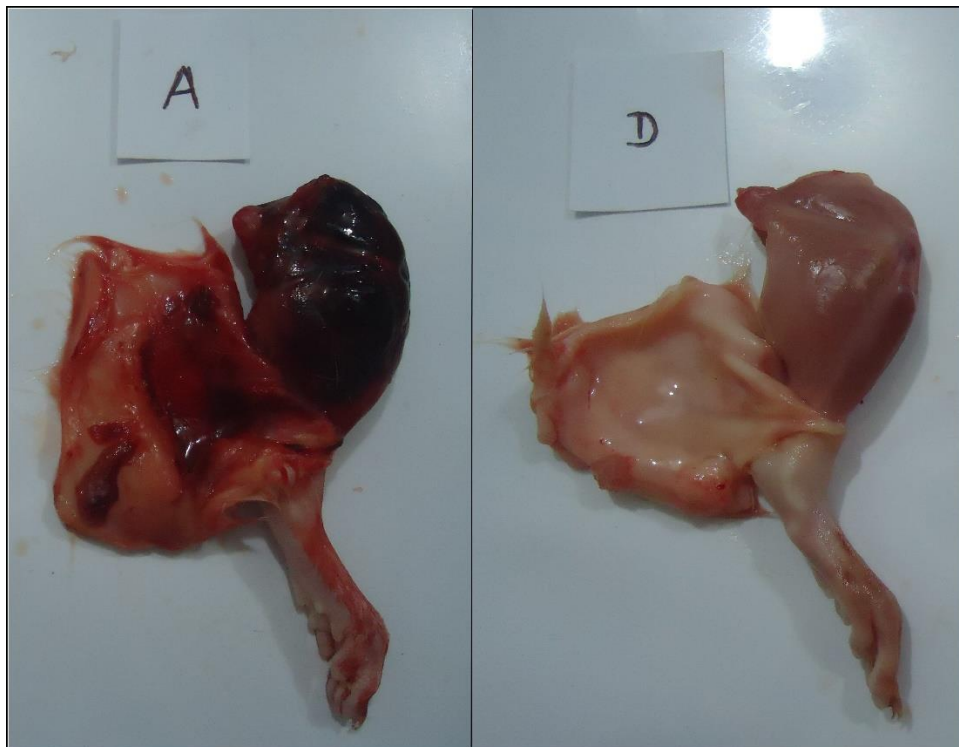


Figura 4: (A) Membro posterior direito inoculado com veneno botrópico por via intramuscular apresentando edema e hemorragia evidentes. (D) Membro posterior direito inoculado com veneno botrópico e Creolina® por via intramuscular apresentando leve edema e nenhuma alteração de coloração e conformação tecidual.

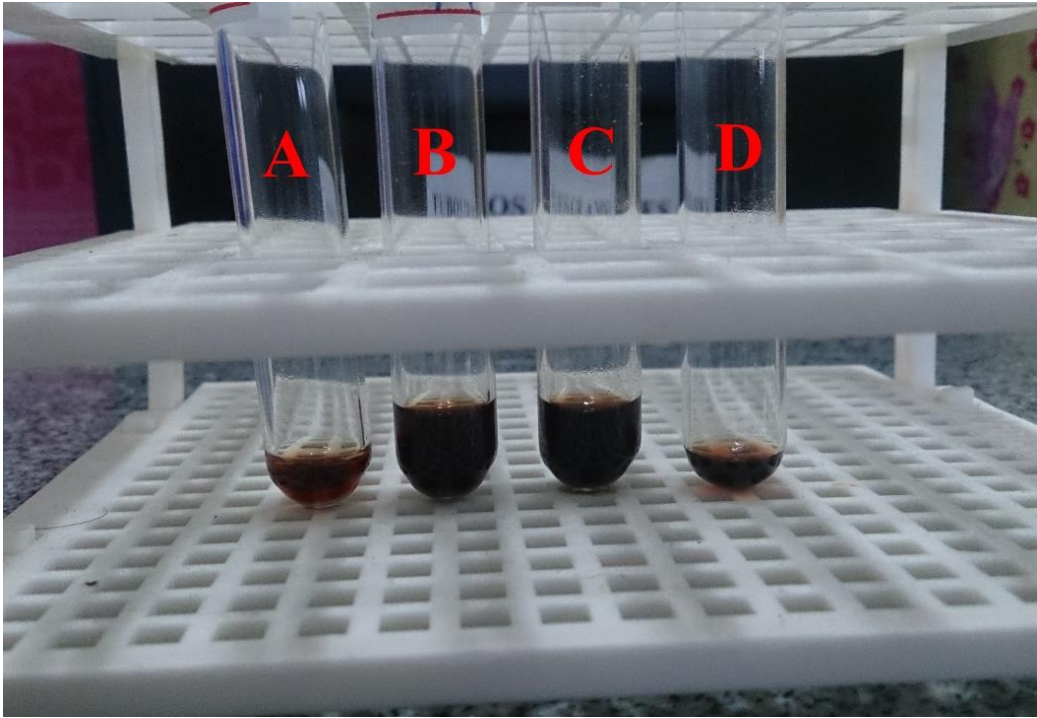


Figura 5: Amostras de urina dos 4 grupos experimentados após centrifugação, evidenciando ausência de sedimentação.

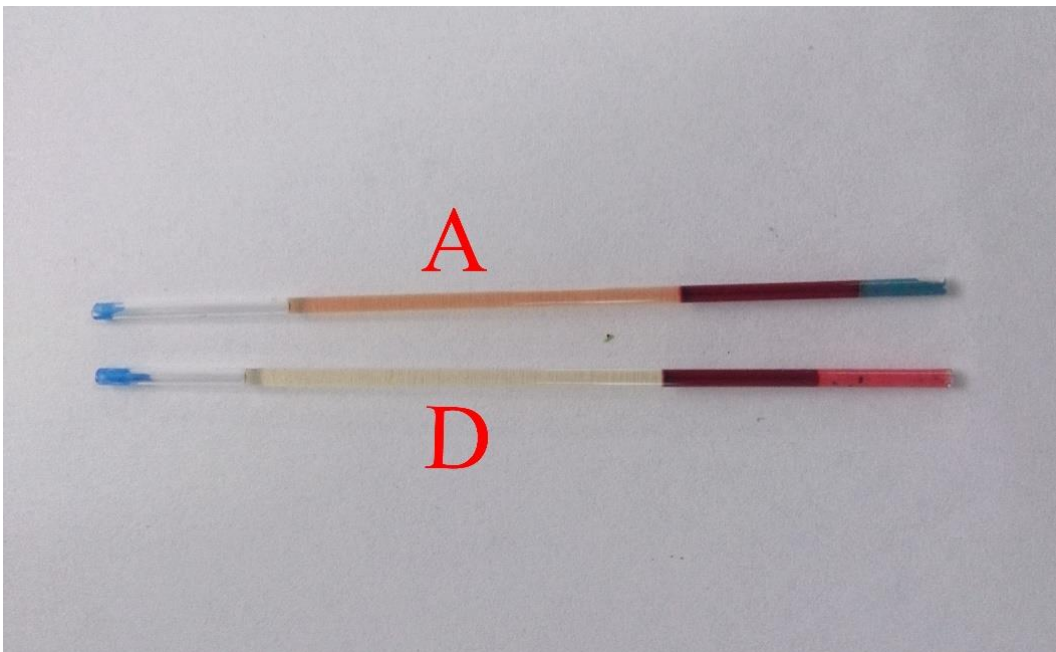


Figura 6: Tubos capilar usados para técnica de microhematócrito. (A) Amostra de animal do grupo A com evidente hemólise; (D) Amostra de animal do grupo D com plasma translúcido sem indícios de hemólise.

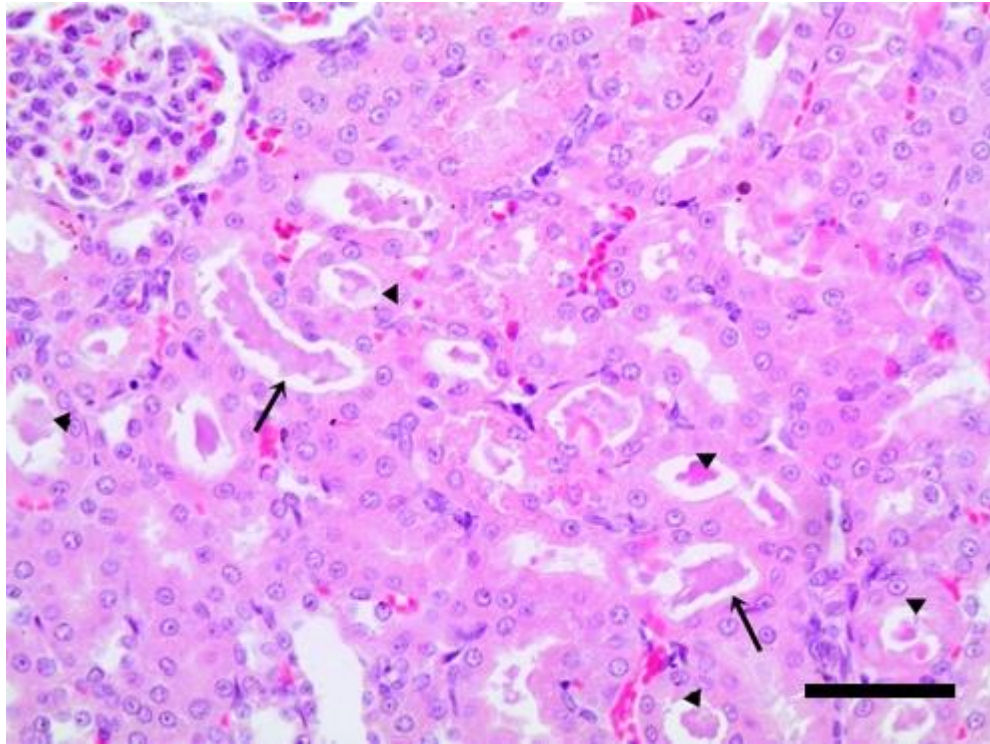


Figura 7: Fotomicrografia da região cortical do rim esquerdo de rato Wistar, oito horas após inoculação do veneno botrópico. Presença de cilindros granulosos em túbulos contorcidos distais (setas), e cilindros hialinos em túbulos contorcidos proximais (ponta de setas) (HE, 40x).

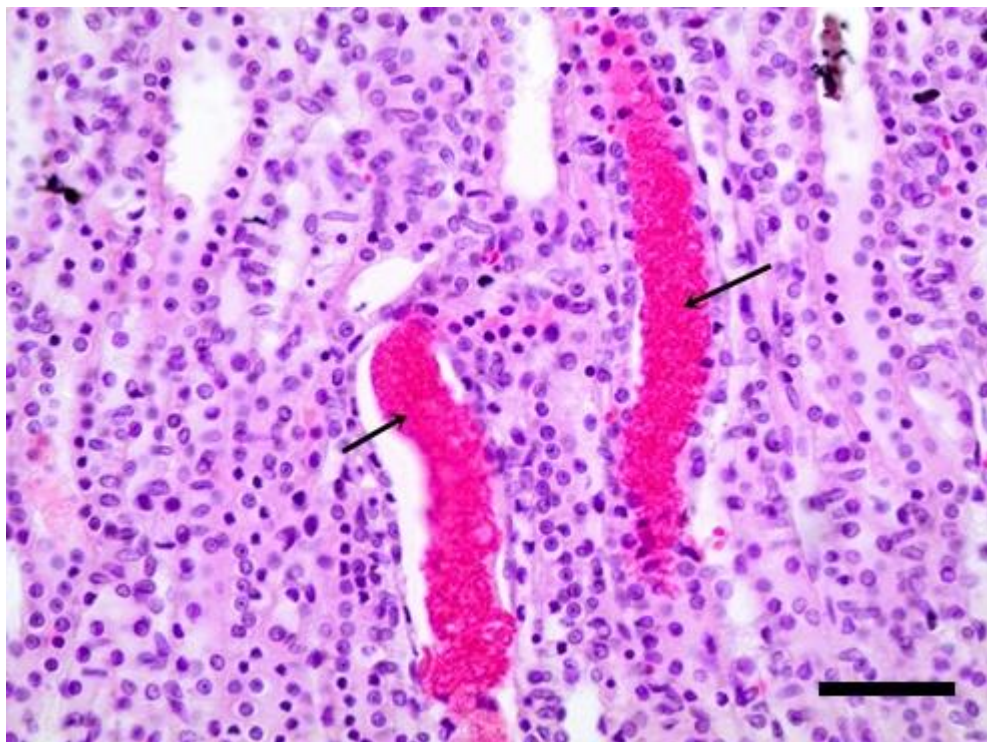


Figura 8: Fotomicrografia de região medular do rim esquerdo de rato Wistar, oito horas após inoculação do veneno botrópico. Presença de cilindros hialinos em túbulos (setas) (HE 40x).

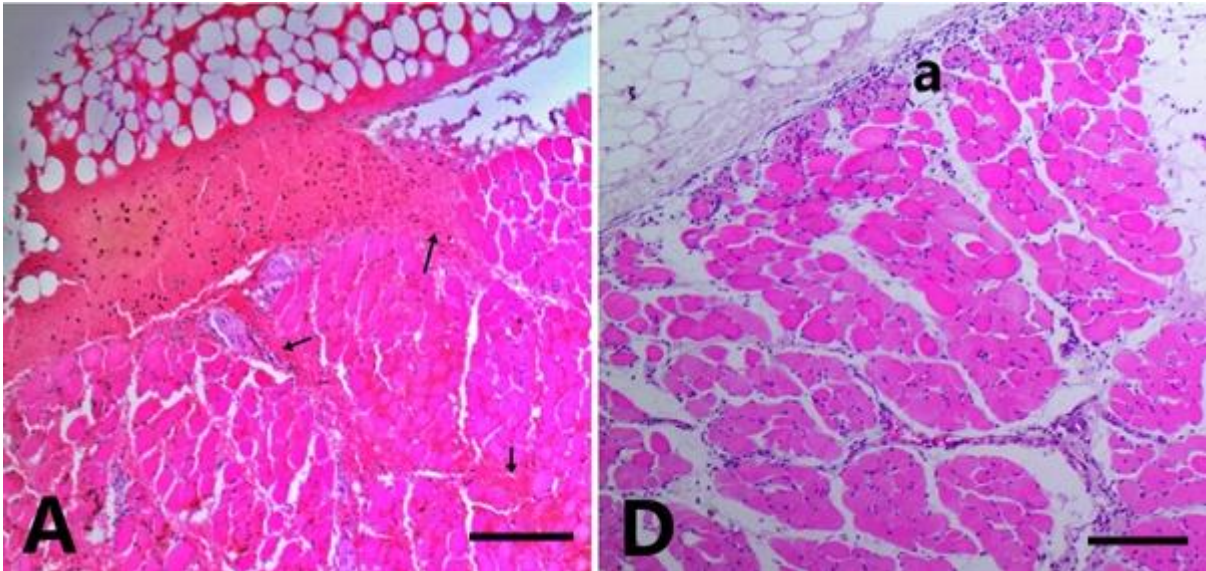


Figura 9: Fotomicrografias da musculatura da parte posterior da coxa direita de ratos Wistar, oito horas após inoculação do veneno botrópico. (A) Hemorragia difusa (setas) e edema acentuado após ação do veneno (HE, 10x); (D) Presença de infiltrado inflamatório (a) e edema leve após inoculação do veneno botrópico e Creolina® por via intramuscular na parte posterior da coxa direita (HE, 10x).

4. CONCLUSÕES

O veneno botrópico causa lesões locais e sistêmicas características, quando inoculado por via intramuscular em ratos Wistar na dose 3,2mg/kg.

A Creolina® apresenta efeitos tóxicos consideráveis quando administrada por vias oral, tópica e intramuscular e não apresenta atividade antiofídica considerável quando administrada pelas vias oral e tópica na dose de 0,1ml por animal.

A Creolina® apresenta atividade antiofídica sobre o veneno da serpente *Bothrops jararaca*, quando administrada por via intramuscular juntamente ao veneno, evitando o desenvolvimento da sintomatologia local e sistêmica característica da intoxicação.

5. REFERÊNCIAS

ARAGÃO, A.P.; TOKARNIA, C.H.; GRAÇA, F.A.S; FRANÇA, T.N.; COELHO, C.D.; CALDAS, S.A.; PEIXOTO, P.V. **Envenenamento experimental por *Bothropoides jararaca* e *Bothrops jararacussu* em ovinos: aspectos clinicopatológicos e laboratoriais.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n.9, p.717-728, 2010.

BERÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v. 1 e 2. 1976.

BITENCOURT, M.A.O. **Avaliação anti-inflamatória e anti-peçonheta das espécies *Hancornia speciosa* e *Mimosa tenuiflora* em modelos experimentais de inflamação e envenenamento induzido por *Bothrops jararaca* e *Tityus serrulatus***. 2015. 150f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

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

BRANCO, A.C.S.C; DINIZ, M.F.F.M; ALMEIDA, R.N. et al. **Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George**. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v.14, n.2, p.209-214, 2011.

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

CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIERREZ, J.M. **Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice**. Toxicon, v.33, p.9-31, 1995.

CINTRA, C.A.; JÚNIOR, D.P.; GONÇALVES L.G.G. **Acidentes ofídicos em animais domésticos**. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer. v.18, n.10, p. 58, 2014.

CONCEA. **Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Anexo 1, Brasília-DF. 2015.

COSTA, T.R. **Avaliação da atividade antiofídica do extrato vegetal de *Anacardium humile*: Isolamento e caracterização fitoquímica do ácido gálico com potencial antimiotóxico**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

FARIAS JR, U.A.; CHALKIDIS, H.M. **Envenenamento clínico de bovino por peçonha de *Bothrops atrox* no município de Oriximiná-Pará, Amazônia Central, Brasil – Relato de caso.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v.37, n.3, p.264-268, 2015.

FISPQ. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico – **CREOLINA 100ml.** Eurofarma Laboratórios LTDA. Rio de Janeiro, p. 14, 2011.

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, editors. Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 81-95.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde – Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos.** Brasília, 2ª ed., 2001.

GOMES, J.A.S.G. **Inibição dos efeitos locais induzidos pelas peçonhas das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Bothrops jararaca* pelo extrato aquoso das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Bail.** 2015. 64f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêutica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN.

JAIGOBIND, A.G.A.; AMARAL, L.; JAISINGH, S. **Desinfetante doméstico – Dossiê técnico.** Instituto de Tecnologia do Paraná. p.23, 2007.

McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MORAIS, I.C.O. **Efeito nefrotóxico direto induzido pela fração l-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*.** 2015. 98f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE. 2015.

MOSQUERA, A.; IDROVO, L.A.; TAFUR, A.; DEL BRUTTO, O.H.; **Stroke following *Bothrops spp.* snakebite.** Neurology, v.60, n.10, p.1577-80, 2003.

MOTTA, Y.P. **Aspectos clínico, laboratorial e histopatológico da intoxicação experimental pelos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* em ratos Wistar tratados com antiveneno e *Mikania glomerata*.** 2008. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

NUNES, T.F.; BRUNETTA, D.M.; LEAL, C.M.; PISI, P.C.B; RORIZ-FILHO, J.S. **Insuficiência renal aguda**. Medicina (Ribeirão Preto), v.43, n.3, p.272-82, 2010.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. **Ofidismo**. Revista da Associação Médica Brasileira, v.47, n.1, p.24-29, 2001.

RIBEIRO, L.A.; ALBUQUERQUE, M.J.; CAMPOS, V.A.; KATZ, G.; TAKAOKA, N.Y.; LEBRÃO, M.L., et al. **Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93**. Revista da Associação Médica Brasileira, v.44, n.4, p.312-8, 1998.

SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S. **Platelet dysfunction during Bothrops jararaca snake envenomation in rabbits**. Thrombosis Haemostasis, v.92, n.2, p.369-9, 2004.

SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S.; FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C.; THEAKSTON, R.D.G.; DAVID A.; WARRELL, D.A. **Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, Bothrops jararaca, in Brazil**. Toxicon, v.51, n.8, p.1440-1448, 2008.

SENISE, L.V. **Avaliação dos distúrbios hemostáticos induzidos por venenos de serpentes Bothrops jararaca (Squamata: Viperidae) adultas e filhotes e eficácia do tratamento com soro antibotrópico**. 2014. 140f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

SILVA, J. P. **Como calcular a área e o perímetro de uma elipse?** Mestre em Matemática, Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

SINK, C. A.; FELDMAN, B. F. **Urínalise e Hematologia Laboratorial para o Clínico de Pequenos Animais**, 1. ed., São Paulo: Rocca, 2006.

SOUSA, C.A.T, **Efeitos locais e sistêmicos envolvidos no envenenamento induzido pelo veneno da serpente Bothrops atrox**. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho-RO.

SPADACCI-MORENA, D.D.; TOMY, S.C.; SANO-MARTINS, I.S.; KATZ, S.G. **The effect of experimental Bothrops jararaca envenomation on pregnant mice**. Toxicon, v.47, p.196–207, 2006.

STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; STEFFEN, G.P.K; MORALES, D.; ECKHARD, D.P.; BASSACO, A.C. **Efeitos da Creolina sobre a nematofauna associada a cultura do fumo.** Tecno-lógica, v.14, n.1, p.20-25, 2010.

TAKAHIRA, R.K. **Perfil hematológico, hemostático, bioquímico e histopatológico do envenenamento experimental de cães por *Bothrops alternatus* Duméril, 1854 e *Bothrops moojeni* Hoge, 1966.** 1999. 195f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; **A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.26, n.2, p.55-68, 2006.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; MALAFAIA, P.; PEIXOTO, P.V. **Acidente ofídico em ovinos causado por *Bothrops jararaca*.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.28, n.12, p.643-648, 2008.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; DÖBEREINER, J. **Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus* e *Bothrops* spp. em animais de produção.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.34, n.4, p.301-312, 2014.

UNOESTE. **Valores de referência para ratos Wistar criados no Biotério central da Universidade do Oeste Paulista.** Presidente Prudente: Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista, 2008.

WIEST, J.M. **Desinfecção e desinfetantes.** In: GUERREIRO, M.G. et al. Bacteriologia Especial: com interesse em saúde animal e saúde pública. Porto Alegre, Sulina, Cap. 5, p.51-65. 1984.

YAMASHITA, K.M. **Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*.** 2013. 99f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer favorável da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFPB.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO DE PESQUISA

I. DADOS DO PROJETO		
1. Título do projeto: PESQUISA DA POTENCIAL TERAPÊUTICO DA CREOLINA (PEARSON) NA REVERSÃO DE ACIDENTES OFÍDICOS EM BOVINOS E RATOS		
2. Pesquisador responsável: Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra		
3. Centro (Sigla): CCA/UFPB	4. Departamento: Departamento de Medicina Veterinária	
5. Número de protocolo: 038/2016	6. Data de submissão: 22/05/2016	7. Data da relatoria: 10/06/2016; 17/06/2016
8. Apresentação do projeto: Acidentes ofídicos tem grande importância na bovinocultura nacional, geralmente culminam em morte dos acometidos gerando grande perda econômica, essa problemática afeta tanto grandes criações quanto o sistema de agricultura familiar dos pequenos produtores, onde muitas vezes não se tem disponível em tempo hábil o tratamento indicado nos casos de acidentes ofídicos, assim fazendo uso apenas de técnicas empíricas da medicina popular. A creolina é amplamente usada pelos pequenos produtores e vaqueiros da Paraíba em casos de picada de jararaca (<i>Bothrops jararaca</i>) em bovinos, caprinos e ovinos, por apresentar, segundo populares, resultados quase sempre satisfatórios faz dessa técnica a única usada nesses casos. Não há na literatura estudos científicos que apontem ou teste o efeito da Creolina em casos de picada de jararacas em animais com a reversão dos sintomas como os ditos populares revelam, sendo assim, torna-se importante tal experimentação para provar tecnicamente tal medida, ou a desmitificar.		
9. Substituição de metodologia:	<input type="checkbox"/> SIM	<input checked="" type="checkbox"/> NÃO
9.1 Comentários: <i>(Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia para redução do número de animais)</i>		
II. INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS		
1. Espécie: Rattus novergicus – Linhagem Wistar	2. Número amostral: 32 unidades, sendo 16 machos e 16 fêmeas.	
3. Justificativa do número amostral:	<input type="checkbox"/> Adequado	<input checked="" type="checkbox"/> Inadequado
3.1 Comentários: O solicitante acatou a retirada do grupo com administração apenas do veneno de jararaca. Precisa apenas ajustar os números tanto no formulário quanto no projeto.		
4. Acomodação e manutenção:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Inadequado
4.1 Comentários:		

5. Manipulação dos animais: Adequado Inadequado

4.1 Comentários:

6. Analgesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

6.1 Comentários:

Os autores justificam que os analgésicos interfeririam nas reações dos tratamentos.

7. Anestesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

7.1 Comentários:

8. Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

8.1 Comentários:

Anestesia com propofol (12mg/Kg), seguida de deslocamento cervical. Esta forma de eutanásia está descrita como recomendável nas DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA (2013) como forma de eutanásia para roedores.

III. SITUAÇÃO DO PROJETO

Aprovado *Com pendência* *Negado*

1. Considerações sobre o parecer:

O projeto apresenta fundamentação teórica, relevância científica e viabilidade técnica. Os autores retiraram o grupo experimental questionado. Baseado no exposto, nosso parecer é favorável à execução deste projeto, salvo melhor juízo desta comissão.

João Pessoa, 17 de junho de 2016.
Comissão de Ética no Uso de Animais.