Fernanda Sakai

***Glândula Acessória e Ducto Primário de Serpente *Bothrops jararaca*
durante o ciclo de produção de veneno: um estudo morfológico***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular e
Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

São Paulo
2011

Fernanda Sakai

***Glândula Acessória e Ducto Primário de Serpente *Bothrops jararaca*
durante o ciclo de produção de veneno: um estudo morfológico***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia celular e
Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular
e Tecidual

Orientador: Norma Yamanouye

Co-orientador: Sylvia Mendes Carneiro

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sakai, Fernanda.

Glândula acessória e ducto primário de serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno: um estudo morfológico / Fernanda Sakai. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Norma Yamanouye.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Mecanismos envolvidos na produção e secreção de veneno em serpentes.

Versão do título para o inglês: Accessory gland and primary duct of the *Bothrops jararaca* snake during the venom production cycle: a morphological study.

Descritores: 1. Serpentes 2. *Bothrops jararaca* 3. Glândula acessória 4. Ducto primário 5. Morfologia 6. Secreção I. Yamanouye, Norma II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0128/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Sakai.

Título da Dissertação: Glândula acessória e ducto primário de serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno: um estudo morfológico.

Orientador(a): Norma Yamanouye.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Mecanismos celulares envolvidos na produção e secreção de veneno na serpente *Bothrops jararaca*: sistema nervoso simpático na glândula acessória e no ducto primário" **protocolo nº 374/07**, sob a responsabilidade de Norma Yamanouye, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/04/2007.

We certify that the research entitled "Cellular mechanisms involved in venom production and secretion in the *Bothrops jararaca* venom gland: Sympathetic nervous system in the accessory gland and primary duct", **protocol nº 374/07**, under the responsibility of Norma Yamanouye, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 04/10/2007.

A CEUAIB autorizou as mudanças solicitadas pela pesquisadora, ou seja, alteração no prazo de vigência.

Vigência do Projeto: 03/2007 – 04/2013	Nº de animais/espécie
Laboratório de Farmacologia	70 serpentes <i>Bothrops jararaca</i>

São Paulo, 19 de abril de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
**AUTORIZAÇÃO ESPECIAL DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO
PATRIMÔNIO GENÉTICO Nº 01/2009**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, IBAMA no uso das competências que lhe foram conferidas pela Deliberação nº 040/CGEN, de 24 de setembro de 2003, resolve:

Autorizar o **Instituto Butantan**, constituído sob o CNPJ nº 61.821.344/0001-56, representado legalmente pelo Diretor Otávio de Azevedo Mercadante, inscrito sob o CPF nº 041.394.618-53, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético no âmbito dos projetos de pesquisa que compõem o portfólio de projetos do Instituto Butantan para o desenvolvimento de pesquisas científicas sem perspectiva de uso comercial, aplicação industrial ou bioprospecção.

Local de depósito de subamostra: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e o Instituto Butantan (Deliberações do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético nº 2, de 8 de julho de 2002 e nº 147, de 29 de Junho de 2006, respectivamente).

Localização da Instituição detentora desta autorização: Av. Vital Brazil, 1500, São Paulo, SP, 05503-900.

Validade da Autorização: 23 de janeiro de 2009 a 23 de janeiro de 2011, prorrogável por mais dois anos. O Instituto Butantan deverá enviar ao Ibama relatório anual das atividades desenvolvidas no âmbito dos projetos de pesquisa autorizados, nos termos do Decreto nº 4.946/2003.

Esta autorização vincula-se às informações fornecidas e termos de compromissos assinados pelo requerente constantes no processo nº 02001.005106/2008 e demais processos pertinentes. Não estão autorizadas atividades de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade de bioprospecção, desenvolvimento tecnológico ou uso comercial e/ou industrial.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das referidas amostras, obriga-se a instituição solicitante a adotar as providências cabíveis junto ao Conselho de Gestão de Patrimônio Genético, com vistas à formalização de Contrato de Utilização do Patrimônio Genético e de Repartição de Benefícios, conforme Medida Provisória nº 2.186/16, de 2001, Decretos nº 3.945/2001 e nº 4.946/2003.

Durante a vigência desta autorização, o Instituto Butantan poderá inserir novas atividades ou projetos no portfólio, desde que observe as condições estabelecidas na legislação pertinente e, no prazo de sessenta dias a partir do início da nova atividade ou projeto, comunique ao IBAMA qualquer alteração ou inserção de novas atividades ou projetos no portfólio do Instituto Butantan, conforme disposto no § 4º, art. 9º, do Decreto nº 4.946/2003.

As remessas de componentes do patrimônio genético deverão ser precedidas de assinatura dos Termos de Transferência de Material, conforme dispõe o Art. 19, inciso IV, da Medida Provisória nº 2.186-16/2001. Para a remessa ou transporte de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, o Instituto Butantan, deverá solicitar ao IBAMA licença de exportação complementar a esta Autorização Especial.

ROBERTO MESSIAS FRANCO
Presidente do Ibama

Brasília, 23 de janeiro de 2009.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **138** nas fls. **74** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Norma Yamanouye, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Mecanismos envolvidos no controle da produção e secreção de veneno pelo aparelho glandular de veneno de serpente Viperidae** do qual participou(aram) o(s) alunos **Milene Schmidt do Amaral e Luna, Fernanda Sakai**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **05.11.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 09 de novembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP
Prof^a Dr. Ariel M. Silber
Dpto. de Parasitologia
ICB - USP
asilber@usp.br

Aos meus pais, meus irmãos e meus amigos que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida. E que me deram força para continuar minha caminhada.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de farmacologia do Instituto Butantan pelo auxílio e convivência por todos esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (07-50083-9) e pela bolsa de mestrado concedida durante a realização deste trabalho (08/51522-9).

Ao laboratório de biologia celular do Instituto Butantan pelo auxílio técnico em todos os experimentos.

Ao laboratório de herpetologia do Instituto Butantan pela classificação e fornecimento das serpentes *Bothrops jaracara*.

Ao departamento de biologia celular e tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da USP que me acolheram durante essa fase da minha vida.

Aos meus colegas do laboratório de farmacologia e do laboratório de biologia celular do Instituto Butantan pela convivência.

À Dra. Norma Yamanouye e a Dra. Sylvia Mendes Carneiro pelos ensinamentos que tornaram essa tese possível.

À Adriana Batista de Oliveira Camilo e família por todos os momentos alegres que me proporcionaram dias mais felizes. Por ter me ajudado em todas as dificuldades que apareceram durante esse período da minha vida pela grande amizade.

À Fernanda Paioli Somma por ter me apoiado durante esse tempo que convivemos no Laboratório, pela companhia nas aulas de Aikidô e pela amizade.

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio, amizade, amor e carinho durante toda a minha vida.

“Apenas quando somos instruídos
pela realidade é que podemos mudá-la.”

Bertolt Brecht

RESUMO

SAKAI, F. **Glândula acessória e ducto primário de serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno**: um estudo morfológico. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A glândula acessória e o ducto primário fazem parte do aparelho glandular de veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Existem poucos estudos envolvendo a glândula acessória e o ducto primário e ainda há controvérsias se as secreções liberadas por estas regiões podem modificar o veneno formado. Este trabalho tem como objetivo fazer uma análise morfológica detalhada por microscopia de luz e eletrônica da glândula acessória e do ducto primário da serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno, verificando as modificações morfológicas no decorrer deste ciclo e um possível dimorfismo sexual. Nossos resultados mostraram que a glândula acessória de *Bothrops jararaca* apresenta um epitélio secretor simples com seis tipos celulares na região anterior: dois tipos de células secretoras, células ricas em mitocôndrias que não possuem secreção, células horizontais, células basais e células escuras e um epitélio simples com somente dois tipos celulares na região posterior: células seromucosas e células horizontais. Além disso, foi visto que as células secretoras da glândula acessória possuem uma exocitose tardia, 4 dias após a extração de veneno. O ducto primário apresenta um epitélio pseudo-estratificado com células secretoras colunares apresentando vesículas com diferentes eletrodensidades, células ricas em mitocôndrias, células escuras, células basais e células horizontais. A análise morfológica mostrou que a glândula acessória, assim como o ducto primário possui um ciclo de produção e secreção longo à semelhança da glândula principal de veneno. Além disso, mostramos pela primeira vez que a secreção da glândula acessória não participa na formação do veneno total da serpente *Bothrops jararaca*, mas que a secreção liberada pelo ducto primário pode participar do veneno total e que esta secreção seja o motivo das controvérsias existentes na literatura.

Palavras-chave: Serpentes. *Bothrops jararaca*. Glândula acessória. Ducto primário. Morfologia. Secreção.

ABSTRACT

SAKAI, F. Accessory gland and primary duct of *Bothrops jararaca* snake during the venom production cycle: morphological study. 2011. 75 p. Masters thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The accessory gland and the primary duct are components of the venom gland apparatus of the *Bothrops jararaca* snake. There are few studies about accessory gland and the duct primary and there is still controversy on whether the secretions released by these regions may modify the total venom. The aim of this study is to analyze the morphology of the accessory gland and the duct primary of *Bothrops jararaca* snake and verifying the morphological changes during their synthesis and secretion cycle by light and electron microscopy. A possible sexual dimorphism in the accessory gland and in the duct primary will be verified. Our results showed that the accessory gland of *Bothrops jararaca* presents a simple secretory epithelium with six types of cells in the anterior region: two types of secretory cells, mitochondria-rich cells without secretion, horizontal cells, dark cells and basal cells and a simple epithelium with only two types of cell in the posterior region: seromucous cells and horizontal cells. Furthermore, the secretory cells of the accessory gland have a delayed exocytose and the massive exocytose occurred four days after the extraction of venom. The primary duct presents pseudo-stratified epithelium with secretory columnar cells with different electrodensity vesicles, mitochondria-rich cells, dark cells, basal cells and horizontal cells. Morphological analysis in different steps after venom extraction showed that the accessory gland and the primary duct have a long cycle of synthesis and secretion as the main venom gland. Besides, we have shown for the first time that the secretion of the accessory gland does not participate in the formation of the whole venom of *Bothrops jararaca* snake. However, it seems that the secretion released by the primary duct participates of the total venom and this secretion could be the subject of controversy in the literature.

Keywords: Snakes. *Bothrops jararaca*. Accessory gland. Primary duct. Morphology. Secretion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Serpente <i>Bothrops jararaca</i>	16
Figura 2. Distribuição geográfica da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	17
Figura 3. Crânio e mandíbula de serpente com dentição solenoglifodonte.....	18
Figura 4. Aparelho glandular de veneno de <i>Crotalus oreganus oreganus</i>	18
Figura 5. Imagem mostrando a bainha de proteção dentária de serpente <i>Crotalus atrox</i>	19
Figura 6. Corte histológico longitudinal do aparelho glandular de veneno da serpente <i>Crotalus oreganus oreganus</i>	20
Figura 7. Figura representativa do ciclo de produção de veneno.....	21
Figura 8. Terminal nervoso da glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> ..	22
Figura 9. Localização das glândulas salivares maiores.....	26
Figura 10. Fotomicrografia da glândula parótida.....	27
Figura 11. Fotomicrografia da glândula submandibular.....	28
Figura 12. Fotomicrografia de glândula sublingual.....	29
Figura 13. Glândulas orais de répteis.....	30
Figura 14. Histoquímica da glândula acessória.....	42
Figura 15. Região anterior da glândula acessória de serpente <i>Bothrops jararaca</i>	43

Figura 16. Células da glândula acessória	44
Figura 17. Região posterior da glândula acessória.....	45
Figura 18. Ciclo síntese e secreção da glândula acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i> corada com azul de toluidina.....	47
Figura 19. Ciclo de síntese e secreção da glândula acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão.....	49
Figura 20. Epitélio pseudo-estratificado do ducto primário da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	51
Figura 21. Presença de polissacarídeos neutros em ducto primário da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	52
Figura 22. Células do ducto primário.....	53
Figura 23. Ciclo de síntese e secreção do ducto primário de serpente <i>Bothrops jararaca</i> coradas com azul de toluidina.....	55
Figura 24. Ciclo de síntese e secreção do ducto primário da serpente <i>Bothrops jararaca</i> analisado por microscopia eletrônica de transmissão.....	57
Figura 25. Cristais no interior do ducto primário de serpentes machos. A, B: Coloração de azul de toluidina.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Serpentes	15
1.2 <i>Bothrops jararaca</i>	15
1.3 Aparelho glandular de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	19
1.4 Veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	23
1.5 Glândulas salivares	25
1.5.1 Glândulas salivares de mamíferos	25
1.5.1.1 Glândula Parótida	26
1.5.1.2 Glândula Submandibular	27
1.5.1.3 Glândula Sublingual	28
1.5.2 Glândulas orais de répteis	29
1.6 Dimorfismo sexual	30
2 RELEVÂNCIA	32
3 OBJETIVO	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Animais	34
4.2 Glândula acessória e ducto primário	34
4.3 Microscopia de luz	35
4.3.1 Procedimentos para a preparação do material para microscopia de luz	35
4.3.2 Histoquímica	36
4.3.2.1 Azul de toluidina + borato de sódio	36
4.3.2.2 Alcian Blue (pH 2,5) + Hematoxilina de Harris	36
4.3.2.3 Ácido periódico + Schiff (PAS)	36
4.4 Microscopia eletrônica de transmissão	37
4.4.1 Procedimentos para a preparação do material para microscopia eletrônica de transmissão	37
4.5 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Glândula acessória	40
5.1.1 Análise morfológica por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão	40
5.1.2 Ciclo de síntese e secreção na glândula acessória	46
5.2 Ducto Primário	50
5.2.1 Análise morfológica por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão	50
5.2.2 Ciclo de síntese e secreção do ducto primário	54
5.2 Dimorfismo sexual	58
6 DISCUSSÃO	60
6.1 Glândula acessória	60
6.2 Ducto Primário	63
6.3 Dimorfismo sexual	65
7 CONCLUSÃO	67
7.1 Glândula acessória	67
7.2 Ducto Primário	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes

As serpentes pertencem à Classe Reptilia, à ordem Squamata e à Subordem Ophidia e estão organizadas em três Superfamílias: Typhlopoidea (Scolecophidia), Henophidia (Booidea) e Xenophidia (Colubroidea) (ZUG; VITT; CALDWELL, 2001). Existem aproximadamente 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, temos representantes de 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies, ou seja, cerca de 10% do total de espécies do mundo. Os tamanhos das serpentes variam: há aquelas muito pequenas como os escolecofídios (cobras-cegas) com cerca de 10 centímetros e serpentes gigantes, com até 10 metros de comprimento, como os boídeos (jibóia) e pitonídeos (pítton) (GREENE, 1997). Esses animais são caracterizados pela forma alongada do corpo, presença de escamas epidérmicas por toda a sua extensão e também pela ausência de membros locomotores, pálpebras móveis e ouvido externo (MELGAREJO, 2003). As serpentes peçonhentas, ou seja, aquelas que são providas de par de glândulas de veneno e também de dentes inoculadores de veneno, são consideradas de importância médica em todo território Nacional e encontram-se classificadas em quatro gêneros distintos. São eles, *Bothrops* Wagler 1824, *Crotalus* Linnaeus, 1758, *Lachesis* Daudin, 1803 e *Micrurus* Wagler 1824 (BRASIL, 1998; ARAÚJO; SANTALÚCIA; CABRAL, 2003).

1.2 *Bothrops jararaca*

A serpente peçonhenta brasileira *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) (Figura 1), pertence à família Viperidae, subfamília Crotalinae. Esta serpente encontra-se disseminada por toda a região sudeste, centro-sul e sul do Brasil (Figura 2). Esta espécie apresenta hábitos predominantemente noturnos e terrestres e ocupa diferentes habitats como florestas tropicais e subtropicais, campos abertos e cerrados (SAZIMA, 1988). Estas serpentes são responsáveis por um grande número de acidentes em zonas rurais, uma vez que se alimentam de pequenos roedores (AMARAL, 1977), frequentemente encontrados em sítios e fazendas (CARDOSO;

BRANDO, 1982; SAZIMA, 1992; CARDOSO et al., 1993).

É uma serpente de corpo delgado, ágil, de porte médio (até 160 cm de comprimento total) e apresenta uma cabeça em forma de lança bem destacada do corpo. Apresenta um padrão colorido bem variável, com manchas marrons escuras triangulares (semelhantes a um “V” invertido) dispostas em faixas entremeadas por áreas claras, cinza, oliváceas, amareladas ou beges distribuídas em ambos os lados do corpo. A parte ventral do corpo é clara, de um bege ligeiramente amarelado, ou ainda uniformemente acizentada. (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Figura 1. Serpente *Bothrops jararaca*.
Fonte: Fotografada por Giuseppe Puerto¹.

¹ PUERTO, G. São Paulo [199-].

Figura 2. Distribuição geográfica da serpente *Bothrops jararaca*.
Fonte: Cardoso et al., 2003

Essas serpentes são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos nas regiões onde são encontradas. O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. Em um acidente ofídico o indivíduo apresenta manifestações locais caracterizadas por dor e edema no local da picada, processo inflamatório agudo, hemorragia, podendo evoluir para infartamento ganglionar e bolhas, acompanhados ou não de necrose, abscesso, Síndrome compartimental (decorrente da compressão do feixe vâsculo-nervoso devido ao grande edema que se desenvolve no membro atingido, produzindo isquemia de extremidades), limitação dos movimentos, podendo levar à amputação. Também são observadas manifestações sistêmicas como hipotensão arterial, choque, oligúria, incoagulabilidade sanguínea, ou hemorragias intensas (gengivorragias, equimoses, hematúria) que são classificadas como leve, moderada ou grave e Insuficiência Renal Aguda (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

Uma das principais características da família Viperidae é a presença de um aparelho inoculador de veneno altamente especializado e eficiente para a captura de presas. A dentição dessas serpentes é do tipo solenoglifodonte, isto é, possuem um par de dentes maxilares modificados para a injeção de veneno e está associado a um mecanismo complexo que permite uma grande abertura bucal, facilitando assim o posicionamento do dente em relação à presa (Figura 3) (GOMES; PUORTO, 1993).

Figura 3. Crânio e mandíbula de serpente com dentição solenoglifodonte. **A:** visão lateral do crânio com mandíbula fechada. **B:** Crânio e mandíbula em posição de abertura bucal máxima. pe: presa, pt: pterigóide, q: quadrado, md: mandíbula.
Fonte: Gomes e Puerto, 1993

Quando a serpente está de boca fechada as presas ficam deitadas na horizontal no interior de um tecido conjuntivo denso irregular, denominado de bainha protetora que forma ligações fracas ao longo da superfície da presa em cerca de um terço do comprimento da presa (YOUNG et al., 2001). Esta bainha pode ser melhor visualizada quando a serpente está em posição de ataque (Figura 4); isto é, quando a serpente abre a boca, as presas protraem-se ficando em riste, arregaçando as bainhas protetoras, deixando os orifícios de saída do veneno abertos.

Figura 4. Imagem mostrando a bainha de proteção dentária da serpente *Crotalus atrox* (seta).
Fonte: Adaptada de Young et al., 2003

1.3 Aparelho glandular de veneno da serpente *Bothrops jararaca*

O aparelho glandular de veneno da serpente *Bothrops jararaca* é formado por quatro regiões distintas: a glândula principal de veneno, a glândula acessória, o ducto primário e o ducto secundário que conecta com o canal do dente inoculador de veneno (GOMES; PUORTO, 1993) (Figura 5).

Figura 5. Aparelho glandular da serpente *Bothrops jararaca*. M: músculo compressor de glândula, GP: glândula principal, DP: ducto primário, GA: glândula acessória, DS: ducto secundário.

Fonte: Fotografada por Thiago M. A. Hortencio².

A glândula principal de veneno é triangular, está envolvida por tecido conjuntivo, e é formada por epitélio secretor tubular ramificado, onde se encontram pelo menos quatro tipos celulares: células epiteliais secretoras, presentes em maior quantidade na glândula (79%), células ricas em mitocôndrias (2%), células horizontais (10%) e células escuras (9%) (MACKESSY, 1991). As células e a secreção da glândula principal de veneno são moderadamente PAS positivas, isto é, apresentam positividade para polissacarídeos neutros e também apresenta positividade para proteínas, azul de bromofenol – positivas, mostrando assim a presença de glicoproteínas. (KOCHVA; GANS, 1966). Uma característica importante das glândulas de veneno de serpentes Viperidae é a estocagem do produto de

² HORTENCIO, T. M. A. São Paulo, 2007.

secreção na luz principal (Figura 6) dessas glândulas e não em vesículas secretoras intracitoplasmáticas, como ocorre em glândulas de veneno de serpentes das famílias Elapidae e Colubridae (KOCHVA, 1978; YOSHIE; ISHIYAMA; OGAWA, 1982; GOPALAKRISHNAKONE; KOCHVA, 1990, 1993) ou ainda em glândulas exócrinas de mamíferos (JAMIESON; PALADE, 1967a,b; AMSTERDAM; OHAD; SHRAMM, 1969; MELDOLESI, 1976).

Figura 6. Corte histológico longitudinal do aparelho glandular de veneno da serpente *Crotalus oreganus oreganus*.
Fonte: Adaptada de Mackessy e Baxter, 2006.

A estrutura morfológica da glândula principal de veneno de serpentes Vipridae tem sido extensamente estudada. O processo de produção e secreção de veneno ocorre após uma diminuição do conteúdo da luz principal glandular, seja após uma picada ou por extração manual de veneno. O início do ciclo é acompanhado por mudanças morfológicas e bioquímicas do epitélio secretor da glândula de veneno. As células aumentam de tamanho passando da forma cubóide para a forma colunar e alcançam o máximo em altura em aproximadamente 4 dias após a extração de veneno (Figura 7) (BEN-SHAUL; LIFSHITZ; KOCHVA, 1971; ROTENBERG, BAMBERGER; KOCHVA, 1971; ZAGO, 1971; SCHAEFFER JR et al., 1972a,b; ORON; BDOLAH, 1973; KOCHVA, 1978; BDOLAH, 1979; CARNEIRO et al., 1991; MACKESSY, 1991; SALOMÃO, 1991).

Figura 7. Representação do ciclo de produção de veneno

Fonte: Adaptada de Ben-Shaul, Lifshitz e Kochva, 1971

Estudos realizados por Yamanouye et al. (1997) sobre mecanismos celulares envolvidos na produção e secreção de veneno, demonstram que a ativação da inervação noradrenérgica (Figura 8) está envolvida na produção e secreção de veneno, uma vez que o bloqueio da atividade simpática por reserpina bloqueou a produção e secreção de veneno em glândulas ativadas por extração de veneno. Os adrenoreceptores α e β da glândula de veneno, que participam desses processos, foram caracterizados e estes diferem dos descritos em mamíferos em sua sensibilidade a ligantes clássicos α e β , respectivamente (YAMANOUYE et al., 2000; KERCHOVE et al., 2004).

A dessensibilização prolongada dos adrenoreceptores α e β possibilitou a descoberta, *in vivo*, da importância da estimulação desses adrenoreceptores para o desencadeamento do ciclo de veneno (YAMANOUYE et al., 2000; KERCHOVE et al., 2004; ZABLITH, 2007). Estudos sobre a sinalização após a estimulação dos adrenoreceptores levaram a conclusão de que a noradrenalina é a responsável pela ativação da glândula de veneno (KERCHOVE et al., 2008; LUNA et al., 2009). A ativação desses receptores levou a ativação de fatores de transcrição tais como $\text{NK}\kappa\text{B}$ e AP-1 que regulam a síntese de proteínas, essenciais para a ativação da glândula de veneno (LUNA et al., 2009).

Figura 8. Terminal nervoso da glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca*, barra: 1 μ m. S: célula secretora.
Fonte: Yamanouye et al., 1997

A luz da glândula principal de veneno conecta-se ao ducto primário e este forma uma alça na região suborbital e passa no interior da glândula acessória (KOCHVA; GANS, 1966). A glândula acessória é uma estrutura oval coberta por um tecido conjuntivo frouxo e envolve o ducto primário comprimindo-o (KOCHVA, 1978; GANS; KOCHVA, 1965).

O ducto primário apresenta um epitélio pseudo-estratificado com células colunares que podem reagir positivamente com PAS, Alcian blue ou azul de bromofenol mostrando a presença de polissacarídeos e proteínas (KOCHVA; GANS, 1966). Porém, Mackessy (1991) observou que ducto primário é formado por um epitélio simples com dois tipos celulares: células horizontais e células secretoras colunares. Vasos sanguíneos e fibras nervosas correm paralelos ao ducto no tecido conjuntivo, sob o epitélio. As células secretoras contêm vesículas secretoras com eletrodensidade variada, retículo endoplasmático granular (REG), mitocôndrias proeminentes e o aparelho de Golgi supranuclear. As vesículas secretoras estão presentes na maioria das células sugerindo que o ducto pode secretar componentes que irão ser adicionados ao veneno total. (MACKESSY, 1991).

A glândula acessória é estruturalmente mais complexa que a glândula principal de veneno por possuir mais tipos celulares (MACKESSY, 1991). Na glândula acessória de *Crotalus viridis oreganus* foram encontrados seis tipos celulares: células secretoras mucosas com vesículas mucosas grandes, células ricas

em mitocôndrias com vesículas apicais, células ricas em mitocôndrias com vesículas secretoras eletrodensas, células ricas em mitocôndrias com numerosos cílios, células horizontais e células escuras (MACKESSY, 1991). A glândula acessória de serpentes Viperidae envolve o ducto primário promovendo um estreitamento do ducto e apresenta aspecto tubuloso com porção anterior com células secretoras mucosas e porção posterior com células secretoras serosas (KOCHVA; GANS, 1965; MACKESSY, 1991; SALOMÃO, 1991). Análise histoquímica da glândula acessória mostrou reação positiva para PAS e Alcian Blue mostrando a presença de mucopolissacarídeos neutros e ácidos respectivamente, e reação positiva para azul de bromofenol, mostrando a presença de proteínas (GENARO; CALLAHAN; LORINCZ, 1963; KOCHVA; GANS, 1965, 1966; KOCHVA, 1978).

Existem diversas controvérsias sobre a participação da secreção da glândula acessória no veneno total. Estudos realizados por Genaro, Callahan e Lorincz (1963) mostraram que a secreção da glândula acessória aumenta a toxicidade do veneno total. Kochva e Gans (1965) analisaram os perfis protéicos do veneno da glândula principal e do veneno total e mostraram que são diferentes. No entanto, Mackessy e Baxter (2006) não detectaram diferenças nos componentes protéicos dos dois venenos analisados por eletroforese ou por cromatografia líquida de alta resolução.

1.4 Veneno de serpentes do gênero *Bothrops*

O veneno botrópico é uma mistura complexa composta, contendo mais de vinte componentes diferentes, sendo que mais de 90% do peso seco do veneno é constituído por proteínas, tais como enzimas, toxinas proteicas não-enzimáticas, proteínas não-tóxicas e peptídeos. As frações não proteicas são representadas por carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (WARRELL, 1989; FURTADO et al., 1991; CARDOSO; SIQUEIRA; HUI, 2003).

São descritas várias atividades patológicas do veneno botrópico tais como a atividade proteolítica, inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica.

O veneno da serpente *Bothrops jararaca* afeta a coagulação sanguínea atuando diretamente sobre o fibrinogênio, sobre outros fatores da coagulação e sobre a agregação plaquetária. As toxinas que atuam sobre o fibrinogênio, são

serinoproteases chamadas de “tipo-trombina” (HESSELL; BLOMBACK, 1971). Este veneno também possui toxinas pró-coagulantes, classificadas como metaloproteinases, que atuam sobre os fatores II e X da coagulação (DENSON; ROUSSEAU, 1970; FURUKAWA; HAYASHI, 1977) e inibem a agregação plaquetária (KAMIGUTI et al., 1966). Além dessas toxinas, os venenos botrópicos possuem fosfolipases A_2 que podem apresentar atividade anticoagulante (ALVARADO; GUTIÉRREZ, 1988) e lectinas com atividade antitrombina (ZINGALI et al., 1993). As hemorragias locais presentes nos envenenamentos botrópicos são causadas por metaloproteinases dependentes de zinco, agrupadas na família das SVMP (*snake venom metalloproteases*) (BJARNASON; FOX, 1994) como a jararagina (PAINE et al., 1992).

Lesões musculares podem ser causadas diretamente, pela ação de miotoxinas, ou indiretamente, como consequência da isquemia resultante de distúrbios vasculares. As miotoxinas possuem estrutura de fosfolipases A_2 , podendo ou não apresentar atividade enzimática (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

A reação inflamatória local não é causada apenas por uma toxina isolada, e sim por um efeito somatório ou sinérgico de diferentes toxinas e enzimas presentes no veneno, como as toxinas hemorrágicas, toxinas que atuam diretamente sobre as células endoteliais e vênulas, componentes que induzem a liberação de histamina dos mastócitos, fosfolipases A_2 , proteases e toxinas que atuam sobre os componentes da cascata do complemento (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989). O veneno também induz o aumento de fluído e de migração celular além da participação de vários mediadores com a histamina, serotonina e produtos do ácido araquidônico (BÚRIGIO et al., 1996). Outros mediadores endógenos participam do processo inflamatório induzido por veneno botrópico. Dentre eles, podemos citar componentes do sistema complemento (FARSKY et al., 2000), óxido nítrico (GUZZO et al., 2000) e citocinas, como o $TNF-\alpha$, interleucina (IL)-1b e IL-6 (LOMONTE et al., 1993; MOURA-DA-SILVA et al., 1996; PETRICEVICH et al., 2000; RUCAVADO et al., 2002).

As toxinas de veneno de serpentes Viperidae são sintetizadas na forma precursoras inativas (pro-proteínas), entretanto, pouco se conhece como ocorrem as etapas de processamento dessas proteínas e as informações disponíveis são

decorrentes apenas de estudos comparativos entre as proteínas maduras e as preditas pelos mRNAs isolados das glândulas. Sabe-se que as modificações pós-traducionais levam à diversidade das enzimas presentes no veneno (FOX; SERRANO, 2008).

1.5 Glândulas salivares

1.5.1 Glândulas salivares de mamíferos

As glândulas salivares presentes em mamíferos são glândulas exócrinas, que produzem saliva, um fluido complexo composto por água e uma multiplicidade de substâncias, incluindo íons, proteínas e glicoproteínas. A saliva possui funções digestivas, lubrificantes e protetoras. As glândulas salivares são divididas em dois grupos, as glândulas salivares pequenas (ou menores) e as glândulas salivares maiores. As glândulas salivares menores estão dispersas pela cavidade oral, seios paranasais, faringe e trato respiratório superior. Estima-se que existam 750 grupos de glândulas menores. Além das glândulas salivares menores existem três pares de glândulas salivares maiores: as glândulas parótidas, submandibulares (submaxilares) e sublinguais (Figura 9) (WILBORN; SHACLEFORD, 1980; SOM; BRANDWEIN, 1996).

Figura 9. Ilustração mostrando a localização das glândulas salivares maiores.

Fonte: Adaptada de Vigué, 2007

1.5.1.1 Glândula parótida

É uma glândula acinosa, cuja porção secretora é constituída apenas por células serosas (Figura 10) que produzem uma secreção aquosa e com alta concentração de proteínas e sais minerais. A parótida é responsável por 25% da secreção salivar. Sua secreção é adaptativa, portanto é produzida mediante estímulos de natureza mecânica (PEDERSEN et al., 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DOUGLAS, 2006).

O transporte da secreção produzida pela glândula parótida é realizado pelo ducto parotídeo. Este ducto deixa a glândula parótida na parte ventral da margem rostral, cruza o músculo masseter e sua terminação ocorre em um pequeno orifício da cavidade bucal oposto ao segundo dente molar do maxilar (KUTTA et al., 2006).

Figura 10. Fotomicrografia da glândula parótida. Mostrando a presença de células serosas produtoras de amilase e ductos intralobulares (intercalares e estriados) Coloração pararrosanilina e azul de toluidina.
Fonte: Junqueira e Carneiro, 2004

1.5.1.2 Glândula submandibular

A glândula submandibular localiza-se abaixo da mandíbula, em contato com a pele e os músculos supra-hióideos. Esta glândula é responsável pela maior parte da produção da saliva, entre 60 – 70% (DOUGLAS, 2006).

É uma glândula túbulo-acinosa mista, cuja porção secretora é constituída por células mucosas e serosas, apresentando ácinos mistos (Figura 11). As células serosas são os principais componentes dessa glândula, sendo facilmente distintas das células mucosas pelo seu núcleo arredondado, citoplasma basófilo com grânulos apicais acidófilos. As células serosas agrupam-se formando ácinos ou então se associam às células mucosas dos mesmos, onde se colocam excentricamente, formando semi-luas (WILCOX; PINKSTAFF, 1982).

Figura 11. Fotomicrografia da glândula submandibular. Presença de células serosas (escuras) formando semi-luas e células mucosas (claras). Coloração pararosanilina e azul de toluidina.
Fonte: Junqueira e Carneiro, 2004

1.5.1.3 Glândula sublingual

É uma glândula tubuloacinososa composta formada por células serosas e mucosas, assim como a glândula submandibular. Porém, esta glândula tem o predomínio de células mucosas e as células serosas apresentam-se constituindo semiluas serosas na extremidade do túbulo mucoso (Figura 12). Esta glândula é responsável em torno de 2 a 5% da saliva secretada. (PEDERSEN et al., 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DOUGLAS, 2006).

Figura 12. Fotomicrografia de glândula sublingual mostrando predominância de células mucosas. Coloração hematoxilina e eosina.

Fonte: Junqueira e Carneiro, 2004

1.5.2 Glândulas orais de répteis

As glândulas orais de répteis, assim como de mamíferos, são compostas por unidades similares que se abrem separadamente na boca, formando uma série de pequenas glândulas (KOCHVA, 1978). As glândulas orais são: infra-labial, supra-labial, sublingual, supralingual, temporomandibular, temporal anterior, pré-maxilar (rostral), posterior, venenífera e de Duvernoy (Figura 13) (TAUB, 1966). Dentre estas, apenas duas estão envolvidas com a secreção de substâncias tóxicas, são elas: glândula de Duvernoy e glândula de veneno (ZAGO, 1971).

Figura 13. Glândulas orais de répteis. Nem todas as glândulas estão presentes em todos os répteis. A glândula de veneno de elapídeos e viperídeos é uma derivação filogenética da glândula de Duvernoy.
Fonte: Adaptada de Kochva, 1978

As glândulas de veneno das serpentes são glândulas exócrinas presentes na cavidade bucal que evoluíram a partir de glândulas salivares do lábio superior de ancestrais não venenosos, como a glândula de Duvernoy, e sua função é secretar veneno para facilitar a apreensão e digestão da presa (ZAGO, 1971; KARDONG, 1982).

1.6 Dimorfismo sexual

A glândula de veneno é uma glândula relacionada com as glândulas salivares e sabe-se que as células dos ductos da glândula salivar de mamíferos apresentam, no decorrer de seu desenvolvimento, mudanças morfológicas dependentes de andrógeno, levando a um acentuado dimorfismo sexual (CARAMIA, 1966; CHRETIEN, 1977). Além disso, JunD, membro da família Jun que juntamente com cFos compõe o complexo AP1, um fator de transcrição, que é expresso nas células do ducto da glândula submandibular de camundongo com maior imunoreatividade em fêmeas do que em machos (HIPKAE0 et al., 2004). Esse dimorfismo sexual no ducto é devido à diferença na proporção de células granulares do túbulo convoluto e células estriadas do ducto que é muito maior nos machos do que nas fêmeas

(CARAMIA, 1966; GRESIK, 1994). Estudos realizados por Luna et al. (2009) mostraram dimorfismo sexual na ativação dos fatores de transcrição da glândula de veneno, sendo a ativação de NF κ B mais rápida nas fêmeas do que nos machos e a ativação de AP-1 maior nas fêmeas. Em sincronia com a ativação dos fatores de transcrição na glândula de veneno, as modificações dos perfis protéicos da glândula de veneno após a extração de veneno, necessárias para sua ativação, ocorrem anteriormente nas fêmeas (4 dias após a extração de veneno) do que nos machos (7 dias após a extração de veneno) (LUNA et al., 2009). Vale salientar também a presença de dimorfismo sexual na composição e atividade do veneno entre venenos de indivíduos de uma mesma ninhada. O veneno de fêmeas possui uma atividade fibrinogenolítica maior do que o de machos e estes, uma atividade amidolítica maior do que a de fêmeas (MENEZES et al., 2006) e presença de diferentes peptídeos potencializadores de bradicinina entre serpentes *Bothrops jararaca* fêmeas e machos (PIMENTA et al., 2007).

2 RELEVÂNCIA

Existem muitas controvérsias sobre a participação da secreção da glândula acessória e do ducto primário no veneno total. Dessa forma, tornou-se interessante o estudo da glândula acessória e do ducto primário, visto que as secreções liberadas pela glândula acessória e pelo ducto podem modificar o veneno formado. Uma análise morfológica detalhada da glândula acessória e do ducto primário de serpentes fêmeas e machos poderá fornecer subsídios importantes para a compreensão global da produção de veneno pelo aparelho glandular de veneno e, conseqüentemente, para o estabelecimento de uma linhagem de células secretoras funcionais, isto é, que produzam veneno em cultura, em larga escala. A diversidade de toxinas encontradas no veneno e seus diferentes mecanismos de ação nos abrem uma porta para o descobrimento de novas drogas mais seletivas ou de novas ferramentas farmacológicas que serão úteis para desvendar mecanismos celulares ainda obscuros.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a glândula acessória e o ducto primário da serpente *Bothrops jararaca* e verificar seus respectivos ciclos de produção e secreção por análise morfológica através da microscopia de luz e eletrônica de transmissão e verificar um possível dimorfismo sexual.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Serpentes *Bothrops jararaca* (100-400g) adultas de ambos os sexos, classificadas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, foram tratadas segundo Breno et al. (1990), e mantidas em salas com condições ambientais controladas: fotoperíodo de 12 horas, temperatura entre 21 – 27 °C e umidade relativa de aproximadamente 65%. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – 374/2007), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – 01/2009) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (138/09).

4.2 Glândula acessória e ducto primário

As serpentes foram previamente anestesiadas com pentobarbital sódico (30 mg/kg, subcutâneo), decapitadas e em seguida as glândulas acessórias e os ductos primários foram coletados, dissecados, lavados com solução salina 0,6% e posteriormente processados para microscopia de luz ou microscopia eletrônica de transmissão. Foram utilizados glândulas acessórias e ductos primários de serpentes fêmeas que não sofreram extração de veneno (glândulas quiescentes, N=3) e que sofreram extração de veneno uma hora, 4, 7 ou 15 dias antes da coleta (glândulas estimuladas, N=3 de cada grupo) e de serpentes machos que não sofreram extração de veneno (N=3). Para a extração de veneno, as serpentes foram anestesiadas com pentobarbital sódico (20 mg/kg, subcutâneo) e as extrações manuais de veneno foram realizadas de acordo com Belluomini (1968).

4.3 Microscopia de luz

4.3.1 Procedimentos para a preparação do material para microscopia de luz

A glândula acessória e o ducto primário foram extraídos e lavados com solução salina 0,6% para retirar qualquer resíduo indesejável, e foram fixados em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e sacarose 3,5% por 24 horas em temperatura ambiente. As peças foram imediatamente fixadas com a solução fixadora para evitar a digestão dos tecidos por enzimas presentes no interior das células (autólise), por bactérias e por restos de veneno liberados durante a dissecação e para preservar as estruturas e a composição molecular. Em seguida foram lavados 3 vezes em tampão fosfato-salina (PBS) por 10 minutos cada e foram desidratados em etanol 70% por 16 horas. Após esta etapa, a glândula acessória e o ducto primário foram colocados em etanol 95% por 1 hora e esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Com o término da desidratação, os tecidos foram infiltrados com solução de infiltração de resina e ativador Leica historesin - embedding kit (Leica, Wetzlar, Alemanha) com etanol 95 % na proporção 1:1 por 16 horas, em seguida foram colocados em solução de infiltração pura por 16 horas. A desidratação é uma etapa importante, pois é quando ocorre a retirada da água que está presente no tecido permitindo a penetração da solução de infiltração. Realizada a infiltração, os tecidos foram incluídos em Historesina, em formas apropriadas contendo solução de inclusão (solução de infiltração e endurecedor) durante o período de no mínimo 2 horas. Após a polimerização do material, os blocos de tecido foram fixados em blocos de madeira e posteriormente foram feitos cortes histológicos com 5 a 6 μm de espessura, no micrótomo Microm HM 340 E (Microm, Walldorf, Alemanha). Os cortes foram coletados sobre lâminas de vidro para posterior coloração.

Realizadas as diferentes colorações, as lâminas foram vedadas com Enthelan + lamínula, secas em estufa a 50 °C durante 16 horas e posteriormente o material foi examinado e fotografado em microscópio de luz Olympus BX51 acoplado à camera digital Q color 5 Olympus (Olympus Corporation, Shindjuku, Tokyo, Japão) ou no estereomicroscópio Olympus SZX7 (Olympus Corporation, Shindjuku, Tokyo, Japan).

Foram realizadas medidas das alturas das células da região anterior e posterior da glândula acessória de serpentes que não sofreram extração de veneno (n=3) através do programa iTEM -Universal TEM Imaging Platform (Olympus Soft Imaging Solutions GMBh, Alemanha).

4.3.2 Histoquímica

4.3.2.1 Azul de toluidina + borato de sódio

Os cortes histológicos foram corados por solução de azul de toluidina 0,1% com borato de sódio 1% durante 15 segundos, lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. O Azul de toluidina, utilizado para uma coloração geral, é um corante básico que cora componentes ácidos em vários tons de azul, porém alguns componentes teciduais são capazes de transformar esse corante azul em vermelho, fenômeno conhecido como metacromasia.

4.3.2.2 Alcian Blue (pH 2,5) + Hematoxilina de Harris

As lâminas foram mergulhadas em uma solução de Alcian Blue pH 2,5 por 45 minutos em seguida, mergulhadas 2 a 3 vezes em 2 banhos de ácido acético 3%, lavadas rapidamente em água destilada, coradas por 6 minutos em Hematoxilina de Harris, lavadas rapidamente e secas a temperatura ambiente. Essa coloração permite localizar mucopolissacarídeos ácidos, que se coram de azul, e a coloração de Hematoxilina de Harris permite visualizar os núcleos celulares.

4.3.2.3 Ácido periódico + Schiff (PAS)

As lâminas foram mergulhadas em ácido periódico 1% durante 20 minutos, em seguida, lavadas rapidamente em água destilada e mergulhadas em reativo Schiff por 30 minutos. Após esta etapa as lâminas foram lavadas em 3 banhos de água sulfurosa (metabissulfito 20%, HCl 1N 20%) por 3 minutos cada, lavadas em água corrente por 30 minutos e secas a temperatura ambiente. Esta coloração cora os polissacarídeos neutros de púrpura ou magenta.

4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

4.4.1 Procedimentos para a preparação do material para microscopia eletrônica de transmissão

As glândulas acessórias, juntamente com os ductos primários foram coletados, lavados em solução salina 0,6%, colocados sobre um papel cartão em uma gota de solução fixadora (aldeído glutárico 2,5%; paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 contendo sacarose 2%) e seccionados em fragmentos de até 1 mm³, deixando-os imersos em solução fixadora à 4 °C por 16 horas. O material foi seccionado em pequenos pedaços para permitir uma melhor penetração dos reagentes. O fixador aldeído glutárico usado para a microscopia eletrônica de transmissão promove ligações cruzadas entre as proteínas, resultando assim em uma fixação mais eficaz. Após a fixação, os fragmentos foram lavados três vezes por 10 minutos cada em solução fisiológica contendo sacarose 1,78% ou no mesmo tampão utilizado para a fixação pra retirar o fixador residual dos tecidos. Estes fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3 durante 1 hora em temperatura ambiente com agitação constante. O tetróxido de ósmio protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação. Realizada a pós-fixação, os materiais foram lavados 3 vezes por 10 minutos em solução fisiológica contendo sacarose 1,78%. Esta etapa é importante para retirar o cacodilato ou fosfato do material e evitar a posterior precipitação da uranila. Após a lavagem, os fragmentos foram imersos em solução de acetato de uranila 0,5% contendo sacarose 13,3%, por 16 horas a 4 °C. O acetato de uranila prende-se aos radicais fosfatos de vários tipos moleculares e também a grupos carboxilas e grupos aminas livres. O uso do acetato de uranila é referido como “coloração” em bloco ou contrastação em bloco, pois este tratamento melhora a preservação das membranas destacando seu aspecto trilaminar. O mecanismo de combinação da uranila com as biomacromoléculas é o mesmo que ocorre com a contrastação dos cortes nas telas, porém como o tratamento é feito em bloco, o resultado de sua ação se expressa como uma fixação.

Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em uma série etanólica (70, 95 e 100%), colocados 2 vezes em óxido de propileno 100% por 15 minutos cada, adicionados em óxido de propileno com resina *Epon* - EMbed-812/DER736 (Electron Microscopy Science, USA) (1:1) sob rotação constante por 2 horas e 30 minutos e deixados em óxido de propileno e resina *Epon* (1:2) por 16 horas. Praticamente todos os meios de inclusão usados na microscopia eletrônica não são miscíveis com água, por isso, torna-se necessário retirar a água de maneira gradativa do material biológico. O óxido de propileno, assim como etanol, é um solvente da resina do tipo Epoxy. O uso do óxido de propileno com a resina permite uma melhor penetração no material. Após a etapa de desidratação, os fragmentos foram pré-embebidos em resina *Epon* pura por 2 horas à temperatura ambiente e posteriormente foram incluídos em formas apropriadas e deixados em estufa a 60 °C durante 2 a 3 dias para a polimerização da resina. Cortes histológicos semi-finos de aproximadamente 1 µm foram obtidos em ultramicrotomo Sorval MT 6000, (Du Pont Company, Wilmington, Delaware, USA), corados com Azul de toluidina + borato de sódio, por aproximadamente 15 segundos, lavados em água destilada e secos em placa aquecida. Estes cortes foram examinados e fotografados ao microscópio de luz Olympus BX51 acoplado à câmera digital Q color 5 Olympus (Olympus Corporation, Shindjuku, Tokyo, Japan). Dos blocos com material selecionado foram realizados cortes ultrafinos de 50-70 nm obtidos em ultramicrotomo Sorval MT 6000 (Du Pont Company, Wilmington, Delaware, USA). Estes foram coletados em telinhas de cobre e contrastados com acetato de uranila aquosa 2% por 15 minutos e com citrato de chumbo em uma câmara livre de CO₂ por 3 minutos. O contraste no microscópio eletrônico depende do número atômico dos átomos na amostra, quanto mais alto o número atômico, mais elétrons são espalhados e maior é o contraste. Os tecidos biológicos são compostos de átomos de número atômico muito baixo (principalmente carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio). Para torná-los visíveis são geralmente impregnados (antes ou depois do corte) com sais de metais pesados, tais como o urânio e o chumbo. Após a contrastação, os cortes foram examinados ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 E (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) em voltagem de aceleração de 100 kV. As imagens foram adquiridas pela câmera CCD MegaView III através do programa iTEM - Universal TEM Imaging Platform (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Alemanha).

4.5 Análise estatística

O peso, o comprimento de cabeça, o comprimento total e o comprimento da glândula acessória foram expressos como Média $\pm$ EPM. A diferença estatística entre duas médias foram analisadas pelo teste 't' de Student e o nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

O peso médio ($411,43 \pm 53,87$ g), o comprimento de cabeça ($4,57 \pm 0,17$ cm) e comprimento total ($122,07 \pm 1,77$ cm) das serpentes fêmeas utilizadas ($n=7$) foram significativamente maiores do que os dos machos ($108,00 \pm 9,50$ g, $3,25 \pm 0,15$ cm e $93,13 \pm 2,09$ cm, respectivamente, $n=4$). A glândula acessória das fêmeas também são maiores ($3,33 \pm 0,17$ mm, $n=3$) quando comparada à glândula acessória dos machos ($2,66 \pm 0,16$ mm, $n=3$).

Por outro lado, o exame histológico das glândulas acessórias e dos ductos primários de fêmeas e machos não acusou diferenças morfológicas significativas entre os dois gêneros. Portanto, o enfoque do projeto foi redirecionado apenas para as serpentes fêmeas, visto que há maior facilidade de obtenção de serpentes fêmeas.

5.1 Glândula acessória

5.1.1 *Análise morfológica por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão*

A glândula acessória é formada por túbulos secretores alongados no sentido antero-posterior (Figura 14), que envolve a continuação do ducto primário. Esta glândula apresenta duas regiões, anterior e posterior (Figura 14 A, B), que se coram por PAS e Alcian Blue, mais intensamente na região anterior (Figura 14). Na região posterior a reatividade para PAS e Alcian blue ocorre principalmente na região apical das células (Figura 14 E, F).

Na região anterior da glândula o epitélio secretor é formado principalmente por células secretoras mucosas delimitando luz tubular estreita (Figura 14 C, D). Nas serpentes que não sofreram extração de veneno, a altura média das células secretoras $27,83 \pm 2,15$ μ m. O epitélio é simples, apresentando, principalmente, dois tipos de células secretoras (Figura 15), sendo uma semelhante às células caliciformes, com grande quantidade de vesículas com baixa eletrodensidade que podem estar coalescidas (Figura 15 C) e apresentam metacromasia para o azul de toluidina (Figura 15 B) e outra, com vesículas menores com moderada eletrodensidade ou com grânulos mistos, situadas na região apical (Figura 15 C). No

entanto, em glândulas acessórias coletadas 4 dias após a extração de veneno, os diferentes tipos de células secretoras são mais facilmente visualizados e as células com vesículas apicais apresentam vesículas distribuídas pelo citoplasma (Figura 15 D). Nessa condição, o tecido conjuntivo intercelular está menos comprimido evidenciando, dessa forma, a presença de terminais nervosos (Figura 16 B).

Também foram observadas células com vesículas contendo grânulos de tamanhos e eletrodensidades com diferentes na matrix de baixa eletrodensidade (Figura 16 A). Outros tipos celulares também foram observados na região anterior tais como células ricas em mitocôndrias que não apresentam secreção (Figura 16 C), células escuras com citoplasma e núcleo com alta eletrodensidade e prolongamentos citoplasmáticos longos (Figura 16 D), células horizontais com núcleos alongados na base das células secretoras (Figura 16 E) e células basais aproximadamente cúbicas com núcleo arredondado, citoplasma com baixa eletrodensidade (Figura 16 F).

Na região posterior o epitélio tubular é formado principalmente por células seromucosas, achatadas ou cúbicas, com altura de $7,64 \pm 1,6 \mu\text{m}$ delimitando uma luz tubular ampla (17 A, B). Essas células apresentam núcleo alongado e vesículas secretoras apicais (Figura 17 C). Também foram observadas células horizontais com núcleos alongados na base das células secretoras (Figura 17 C).

Na Figura 17 A podemos visualizar a região de transição entre o epitélio colunar anterior e o epitélio cubóide da região posterior.

Figura 14. Histoquímica da glândula acessória. A, C e E: Alcian blue e Hematoxila de Harris. B, D e F: PAS. **A e B:** Nota-se menor reatividade de coloração na região posterior, **C e D:** Região anterior com reatividade intensa nas células mucosas, **E e F:** Região posterior, setas apresenta, reatividade para os corantes principalmente na região apical das células. Barras: A e B: 1 mm, C a F: 20 μ m. GA: glândula acessória, *: ducto primário no interior da glândula acessória, s: secreção, L: luz

Figura 15. Região anterior da glândula acessória de serpente *Bothrops jararaca*. **A:** Epitélio simples e luz estreita; **B:** Secreção com metacromasia (*), barras: 20 μm ; colorações de azul de toluidina. **C:** células secretoras com vesículas com diferentes densidades eletrônicas de serpentes que não sofreram extração de veneno, barra: 5 μm , **D:** células secretoras com vesículas com diferentes densidades eletrônicas de serpentes que sofreram extração de veneno 4 dias antes de serem decapitadas, barra: 3,5 μm . N: núcleo, L: luz, setas: células secretoras com eletrodensidade moderada

Figura 16. Células da glândula acessória. **A:** Célula rica em mitocôndrias sem grânulos secretores ao lado de células secretoras (CS), **B:** Célula escura (CE) na região basal do epitélio com prolongamentos citoplasmáticos longos (seta), **C:** Célula horizontal (CH) com núcleo alongado na região basal do epitélio secretor, **D:** Célula basal (CB) com citoplasma com menor eletrodensidade localizada próxima a membrana basal do epitélio secretor, **E:** Célula secretora com grânulos de alta eletrodensidade (setas) dentro das vesículas secretoras, **F:** Terminação nervosa (Tn) no tecido conjuntivo intertubular. M: mitocôndrias, N: núcleo

Figura 17. Região posterior da glândula acessória. **A:** Epitélio de transição, mostrando células mucosas (Cm) e células seromucosas (Cs); **B:** Epitélio com células secretoras cúbicas (seta) delimitando luz ampla, barras: 20 μ m; colorações de azul de toluidina. **C:** Célula secretora achatada com núcleo alongado e vesículas apicais e célula horizontal (CH) na região basal do epitélio, N: núcleo, *: vesículas secretoras, barra: 2 μ m

5.1.2 Ciclo de síntese e secreção na glândula acessória

A análise morfológica através da microscopia de luz mostrou que a glândula acessória de serpentes fêmeas que não sofreram extração de veneno, isto é, glândula em estado quiescente, possui em seu epitélio glandular células secretoras com um grande número de vesículas secretoras mucosas, coradas metacromaticamente por azul de toluidina. A luz tubular é muito estreita. (Figura 26 A). Na 1ª hora após a extração de veneno (Figura 26 B), o epitélio secretor ainda é alto, o conjunto de vesículas secretoras mucosas parece diminuído e encontra-se deslocado para mais próximo da região apical das células secretoras. A luz apresenta-se vazia. No 4º dia após a extração do veneno (Figura 26 C e D), os túbulos secretores da região anterior apresentam luz dilatada, repleta de secreção mucosa; o epitélio secretor apresenta células achatadas e algumas células colunares que não exibem vesículas secretoras mucosas. No 7º dia após a extração do veneno (Figura 26 E), o epitélio secretor apresenta novamente células secretoras mucosas colunares ao lado de células secretoras com vesículas apicais que se coram intensamente com azul de toluidina e a luz está novamente vazia. No 15º dia após a extração de veneno (Figura 26 F) o epitélio tubular secretor é muito semelhante ao das glândulas em estado quiescente e algumas células com vesículas apicais mais intensamente coradas também são observadas.

Não foi possível detectar variações morfológicas das células da região posterior da glândula acessória com relação ao tempo de extração do veneno, devido à baixa altura do epitélio.

Figura 18. Ciclo síntese e secreção da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* corada com azul de toluidina. **A:** Serpente que não sofreu extração de veneno, **B:** Serpente após 1 hora da extração de veneno, **C, D:** Serpente após 4 dias da extração de veneno, **E:** Serpente após 7 dias da extração de veneno, **F:** Serpente após 15 dias da extração de veneno. S: secreção, L: luz, setas: vesículas secretoras apicais com maior eletrodensidade. Barra: 20 μm

Essas mudanças morfológicas da glândula acessória no decorrer do ciclo de produção e secreção, também foram observadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Em glândulas acessórias no estado quiescente (Figura 27 A), as células secretoras, tipo caliciforme, estão repletas de vesículas secretoras mucosas, de baixa eletrodensidade, seu núcleo é ovalado ou achatado e o seu citoplasma fica comprimido entre as vesículas. Ao lado das células caliciformes há células com vesículas apicais com maior eletrodensidade em forma de leque, seu núcleo é achatado e encontra-se na região basal. Após 1 hora da extração de veneno (Figura 27 B), o epitélio secretor da região anterior da glândula é semelhante ao da glândula quiescente. No entanto, visualiza-se melhor os núcleos basais, as células horizontais (Figura 27 B) e as células que antes apresentavam vesículas apicais e que agora mostram-se distribuídas por todo o citoplasma. Nas células caliciformes nota-se concentração maior de mitocôndrias na região citoplasmática basal e lateral. No 4º dia após a extração do veneno (Figura 27 C, D), as células mucosas apresentam a maioria das vesículas coalescidas e em exocitose maciça, com rompimento da membrana apical, semelhante à secreção apócrina (Figura 27 D). A luz tubular apresenta uma massa de baixa eletrodensidade com alguns grânulos mais densos dispersos. Nas células com vesículas com maior eletrodensidade, a exocitose das vesículas ocorre como uma secreção merócina (Figura 27 D). No 7º dia após a extração de veneno (Figura 27 E), as células secretoras apresentam um número maior de vesículas secretoras e no 15º dia após a extração de veneno (Figura 27 F), a morfologia das células secretoras é muito semelhante às da glândula acessória de serpentes que não sofreram extração de veneno. Elas estão repletas de vesículas com baixa eletrodensidade e pode-se visualizar células cujo citoplasma encontra-se espremido entre as células caliciformes, que se abrem em leque na região mais apical apresentando vesículas com maior eletrodensidade. Algumas dessas células apresentam vesículas secretoras com secreção mista (Figura 19 F).

Figura 19. Ciclo de síntese e secreção da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* analisado por microscopia eletrônica de transmissão. **A:** Serpente que não sofreu extração de veneno, **B:** Serpente após 1 hora da extração de veneno, **C:** Serpente após 4 dias da extração de veneno, **D:** Serpente após 4 dias da extração de veneno evidenciando a exocitose diferenciada na célula secretora. **E:** Serpente após 7 dias da extração de veneno, **F:** Serpente após 15 dias da extração de veneno. Cc: célula caliciforme, *: vesículas apicais menores, s: secreção, L: luz, N: núcleo, setas: secreção merócrina, cabeça de seta: secreção apócrina, sm: secreção mista.

5.2 Ducto primário

5.2.1 *Análise morfológica por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão*

O ducto primário possui um epitélio pseudoestratificado, com células secretoras colunares (Figura 20). Devido à dificuldade de observação dos limites celulares, a medição das alturas das células colunares do ducto primário não pode ser realizada de maneira confiável. O ducto primário ao contrário da glândula acessória mostrou reação negativa para Alcian Blue (Figura 16 B, 22 A) e uma fraca positividade para PAS (Figura 21 B), indicando apenas a presença de polissacarídeos neutros. Ao microscópio eletrônico de transmissão observam-se vesículas secretoras com diferentes eletrodensidades nas células secretoras (Figura 22 A). Assim como na glândula acessória, também foram observadas células basais com núcleo arredondado (Figura 22 A), células ricas em mitocôndrias (Figura 22 B), células escuras com prolongamentos citoplasmáticos (Figura 20 B, 22 C). Terminações nervosas ocorrem no tecido conjuntivo da porção basal do ducto primário (Figura 22 B).

Figura 20. Epitélio pseudo-estratificado do ducto primário da serpente *Bothrops jararaca*. **A**: corado com azul de toluidina, barra: 20 μm . **B**: Imagem do epitélio obtido por da microscopia eletrônica de transmissão, barra: 9 μm . N: núcleos, Ve: vesículas secretoras das células colunares, CE: célula escura

Figura 21. Presença de polissacarídeos neutros em ducto primário da serpente *Bothrops jararaca*. **A**: Coloração negativa para de Alcian Blue, contracorado com Hematoxila de Harris. **B**: Coloração de PAS, mostrando pouca reatividade (seta). Barras: 20 μ m. L: luz

Figura 22. Células do ducto primário. **A:** Células secretoras com vesículas com diferentes eletrodensidades (Cs), células basais (CB), barra: 5 μm . **B:** Célula rica em mitocôndrias, barra: 1 μm . **C:** Célula escura (CE) com prolongamentos citoplasmáticos (seta), barra: 4 μm . N: núcleo, Tc: tecido conjuntivo, M: mitocôndrias, *: terminação nervosa, s: secreção.

5.2.2 Ciclo de síntese e secreção do ducto primário

Ao microscópio de luz o ducto primário de serpentes que não sofreram extração de veneno possui células colunares com um grande número de vesículas com diferentes densidades eletrônicas e uma luz cheia de secreção (Figura 23 A). Após 1 hora da extração de veneno, o número de diferentes tipos de vesículas diminui e estas ficam restritas na região apical da célula. Na luz do ducto a quantidade de secreção diminui (Figura 23 B). Quatro dias após a extração de veneno, as células colunares apresentam vesículas secretoras com diferentes densidades eletrônicas e pouca secreção foi visualizada no interior da luz (Figura 23 C, D). Em serpentes que sofreram extração de veneno 7 dias (Figura 23 E, F) e 15 dias (Figura 23 G, H) antes de serem decapitadas, a presença de vesículas secretoras é variável dependendo da região analisada. Há regiões do ducto que apresentam grande número de vesículas secretoras e outras com poucas vesículas. A luz do ducto primário, após 7 dias da extração de veneno, apresenta pouca secreção em seu interior (Figura 23 E, F) e 15 dias após a extração de veneno a quantidade de secreção na luz aumenta, no entanto ainda não está completamente cheio como no ducto de serpentes que não sofreram extração de veneno (Figura 23 G, H).

Figura 23. Ciclo de síntese e secreção do ducto primário de serpente *Bothrops jararaca* coradas com azul de toluidina. **A:** Serpente que não sofreu extração de veneno, **B:** Serpente após 1 hora da extração de veneno, **C** e **D:** Serpente após 4 dias da extração de veneno, **E** e **F:** Serpente após 7 dias da extração de veneno, **G** e **H:** Serpente após 15 dias da extração de veneno. s: secreção, barras: 20 μm

Ao microscópio eletrônico de transmissão as células secretoras do ducto primário de serpentes que não sofreram extração de veneno possuem um grande número de vesículas secretoras com variadas eletrodensidades. A luz do ducto repleta de secreção (Figura 24 A). Uma hora após a extração de veneno, a quantidade de vesículas secretoras diminui, e estas passam a se localizar na região apical da célula. O retículo endoplasmático rugoso está estreito na região lateral da célula e moderadamente dilatado na região central (Figura 24 B). O ducto primário de serpentes que sofreram extração de veneno 4 dias antes de serem decapitadas apresentou células com vesículas secretoras em vários estágios de amadurecimento. Também notamos a presença de algumas células mucosas (Figura 24 C). Após 7 dias da extração de veneno, foi observada uma pequena quantidade de vesículas secretoras (Figura 24 D) e 15 dias após a extração de veneno, as vesículas secretoras do ducto primário apresentaram-se muito semelhante ao ducto de serpentes que sofreram extração de veneno 7 dias antes de serem decapitadas e retículo endoplasmático rugoso ainda semelhante ao ducto de serpentes que sofreram extração de veneno 1 hora antes (Figura 24 E).

Figura 24. Ciclo de síntese e secreção do ducto primário da serpente *Bothrops jararaca* analisado por microscopia eletrônica de transmissão. **A:** Serpente que não sofreu extração de veneno, **B:** Serpente após 1 hora da extração de veneno, **C:** Serpente após 4 dias da extração de veneno, **D:** Serpente após 7 dias da extração de veneno, **E:** Serpente após 15 dias da extração de veneno. S: secreção, N; núcleo, *: Retículo endoplasmático estreito, seta: Retículo endoplasmático moderadamente dilatado, barras: 5 μ m.

5.3 Dimorfismo sexual

As análises morfológicas da glândula acessória e ducto primário de serpentes *Bothrops jararaca* não mostraram diferenças entre serpentes machos e fêmeas. Porém, foram observados alguns cristais, tanto na microscopia de luz quanto na microscopia eletrônica de transmissão, no interior da luz do ducto primário apenas em serpentes machos que não sofreram extração de veneno (Figura 25). Alguns cristais estão bem próximos da região apical das células do epitélio (Figura 25 B, C) e também foram observados cristais segregados em alça do ducto (Figura 25 A).

Figura 25. Cristais no interior do ducto primário de serpentes machos. A, B: Coloração de azul de toluidina. C, D: Imagem dos cristais no interior do ducto primário de serpentes machos visualizado ao microscópio eletrônico de transmissão. c: cristal, REG: retículo endoplasmático rugoso. Figura representativa de N=3

6 DISCUSSÃO

6.1 Glândula acessória

A análise morfológica da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* mostrou a presença de seis tipos de células na região anterior: dois tipos de células secretoras, células ricas em mitocôndrias que não possuem secreção, células horizontais, células basais e células escuras e dois tipos de células na região posterior: células seromucosas e células horizontais. Analisando o ciclo de produção e secreção, mostramos pela primeira vez, que a secreção da glândula acessória do aparelho glandular de veneno de serpentes Viperidae também possui um ciclo de síntese e secreção longo, assim como a glândula principal de veneno. Além disso, a exocitose tardia, observada nas células secretoras mucosas, mostra que a secreção da glândula acessória não contribui para o veneno total.

As células caliciformes da glândula acessória de serpente *Bothrops jararaca* são semelhantes às encontradas em epitélio de mamíferos. Estas células secretam mucinas que recobrem a superfície do epitélio auxiliando na formação de muco que forma uma barreira protetora sobre o epitélio (ROGERS, 2003; SPECIAN; OLIVER, 1991).

A presença de polissacarídeos ácidos e neutros nas células mucosas e seromucosas da glândula acessória mostram as semelhanças com as glândulas salivares maiores de mamíferos, isto é, glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais em que as células mucosas e seromucosas presentes nestes tecidos possuem polissacarídeos ácidos sulfatados e não sulfatados e polissacarídeos neutros (PINKSTAFF, 1993).

A morfologia da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* é muito semelhante a das demais serpentes Viperidae (GENNARO JR; CALLAHAN; LORINCZ, 1963; KOCHVA; GANS, 1965, 1966; RHOADES et al., 1967; MACKESSY, 1991). Alguns tipos de células da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* diferem das encontradas por Mackessy (1991) em *Crotalus viridis oreganus*: células seromucosas na região posterior, células basais, células ricas em mitocôndria sem vesículas secretoras e somente dois tipos de células secretoras na

região anterior. Mackessy (1991) observou células ricas em mitocôndrias com vesículas apicais e células ricas em mitocôndrias com grânulos de secreção com moderada densidade eletrônica. No entanto, o acúmulo de grande quantidade de secreção no interior das células mucosas da glândula acessória de serpentes *Bothrops jararaca* que não sofreram extração de veneno, não permite visualizar detalhes das organelas celulares. As células estão distendidas devido à grande quantidade de secreção que desloca as organelas para a região basolateral, dando a impressão de que o número de mitocôndrias é mais elevado. A análise morfológica das células em diferentes estágios de secreção nos permitiu uma melhor visualização destas. Somente dois tipos de células secretoras foram observados na região anterior: células caliciformes mucosas, semelhantes às encontradas na glândula salivar de mamíferos, e células secretoras com vesículas secretoras com diferentes tamanhos e eletrodensidades. A dificuldade em analisar essas células também foi referida por Gennaro Jr., Callahan e Lorincz (1963).

O ciclo de produção e secreção de veneno na glândula principal de veneno dura cerca de 30-50 dias. As células secretoras atingem o máximo em altura 4 dias após extração de veneno (KOCHVA, 1960, 1987; BEN SHAUL; LIFSHITZ; KOCHVA, 1971; ROTENBERG; BAMBERGER; KOCHVA, 1971; DE LUCCA, 1974; CARNEIRO et al., 1991; MACKESSY, 1991). Como na glândula principal de veneno, a região anterior da glândula acessória também tem um longo ciclo de síntese e secreção que dura cerca de 15 dias. Foi possível observar que a exocitose maciça das secreções das células da glândula acessória ocorre 4 dias após a extração de veneno e as células estão novamente cheias de vesículas secretoras em torno de 15 dias após a extração do veneno. Em nosso estudo, não observamos mudanças no epitélio secretor da região posterior da glândula acessória após a extração do veneno. A importância da secreção da glândula acessória na toxicidade do veneno é controversa. Gennaro Jr., Callahan e Lorincz (1963) relataram que a secreção da glândula acessória é uma secreção não tóxica, porém quando adicionada ao veneno da glândula principal aumenta a toxicidade deste. No entanto, Gennaro et al. (2007) também mostrou que a secreção da glândula acessória de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* promoveu um colapso total do pulmão do sapo. Este efeito foi correlacionado com a possível adaptação à alimentação preferencial por anfíbios. Além disso, Kochva e Gans (1965) mostraram que o padrão eletroforético do veneno

da glândula principal difere do veneno total. Por outro lado, Mackessy e Baxter (2006) não encontraram nenhuma diferença entre o veneno coletado a partir de aparelho glandular de veneno intacto ou apenas da glândula principal de veneno quando analisaram os perfis protéicos das duas amostras ou a composição destas secreções por cromatografia líquida de alta pressão por fase reversa. Estes dados estão de acordo com nosso estudo morfológico focando o decurso temporal da síntese e secreção da glândula acessória. A exocitose da secreção da glândula acessória inicia pelo menos uma hora após a extração de veneno, portanto, a secreção da glândula acessória não contribui para o veneno total.

É sabido que a secreção de muco das células caliciformes é amplamente distribuída no trato gastrointestinal de mamíferos, no aparelho reprodutivo e nas vias aéreas. O muco tem a função de hidratar, lubrificar e defender contra infecções (ROGERS, 1994, 2003; LAGOW et al., 1999; KIM; HO, 2010). A principal função do muco salivar é revestir, hidratar e lubrificar os tecidos moles da boca, mantendo a integridade da mucosa oral (TABAK, 1995). Nossos estudos mostraram quem em serpente *Bothrops jararaca*, antes e após a extração do veneno, a luz dos túbulos da glândula acessória está vazia e torna-se repleta de secreção apenas 4 dias após a extração de veneno. Portanto, a secreção de muco das glândulas acessórias após a extração do veneno provavelmente tem a função de hidratar, lubrificar e proteger as regiões anteriores do aparelho inoculador de veneno, uma vez que não contribuem para o veneno total.

A maioria dos venenos produzidos pela glândula de veneno principal é armazenada dentro da luz da glândula. O sistema de entrega de veneno em serpentes Viperidae é regulado pela contração do músculo compressor de glândula que cobre a glândula principal de veneno e por mudanças de posicionamento da bainha da presa (YOUNG et al., 2001; YOUNG; KARDONG, 2007). Portanto, a expulsão do veneno é orquestrada por forças mecânicas. A passagem do veneno da luz da glândula principal de veneno para a presa pode causar estresse mecânico que pode estimular as inervações presentes na glândula acessória promovendo a exocitose da secreção. Esta hipótese é apoiada no fato de que estudos anteriores sobre a glândula principal de veneno, mostram que a extração de veneno pode estimular a inervação noradrenérgica (KERCHOVE et al., 2004). Diversos tipos de neurotransmissores têm um papel importante na regulação da secreção das

glândulas salivares (QUISSELL, 2000). Não há dados sobre a inervação da glândula acessória na literatura, porém em geral, as glândulas exócrinas estão sob regulação neural e os nossos estudos mostraram a presença de terminal nervoso próximo do epitélio secretor da glândula acessória. Sendo assim, a secreção da glândula acessória pode ser regulada pela estimulação da inervação presente.

6.2 Ducto primário

A análise morfológica do ducto primário mostrou a presença de um epitélio pseudo-estratificado bem pregueado com células secretoras colunares contendo polissacarídeos neutros na região apical, células horizontais, células ricas em mitocôndrias, células basais e células escuras. Além disso, foram observados terminais nervosos, indicando também a possibilidade da eliminação da secreção ser regida por estimulação desta inervação. Analisando o ducto primário em diferentes tempos após a extração de veneno, mostramos, também pela primeira vez, que o ciclo de síntese e secreção do ducto primário é longo, porém mais longo do que o da glândula acessória. Quinze dias após a extração de veneno, a morfologia do ducto primário ainda não é semelhante ao ducto de serpente que não sofreu extração de veneno. Esta secreção parece fazer parte do veneno total da serpente *Bothrops jararaca*, uma vez que o conteúdo da luz diminui logo após a extração de veneno.

O ducto primário, assim como a glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca*, apresenta morfologia muito semelhante às demais serpentes Viperidae, apresentando um epitélio pseudo-estratificado (GENNARO JR.; CALLAHAN; LORINCZ, 1963; KOCHVA; GANS, 1965, 1966). No entanto, Mackessy (1991) mostrou que em ducto primário de serpente *Crotalus viridis oreganus* o epitélio é simples.

O ducto excretor da parótida de ratos apresenta um epitélio pseudo-estratificado com células cubóides basais, células claras tipo I e II, células escuras, três tipos de células colunares (SATO; MIYOSHI, 1988). Além disso, Perra et al. (1988), mostrou que o ducto excretor de glândulas submandibulares humanas apresentam positividade para PAS. Esses dados da literatura mostram que há uma

semelhança morfológica do ducto excretor de mamíferos com o ducto primário de serpente *Bothrops jararaca*.

No decorrer do ciclo de síntese e secreção, as células secretoras apresentaram variações na quantidade de vesículas secretoras e também houve variação na quantidade de secreção no interior da luz dos túbulos. Além disso, observamos células secretoras com retículo endoplasmático rugoso estreito ou moderadamente dilatado, com o aparelho de Golgi ativo e com vesículas secretoras em diferentes estágios de amadurecimento, em serpentes que sofreram extração de veneno 7 e 15 dias antes de serem decapitadas, sugerindo que a produção da secreção protéica, neste momento do ciclo de síntese da secreção, ainda não atingiu seu pico de produção. Após 15 dias da extração de veneno, a luz do ducto primário ainda não está completamente cheia como no ducto de serpente que não sofreu extração de veneno, mostrando que o ducto primário tem um ciclo de síntese e secreção mais longo do que a glândula acessória, e que esta secreção é armazenada na luz do ducto primário até sua eliminação após uma picada ou extração manual.

Ainda não foi relatado o papel da secreção do ducto no veneno, mas em ductos de parótida foi verificado que a secreção tem um importante papel antimicrobial (KUTTA et al., 2006). Além disso, a defensina secretada pelas células dos ductos estriados, intercalares e secretores das glândulas salivares menores também possui função antimicrobicida (SAHASRABUDHE et al., 2000).

Como já dito anteriormente, existem muitas controvérsias na literatura sobre a participação da secreção da glândula acessória no veneno total (GENNARO JR.; CALLAHAN; LORINCZ, 1963; KOCHVA; GANS, 1965; MACKESSY; BAXTER, 2006). Porém, estes trabalhos não relatam se o ducto primário foi excluído e isto poderia ser um dos motivos para estas controvérsias. Além disso, foi visto também, que o ducto primário passa no interior da glândula acessória (KOCHVA, 1978, GANS; KOCHVA, 1965) e a secreção liberada por essa região do ducto primário poderia ser o motivo dos diferentes resultados obtidos por esses autores.

6.3 Dimorfismo sexual

Mostramos que o peso médio, o comprimento de cabeça e comprimento total das serpentes fêmeas foram significativamente maiores do que os dos machos confirmando os dados da literatura que mostram que as serpentes fêmeas do gênero *Bothrops* são significativamente maiores que os machos (BRENO et al., 1990; LELOUP, 1975; PEZZANO, 1986).

Sabe-se que as células do ducto da glândula salivar de mamíferos apresentam, no decorrer de seu desenvolvimento, mudanças morfológicas dependentes de andrógeno, levando a um acentuado dimorfismo sexual (CARAMIA, 1966; CHRETIEN, 1977). Além disso, JunD, membro da família Jun que juntamente com cFos compõe o complexo AP1 é mais expresso nas células do ducto da glândula submandibular de camundongo de fêmeas do que em machos (HIPKAO et al., 2004). Esse dimorfismo sexual no ducto é devido à diferente proporção de células granulares do túbulo convoluto e células estriadas do ducto que é muito maior nos machos do que nas fêmeas (CARAMIA, 1966; GRESIK, 1994).

Em nosso trabalho não verificamos diferenças morfológicas entre a glândula acessória e o ducto primário de serpentes fêmeas e machos. No entanto, Menezes et al. (2006) mostraram dimorfismo sexual na composição e atividade do veneno de indivíduos de uma mesma ninhada da serpente *Bothrops jararaca*. O veneno de fêmeas possui uma atividade fibrinogenolítica maior do que nos machos e estes, uma atividade amidolítica maior do que nas fêmeas. Além disso, Pimenta et al. (2007) mostraram a presença de diferentes peptídeos potencializadores de bradicinina apenas nos venenos de fêmeas.

O dimorfismo sexual na ativação da glândula principal de veneno de serpentes *Bothrops jararaca* também foi visto por Luna et al. (2009) que mostraram diferenças na ativação dos fatores de transcrição da glândula de veneno, sendo que a ativação de NF κ B é mais rápida nas fêmeas do que nos machos e a ativação de AP-1 é maior nas fêmeas.

Durante a análise morfológica da glândula acessória e do ducto primário de serpente *Bothrops jararaca*, a única diferença notada entre machos e fêmeas foi a presença de cristais no interior da luz do ducto primário apenas em serpentes

machos que não sofreram extração de veneno. A proximidade dos cristais da região apical da célula sugere uma possível interação com a célula secretora que levaria a formação de alças na tentativa de isolar estes cristais (Figura 33). A presença destes cristais, vista por microscopia eletrônica, reforça a impossibilidade destes cristais serem artefatos formados pelo processamento dos materiais, porém, estes cristais podem indicar uma patologia, como a sialolitíase que ocorre em ductos parotídeos de mamíferos (KUTTA et al., 2006), porém isso não explica a existência desses cristais apenas em machos. Vale ressaltar que as serpentes machos e fêmeas utilizadas são da mesma procedência.

7 CONCLUSÃO

7.1 Glândula acessória

Dados morfológicos mostraram que a glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* possui um epitélio simples com a presença de seis tipos de células na região anterior: dois tipos de células secretoras, células ricas em mitocôndrias que não possuem secreção, células horizontais, células basais e células escuras e um epitélio simples com dois tipos de células na região posterior: células seromucosas e células horizontais.

Nossos dados mostraram pela primeira vez que a glândula acessória possui um longo ciclo de síntese e secreção assim como a glândula principal de veneno. O decurso temporal da exocitose observado nas células secretoras sugere que a secreção da glândula acessória não participa do veneno total.

7.2 Ducto primário

O ducto primário da serpente *Bothrops jararaca* possui um epitélio pseudo-estratificado com células secretoras colunares com presença de polissacarídeos neutros, células horizontais, células ricas em mitocôndrias na região basal, células basais e células escuras.

Mostramos também pela primeira vez que ducto primário possui um longo ciclo de síntese e secreção assim como a glândula principal de veneno. Porém, observamos que ao contrário da glândula acessória, o ducto primário apresentou uma diminuição do conteúdo da luz após a extração de veneno, sendo assim, nossos dados sugerem que a secreção liberada pelas células secretoras do ducto primário participa da formação do veneno total.

REFERÊNCIAS³

- ALVARADO, J.; GUTIERREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 36, n. 2B, p. 563–565, 1988.
- AMARAL, A. **Serpentes do Brasil**: iconografia colorida. Brasília, DF: Melhoramentos, 1977. 220 p.
- AMSTERDAM, A.; OHAD, I.; SHRAMM, M. M. Dynamic changes in the ultrastructure of acinar of the rat parotid gland during the secretory cycle. **J. Cell Biol.**, v. 41, p. 753-773, 1969.
- ALBERTS, B. et al. Visualização das células. In:_____. **Biologia molecular da célula**. Artmed. 4. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2004. p. 549–564.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAS JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil**: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, FAPESP, 2003. p. 6-12.
- BDOLAH, A. The venom gland of snakes and venom secretion. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 52. p. 41-57, 1979.
- BELLUOMINI, H. E. Extraction and quantities of venom obtained from some Brazilian snakes. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, V.; DEULOFEU, V. **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1968. v. 1, p. 97-117.
- BEN-SHAUL, Y.; LIFSHITZ, S. H.; KOCHVA, E. Ultrastructural aspects of secretion in the venom glands of *Vipera palestinae*. In: DE VRIES, A.; KOCHVA, E. (Ed.). **Toxins of animal and plants origin**. London: Gordon and Breach, 1971. p. 87–105.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325–372, 1994.
- BRENO, M. C. et al. Maintenance of the snake *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) in captivity. **Snake**, v. 22, p. 126– 30, 1990.
- BÚRGIO, A. C.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 106–111, 1988.

³ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Constock Pub. Associates, 1989. 425 p.

CARAMIA, F. Ultrastructure of mouse submaxillary gland. II. Effect of castration in the male. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 16, p. 524–536, 1966.

CARDOSO, J. L. C.; BRANDO, R. B. **Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento**. São Paulo: Santos, 1982. 24 p.

CARDOSO, J. L. C et al. **Manual de Vigilância Epidemiológica: Acidentes por animais peçonhentos**. São Paulo: Secretaria do Estado da Saúde, 1993. 61 p.

CARDOSO, J. L. C.; SIQUEIRA, F. O.; HUI, W. F. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Ed. Sarvier, 2003. 468 p.

CARNEIRO, S. M. et al. Morphometric studies on venom secretory cells from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) before and after venom extration. **Toxicon**, v. 29, p. 569–580, 1991.

CHRETIEN, M. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. **Int. Rev. Cytol.**, v. 50, p. 333–396, 1977.

DE LUCCA, F. L. et al. Protein synthesis and morphological changes in the secretory epithelium of the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* at different times after manual extraction of venom. **Toxicon**, v. 12, p. 361-369, 1974.

DENSON K. W.; ROUSSEAU, W. E. Separation of the coagulant components of *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 8, n. 1, p. 15–19, 1970.

DOUGLAS, C. R. Fisiologia da secreção salivar. In: _____. **Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 896-897.

FARSKY, S. H. et al. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. **Role in leucocyte recruitment. Med. Inflamm.**, v. 9, p. 213-221, 2000.

FOX, J. M.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfite bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS**, v. 275, p. 3016-3030, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília: FUNASA, 2001. 112 p.

FURTADO, M. F. **Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (Hoge 1965) em função da idade das serpentes**. 1987. 118 f. (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

FURTADO, M. F. D. et al. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, p. 219–226, 1991.

FURUKAWA, Y.; HAYASHI, K. Factor X converting and thrombom-like activities of *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 15, n. 2, p. 97–105, 1977.

GANS, C.; KOCHVA, E. Short communications the accessory gland in the venom apparatus of viperid snakes. **Toxicon**, v. 3, p. 61-63, 1963.

GENNARO, J. F.; HALL, H. P.; CASEY, E. R.; HAYES, W. K. Neurotropic effects of venoms and other factors that promote prey acquisition. **J. Exp. Zool.**, v. 307A, p. 488-499, 2007.

GENNARO Jr, J. F.; CALLAHAN III, W. P.; LORINCZ, A. E. The anatomy and biochemistry of a mucous-secreting cell type present in the poison apparatus of the pit viper *Ancistrodon piscivorus*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 106, p. 463–471, 1963.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; KOCHVA, E. Unusual aspects of the venom apparatus of the blue coral snake, *Maticora birvigata*. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 53, p. 199–210, 1990.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; KOCHVA, E. Histological features of the venom apparatus of sea snake *Lapemis curtus*. **Snake**, v. 25, p. 27–37, 1993.

GOMES, N.; PUORTO, G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca*, Wied, 1824 (Serpentes Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, p. 90–113, 1993.

GREENE, H. W.; FOGDEN, M. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. Berkeley: University of California Press, 1997. 351 p.

GRESIK, E. W. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. **Microsc. Res. Tech.**, v. 27, p. 1–24, 1994.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211–223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholopase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995.

GUZZO, M. L. et al. Role of kinins and nitric Oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 38, p. 1535-1546, 2000.

HESSEL, B.; BLOMBACK, M. The protelolytic action of the snake venom enzymes arvin and replilase on N-terminal chain-fragments of human fibrinogen. **FEBS Lett.**, v. 18, n. 2, p. 318–320, 1971.

HIPKAEAO, W. et al. Expression and Localization of the Transcription Factor JunD in the Duct System of Mouse Submandibular Gland. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 52, p. 479–490, 2004.

JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I Role of the peripheral elements of the Golgi complex. **J. Cell Biol.**, v. 34, p. 577-596, 1967a.

JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. **J. Cell Biol.**, v. 34, p. 597-615, 1967b.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Órgãos associados ao trato digestivo. In: _____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 317-321.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996.

KARDONG, K. V. The evolution of snakes apparatus in snakes from colubrids to viperids & elapids. **Mem. Inst. Butantan**, v. 6, p. 105-118, 1982.

KERCHOVE, C. M. et al. Stimulation of the α -adrenoceptor triggers the venom production cycle in the venom gland of *Bothrops jararaca*. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 411-416, 2004.

KERCHOVE, C. M. et al. Alpha1-adrenoceptors trigger the snake venom production cycle in secretory cells by activating phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and ERK signaling pathway. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr.**, v. 150, p. 431-437, 2008.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent Insights and Progress. **Curr. Gastroenterol Rep.**, v.12, p. 319-330, 2010.

KOCHVA, E. A quantitative study of venom secretion by *Vipera palaestinae*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 9, p. 381-90, 1960 .

KOCHVA, E.; GANS, C. The venom gland of *Vipera palestinae* with comments on the glands of some other viperines. **Acta. Anat.**, v. 62, p. 365-401, 1965.

KOCHVA, E.; GANS, C. Histology and histochemistry of venom glands of some Crotaline snakes. **Copeia**, v. 3, p. 506-515, 1966.

KOCHVA, E. Oral glands of the Reptilia. Biology of the reptilia. **Physiology B.**, v. 8, p. 43, 1978.

KOCHVA, E., The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, p. 65-106, 1987.

KUTTA, H. et al. Antimicrobial defence mechanisms of the human parotid duct. **J. Anat.**, v. 208 , p. 609-619, 2006.

LAGOW, E.; DESOUSA, M. M.; CAESON, D. D. Mammalian reproductive tract mucins. **Eur. Soc. Hum. Reprod. Embryol.**, v. 5, p. 280-292, 1999.

LELOUP, P. Observations sur la reproduction de *Bothrops schlegelii* (Hoge) en captivité. **Acta Zool. Path. Antiv.**, v. 62, p. 173-201, 1975.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflamm. J.**, v. 17, p. 95–105, 1993.

LUNA, M. S. A. et al. Sympathetic outflow activates the venom gland of the snake *Bothrops jararaca* by regulating the activation of transcription factors and the synthesis of venom gland proteins. **J. Exp. Biol.**, v. 212, p. 1535-1543, 2009.

MACKESSY, S. P. Morphology and ultrastructure of the venom gland of the Northern Pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. **J. Morphol.**, v. 208, p. 109–128, 1991.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zool. Anz.**, v. 245, p. 147–159, 2006.

MELDOLESI, J. Regulation of pancreatic exocrine secretion. **Pharmacol. Res. Commun.**, v. 8, p. 1-24, 1976.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: _____. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33-61.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, p. 304–312, 2006.

MOURA-DA SILVA, A. M. et al. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinase: a hypothesis explaining local tissue damage following snakebite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 2000-2005, 1996.

ORON, U.; BDOLAH, A. Regulation of protein synthesis in venom gland of viperid snakes. **J. Cell Biol.**, v. 56, p. 177–190, 1973.

PAINE, M. J. I. et al. Purification cloning and molecular characterization of high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhgin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PEDERSEN, A. M. et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Dis.**, v. 8, n. 3, p. 117-129, 2002.

PERRA, M. T.; PUXEDDU, P.; SIRIGU, P. A histochemical study of the main excretory duct of the human submandibular gland. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, p. 525-530, 1988.

PETRICEVICH, V. L. et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 38, p. 1253-1266, 2000.

PEZZANO, V. Reproduction of *Bothrops alternatus* (Duméril, Bibron, Duméril, 1854) in captivity. **Lit. Serpent.**, v. 6, p. 13-18, 1986.

PIMENTA, D. C. et al. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, v. 21, p. 1034–1042, 2007.

PINKSTAFF, C. A. Cytology, histology, and histochemistry of salivary glands: an overview. In: VERGONA, K. D. (Ed.). **Biology of the salivary glands**. London: CRC Press, 1993. p. 15–31.

QUISSELL, D. O. Stimulus – exocytosis coupling mechanism in salivary gland cells. In: VERGONA, K. D. (Ed.). **Biology of the salivary glands**. London: CRC Press, 1993. p. 181-195.

RHOADES, R.; LORINCZ, A. E.; GENNARO, J. F. Polysaccharides content of the poison apparatus of the cottonmouth moccasin *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. **Toxicon**, v. 5, p. 125-131, 1967.

ROGERS, D. F. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. **Eur. Respir. J.**, v. 7, p. 1690–1706, 1994.

ROGERS, D. F. Cells in focus. The airway goblet cell. **Int. J. Biochem. Cell B.**, v. 35, p. 1-6, 2003.

ROTENBERG, D.; BAMBERGER, E. S.; KOCHVA, E. Studies on ribonucleic acid synthesis in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Ophidia, Reptilia). **J. Biochem.**, v. 121, p. 609-612, 1971.

RUCOVADO A. et al. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, n. 9, p. 1297-1312, 2000.

SAHASRABUDHEL, K. S. et al. Expression of the antimicrobial peptide, human B-defensin 1. Duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 9, p. 1669-1674, 2000.

SALOMÃO, M. G. **Estrutura e secreção das glândulas de Duvernoy de *Sibynomorphus mikani* (Colubridae, Dipsadinae) e *Philodryas olfersii* (Colubridae, Xenodontinae), e das glândulas de veneno de *Bothrops jararaca* (Viperidae, Crotalinae) e *Micrurus frontalis* (Elapidae, Elapinae) e a influência dos estados de alimentação e de jejum.** 1991. 122 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

SATO, A.; MIYOSHI, S. Ultrastructure of main excretory duct epithelia of the rat parotid and submandibular glands with a review of the literature. **Anat. Rec.**, v. 220, p. 239–251, 1988.

SAZIMA, I. Um estudo comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. **Mem. Inst. Butantan**, v. 50, p. 83-99, 1988.

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitvipers, *Bothrops jararaca*, in Southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. Á.; BRODIE Jr, E. D. (Ed.). **Biology of the pitvipers**. Tyler: Selva, 1992. p. 199–216.

SCHAEFFER JR, R. C. et al. The histochemistry of the venom glands of the rattlesnake *Crotalus viridi helleri*. I Lipid and non-specific esterase. **Toxicon**, v. 10, p. 183-186, 1972a.

SCHAEFFER JR, R. C. et al. The histochemistry of the venom glands of the rattlesnake *Crotalus viridis helleri*. II Monoamine oxidase, acid and alkaline phosphatase. **Toxicon**, v. 10, p. 295-297, 1972b.

SOM, M.; BRANDWEIN, M. Salivary glands. In:_____. **Head and neck imaging**. 3rd ed. St Louis: Mosby-Year Book, 1996. p. 823-914.

SPECIAN, R. D.; OLIVER, M. G. Functional biology of intestinal goblet cells. **Am. Psychol. Soc.**, p. 183-193, 1991.

TABAK, L. A. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 547-564, 1995.

TAUB, A. M. Ophidian cephalic glands. **J. Morphol.**, v. 118, p. 529-542, 1966.

VIGUÉ, M. Sistema Digestório. In:_____. **Grande atlas do corpo humano: anatomia, histologia, patologias**. São Paulo: Manole, 2007. p. 336.

WARREL, D. A. Snake venoms in science and clinical medicine 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygi.**, v. 83, n. 6, p. 732-740, 1989.

WILBORN, W. H.; SHACLEFORD, J. M. Microanatomy of human salivary glands. In: MENAKER, L. et al. (Ed.). **The biologic basis of dental caries: an oral biology textbook**. Hagerstown: Harper & Row, 1980. p. 3-62.

WILCOX, W. B.; PINKSTAFF, C. A. Histology and mucosubstance histochemistry of the major salivary glands in *Galago senegalensis*. In:_____. **The Lesser Bushbaby (Galago) as an animal model**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1982. p. 199.

YOUNG, B. A.; BLAIR, M.; ZAHN, K.; MARVIN, J. Mechanics of venom expulsion in *Crotalus*, with special reference to the role of the fang sheath. **Anat. Record**, v. 264, p. 415-426, 2001.

YOUNG, B. A. et al. Venom injection by rattlesnakes (*Crotalus atrox*): peripheral resistance and the pressure-balance hypothesis. **Can. J. Zool.**, v. 81, p. 313–320, 2003.

YOUNG, B. A.; KARDONG, K. V. Mechanisms controlling venom expulsion in the Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*. **J. Exp. Zool.**, v. 307A, p. 18-27, 2007.

YAMANOUYE, N. et al. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. **J. Exp. Biol.**, v. 200, p. 2547- 2556, 1997.

YAMANOUYE, N. et al. Characterization of β -adrenoceptors responsible for venom production in the venom gland of snake (*Bothrops jararaca*). **Life Sci.**, v. 67, p. 217–226, 2000.

YOSHIE, W.; ISHIYAMA, M.; OGAWA, T. Fine structure of Duvernoy's gland of the Japanese colubrid snake, *Rhabdophis tigrinus*. **Arch. Histol. Jpn.**, v. 45, p. 375-384, 1982.

ZAGO, D. A. **Estudo Morfológico e histoquímico de glândulas salivares relacionadas com a evolução da função venenosa nos ofídios.** 1971. 69 f. Tese (Doutorado em Histologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971.

ZABLITH, M. B. **Vias de sinalização desencadeadas pela estimulação do adrenoceptor β em células secretoras da glândula de veneno da serpente *Bothros jararaca*.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ZINGALI, R. B. et al. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, p. 10794-10802, 1993.

ZUNG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introduction biology of amphibians and reptiles.** San Diego: Academic Press. 2001. 630 p.