

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS**

**Maximilian Estevan Oliveira**

**PROTOCOLO DO CIRCUITO DE HEMOPERFUSÃO EM RATOS PARA A  
REMOÇÃO DE VENENO OFÍDICO**

**Sorocaba/SP**

**2017**

**Maximilian Estevan Oliveira**

**PROTOCOLO DO CIRCUITO DE HEMOPERFUSÃO EM RATOS PARA A  
REMOÇÃO DE VENENO OFÍDICO**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação da Universidade de Sorocaba, como exigência para obtenção do título de Mestre na área de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

**Sorocaba/SP  
2017**

### **Ficha Catalográfica**

O48p Oliveira, Maximilian Estevan  
Protocolo de circuito de hemoperfusão em ratos para a remoção  
de veneno ofídico / Maximilian Estevan Oliveira. – 2017.  
47 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2017.

1. Cobra venenosa – Veneno. 2. Hemoperfusão. 3.  
Envenenamento – Tratamento. 5. Farmacotécnica. I. Franco, Yoko  
Oshima, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

**Maximilian Estevan Oliveira**

**PROTOCOLO DO CIRCUITO DE HEMOPERFUSÃO EM RATOS PARA A  
REMOÇÃO DE VENENO OFÍDICO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em 09/03/2017.

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yoko Oshima Franco

Universidade de Sorocaba - UNISO

---

Banca Examinadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marli Gerenutti

Universidade de Sorocaba - UNISO

---

Banca Examinadora: Profº Dr Hélio Rubens Jacinto Pereira Junior

Escola Superior de Administração, Marketing e Comunicação de Sorocaba -  
ESAMC

Dedico o presente trabalho aos meus pais,  
Aparecido Fatimino e Regina Meira, pela vida e  
pelo exemplo da existência digna e labutante.  
Apesar de todos os obstáculos que passei,  
sempre, me apoiaram em todas as minhas  
escolhas.

À minha esposa, Carla Delfim e minha filha,  
Manuela Delfim, pelo apoio, paciência e  
compreensão sem os quais eu não chegaria  
aonde cheguei.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que, de alguma forma, ajudaram-me na execução da elaboração da pesquisa e, consequente, Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre na área de Ciências Farmacêuticas.

Aos colaboradores como Prof<sup>a</sup> Dra. Valquíria Miwa Hanai Yoshida, Prof<sup>o</sup> Me. Élvio Franco de Camargo Aranha, Me. Edson Hideaki Yoshida, Ma. Thaisa Borim Pickler, Me. Fernando Olímpio, Me. Leo Victorino e Ma. Valéria de Campos Orsi.

Aos alunos de Iniciação Científica Jéssica Campanholi, Felipe Silveira Moreno e Roberta Lima Cavalcante, que me incentivaram, determinando diretamente e indiretamente um caminho a seguir.

À Sterileno, Sorocaba, Brasil, pela esterilização com óxido de etileno da coluna e dos filtros de poliuterano.

Ao Enf<sup>o</sup> Samir Adalberto Siqueira Silva, representante da Politec Saúde, São Paulo, Brasil, pelo empréstimo da bomba peristáltica, além da doação dos equipos e extensores compatíveis com o equipamento no circuito.

À equipe da Unicamp com os colaboradores, Profs. Drs. Stephen Hyslop e Lourdes Dias, pelo empréstimo do aparelho de anestesia inalatória e ensinamento da técnica de canulação.

À Unidade de Hemodiálise do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba que nos concedeu uma visita a aluna de iniciação científica Jessica Campanholi, em especial à enfermeira Cristiane Guassi Rozada (Unidade de Hemodiálise do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba), e ao farmacêutico Luiz Madaleno Franco (Pharma Nutrition, Piracicaba), pelo acolhimento em visita técnica.

Ao ERSA-Piracicaba pela doação dos antivenenos utilizados neste estudo.

Ao biólogo, Prof. Dr. José Carlos Cogo, pela doação dos venenos ofídicos.

A Uniso pela bolsa de estudos concedida, através do Acordo Sindical, e a todos os docentes do PPGCF, pelo rico aprendizado e convivência.

Aos professores da Banca Examinadora cuja honrosa participação muito enriquecerá esta minha dissertação.

Porém, uma pessoa, em especial, tem de ser receber meu agradecimento: a Prof<sup>a</sup> Dra. Yoko Oshima Franco que, além de professora do Curso e orientadora da pesquisa, mostrou-se uma companheira nas horas intermináveis de orientação a esse aluno que, por vezes, esteve desorientado. Obrigado, professora!

*Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.*

***Albert Einstein***

## RESUMO

O tratamento específico ao envenenamento ofídico é a soroterapia, pela administração endovenosa (e.v.) de soro antiofídico. Estudos prévios com ácido tânico mostraram que este agente precipita venenos ofídicos aniquilando seus efeitos tóxicos. Entretanto, o seu uso e.v. é contraindicado por precipitar igualmente as proteínas sanguíneas, o que remete à alternativa da hemoperfusão, principalmente em casos graves de envenenamento.

Os objetivos deste estudo foram:

- a) implantar um protocolo de circuito para hemoperfusão em ratos visando à remoção de veneno ofídico;
- b) avaliar a eficácia de cartucho de hemoperfusor confeccionado com grânulos de carvão ativado (adsorção) aprisionados em ácido tânico comercial (precipitação) na remoção do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) comparativamente ao seu antiveneno específico, que representou a condição controle;
- c) avaliar a influência da técnica de hemoperfusão sobre o perfil hematológico (contagem de eritrócitos, plaquetas e leucócitos).

O delineamento do estudo foi experimental *in vivo* com animais, que foram divididos em 3 grupos:

- I) Hemoperfusão: representou o controle da implantação do circuito de hemoperfusão;
- II) Cdt & antiveneno (controle);
- III) Cdt & Hemoperfusão.

Fundo os experimentos os animais foram sacrificados após aprofundamento anestésico para coleta de sangue e posterior contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Os resultados obtidos foram: o circuito para hemoperfusão em ratos foi implantado com êxito; o cartucho para hemoperfusão mostrou-se eficaz na remoção do veneno crotálico, comparativamente ao antiveneno específico; e a hemoperfusão não teve impacto sobre a quantidade total de leucócitos e eritrócitos em todos os grupos tratados, mas diminuiu significativamente a quantidade de plaquetas.

**Palavras-Chave:** Acidente ofídico; Ácido tânico; Cartucho; Hemoperfusão.

## ABSTRACT

The specific treatment to snake envenoming is the serum therapy, by intravenous administration of antiophidian serum. Previous studies with tannic acid show that this agent precipitates snake venom annihilating its toxic effects. However, its intravenous use is contraindicated since it also precipitates blood proteins, which leads to the alternative of hemoperfusion, especially in severe poisoning cases.

The objectives of this study were:

- a) to implant a protocol for hemoperfusion in rats aiming to the snake venom removal;
- b) to evaluate the efficacy of hemoperfusor cartridge made with activated charcoal granules (adsorption) trapped in commercial tannic acid (precipitation) against the effects of *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) venoms, comparatively to their specific antivenom, which represented the control conditions;
- c) To evaluate the influence of the hemoperfusion technique on the hematological profile (erythrocytes, platelets and leukocytes counts).

The study design was experimental *in vivo* using animals, which were divided into 3 groups:

- I) Hemoperfusion: it represents the control of the implantation of the hemoperfusion circuit;
- II) Cdt & anticrotalic (control);
- III) Cdt & Hemoperfusion.

At the end of experiments the animals were sacrificed by deepening the anesthetic plan for the blood collection and further score of erythrocytes, leukocytes and platelets.

The obtained results were: the implantation of a hemoperfuser circuit for rats was successful; the hemoperfuser cartridge was efficacious, comparatively to anticrotalic antivenom; and the hemoperfusion had no impact on the total quantity of leukocytes and erythrocytes in all treated groups, but significantly decreased the platelets' quantity.

**Keywords:** Cartridge; Hemoperfusion; Snake accident; Tannic acid.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Precipitação *in vitro* de proteínas pelo ácido tânico (veneno de *Crotalus durissus terrificus*) ..... 17

Figura 2 - Cartucho confeccionado *in house*..... 20

Figura 3 - Suporte Inalatório Vetcare – Plus..... 22

Figura 4 - Equipamento automatizado Sysmex – XS – 1000i ..... 24

### **Capítulo I**

Figura 1 - Esquema do circuito completo de hemoperfusão. .... 26

Figura 2 - Bomba de infusão com a velocidade de 60/mL/hora no inicio da hemoperfusão ..... 28

Figura 3 - Esquema do circuito completo de hemoperfusão. .... 28

Figura 4 - Tricotomia na região cervical ventral..... 29

Figura 5 - Isolamento do nervo vago e artéria carótida ..... 29

Figura 6 - Canulação da artéria carótida esquerda ..... 30

Figura 7 - Canulação da artéria carótida direita ..... 30

Figura 8 - Início da hemoperfusão..... 31

Figura 9 - Sutura de pele e curativo em solução degermante..... 31

Figura 10 - Procedimento de coleta de sangue e análise sanguínea..... 32

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Parâmetros hematológicos dos grupos tratados (grupos 1, 2 e 3) .....34

## **LISTAS DE ABREVIATURAS**

Cdt - *Crotalus durissus terrificus*.

CCIP - Cateter Venoso Central de Inserção Periférica

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais.

e.v. – endovenoso

h - hora

i.m. – intramuscular

kg - quilograma

mg – miligrama

mL – mililitro

µg – micrograma

MPA – Medicação Pré-Anestésica

PICC – Peripherally Inserted Central Venous Catheter.

U.I. – Unidade Internacional

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1	Material .....	20
3.2	Veneno ofídico.....	20
3.3	Concentrações de veneno e antiveneno .....	21
3.4	Delineamento de estudo.....	21
3.5	Grupos experimentais.....	21
3.5	Hemoperfusão .....	21
3.6	Perfil Hematológico.....	23
3.7	Análise estatística.....	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo I - PROTOCOLO DO CIRCUITO DE HEMOPERFUSÃO EM RATOS PARA A REMOÇÃO DE VENENO OFÍDICO .....</b>		<b>26</b>
1	Círculo/cartucho de hemoperfusão para ratos Wistar, adultos com peso médio entre 300 – 400g .....	26
2	Volume de preenchimento.....	27
3	Velocidade do fluxo sanguíneo.....	27
4	Sistema Finalizado .....	28
5	Processo de Hemoperfusão .....	29
6	Implantação das cânulas .....	29
<b>Capítulo 2 - AVALIAÇÃO DATÉCNICA DE HEMOPERFUSÃO DA UTILIZAÇÃO DE CARTUCHOS CONFECCIONADOS IN HOUSE POR YOSHIDA et al. (2016) .....</b>		<b>32</b>
1	Técnica de hemoperfusão .....	32
1.1	Grupo I (controle do procedimento de hemoperfusão) .....	32
1.2	Grupo controle de animais envenenados e tratados com antiveneno: Grupos II (Cdt & anticrotálico) .....	33
1.3	Grupo III: animais envenenados com Cdt e tratados com hemoperfusão .....	33
2	<b>Avaliação da influência da técnica de hemoperfusão sobre o perfil hematológico (contagem de eritrócitos, plaquetas e leucócitos) .....</b>	<b>33</b>
2.1	Grupo I: (Controle do procedimento de hemoperfusão) .....	33
2.2	Grupos controles de animais envenenados e tratados com antivenenos: Grupos II (Cdt & anticrotálico) .....	33
2.3	Grupo III: animais envenenados com Cdt e tratados com hemoperfusão....	34
<b>DISCUSSÃO .....</b>		<b>36</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>		<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>		<b>39</b>

## **ANEXOS**

**ANEXO A** - Parecer do CEUA

**ANEXO B** - Atestado de sanidade animal

**ANEXO C** - Artigo submetido

**ANEXO D** - Publicado

## INTRODUÇÃO

Abordou-se neste trabalho a problemática do acidente ofídico causado pela serpente *Crotalus durissus terrificus*, de grande importância médica, em virtude de sua frequência (7,7% dos acidentes), gravidade e letalidade decorrente de injúria renal e complicações.

O veneno crotálico possui três ações principais, que são segundo o Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (BRASIL, 2001):

(...) a ação neurotóxica, miotóxica e coagulante. Ação neurotóxica é produzida principalmente pela fração crotoxina, uma neurotoxina de ação pré-sináptica que atua nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina. Esta inibição é o principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular do qual decorrem as paralisias motoras. A ação miotóxica, produz lesões de fibras musculares esqueléticas com liberação de enzimas e mioglobina para o soro e que são posteriormente excretadas pela urina. Não está identificada a fração do veneno que produz esse efeito miotóxico sistêmico. Há referências experimentais da ação miotóxica local da crotoxina e da crotamina. A mioglobina, e o veneno como possuindo atividade hemolítica “*in vivo*”. Estudos mais recentes não demonstram a ocorrência de hemólise nos acidentes humanos. Ação coagulante decorre de atividade do tipo trombina que converte o fibrinogênio diretamente em fibrina. O consumo do fibrinogênio pode levar à incoagulabilidade sanguínea. Geralmente não há redução do número de plaquetas. As manifestações hemorrágicas, quando presentes, são discretas. (pag.26).

Na obra intitulada “Serpentes Peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil” de Paulo Sergio Bernarde (2014, p. 117-118), assim é descrita a serpente:

A serpente *Crotalus durissus*, cascavel é uma serpente peçonhenta em todas as regiões do Brasil e típica de áreas abertas. O nome *Crotalus* vem do grego “Krotalon” que significa chocalho, em alusão ao guizo que as cascavéis apresentam no final da calda. Apresenta dentição solenóglifa, com o veneno de ação neurotóxica, miotóxica e coagulante (acidente crotálico).

O tratamento precoce com a soroterapia, a padronização atualizada de condutas de diagnóstico e equipes de saúde capacitadas para o atendimento ao acidentado são fatores imprescindíveis para combater a letalidade e sequelas indesejáveis (BRASIL, 2001).

Diferentemente da área humana, dados epidemiológicos de acidente ofídico na área veterinária são escassos. Os primeiros registros sobre esse envenenamento foram feitos por intermédio de boletins de notificações, que acompanhavam as ampolas de soro antiofídico, distribuídos pelo Instituto Butantan (BICUDO e BIONDO, 1992). Em um levantamento realizado por Fonseca, em 1949, de dados dos boletins desse Instituto, em um período de 43 anos, foram encontradas 1658 notificações de acidentes com animais que resultaram em 151 mortes. Infelizmente não foram mencionadas as espécies de animais a que se referiam esses números (TOKARNIA e PEIXOTO, 2006).

Bicudo e Biondo (1992) mencionam os dados de Stefanini (1991) referentes à mortalidade de bovinos, que teria ocorrido entre 1973 e 1991, em sete fazendas localizadas em cinco municípios do Estado de São Paulo. Nesse período teriam morrido 358 animais por acidentes ofídicos. Considerando-se a população total dos bovinos dessas fazendas, a mortalidade anual por esse tipo de acidente oscilaria entre 0,13 e 1,2%. Também não há indicações de como foram estabelecidos os diagnósticos, nem sobre alterações clínico patológicas. Bicudo (1994) acrescenta que estimando a população bovina em torno de 100 milhões de cabeças, e aplicando o índice de 0,13%, o número de animais mortos por envenenamento ofídico no Brasil seria de 130 mil cabeças por ano (TOKARNIA e PEIXOTO, 2006).

Há mais de uma década pesquisando sobre substâncias capazes de atenuar os efeitos tóxicos de venenos ofídicos, seja através de produção de antivenenos específicos ou utilizando antivenenos comerciais (OSHIMA-FRANCO et al., 1999; OSHIMA-FRANCO et al., 2000; OSHIMA FRANCO et al., 2001; OSHIMA-FRANCO et al., 2002); íons manganês (SOARES et al., 2002; OSHIMA FRANCO et al., 2004; RANDAZZO-MOURA et al., 2006; BUENO et al., 2007), heparina (OSHIMA-FRANCO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004; ROSTELATO-FERREIRA, RODRIGUES-SIMIONI e OSHIMA-FRANCO, 2010), eis que as plantas medicinais – a despeito da complexidade do estudo fitoquímico, alto custo em equipamentos/solventes e prolongado tempo requerido ao seu estudo –, representam uma fonte natural de potencialidades terapêuticas, à qual temos investido desde 2004.

Estudos prévios com *Casearia sylvestris* (OSHIMA FRANCO et al., 2005; CINTRA-FRANCISCHINELLI et al., 2008); *Casearia gossypiosperma* (CAMARGO et al., 2010); *Plathymenia reticulata*, *Mikania laevigata* (MELO et al., 2009; COLLAÇO

et al., 2012), *Camellia sinensis* (ROSA et al., 2010) e *Dipteryx alata* (PUEBLA et al., 2010; FERRAZ et al., 2012) comprovaram a eficácia das plantas medicinais contra os venenos de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus* de forma não equitativa, explicado pelos diferentes mecanismos de ação desses venenos.

O achado mais interessante foi comprovar a eficácia do fitoquímico comercial ácido tântico contra esses venenos ofídicos (MELO et al., 2009) de forma equitativa, mostrando ser este agente capaz de precipitar as proteínas (Figura 1) constituintes da complexa mistura dos venenos ofídicos. Assim, plantas ricas em taninos tornam-se potencialmente capazes de diminuir a toxicidade dos venenos ofídicos, por um mecanismo físico de precipitação.

**Figura 1 - Precipitação *in vitro* de proteínas (veneno de *Crotalus durissus terrificus*) pelo ácido tântico.**



Fonte: (MELO et al., 2009)

A favor desses achados podem ser citados os de Pithayanukul et al. (2005, 2008) que demonstraram a capacidade neutralizante do ácido tântico contra as atividades tóxicas da *Naja kaouthia* (Elapidae) numa investigação *in vitro*, ampliando o gênero de serpentes peçonhentas e reforçando a ideia de precipitação de proteínas; e Kuppusamy e Das (1993) que testaram ácido tântico administrado subcutaneamente em camundongos, que demonstrou capacidade de reduzir a atividade enzimática de creatinoquinase induzido pelo veneno de *Crotalus adamanteus*.

Contudo, a administração endovenosa de ácido tântico levaria a uma precipitação de proteínas do sangue, que poderia ser sanado se o seu uso passasse

a ser via técnica de hemoperfusão, através de um aparelho extracorpóreo, o hemoperfusor (ROMMES, 1992; WINCHESTER, 1990). Este consiste de um cartucho que contém material adsorvente, geralmente carvão ativado, que adsorve substâncias tóxicas do sangue, até que a quantidade de material tóxico seja removida do sangue (WINCHESTER, 1990).

A hemoperfusão, primeiramente relatada por Yatzidis (1964), é recomendada em procedimento de emergência em casos de severo envenenamento ou intoxicação que podem levar à injúria renal, e em pacientes que estão passando por um transplante de fígado. Antes e após o transplante em si, os pacientes são submetidos à limpeza do sangue, de modo que o fígado recém-transplantado não fique sobrecarregado (CHANG, 1972).

Neste contexto, em busca de uma terapia alternativa à soroterapia destinada inicialmente à área veterinária; à capacidade do fitoquímico ácido tânico em precipitar proteínas (incluindo proteínas presentes em venenos ofídicos); de um veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* de elevada letalidade; e da técnica de hemoperfusão, são apresentados neste trabalho, dois capítulos:

Capítulo 1) apresentação de protocolo do circuito de hemoperfusão em ratos para a remoção de veneno ofídico; e

Capítulo 2) resultados da avaliação da técnica de hemoperfusão através da utilização de cartuchos confeccionados *in house* por Yoshida et al. (2016).

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste estudo foram apresentar um protocolo do circuito de hemoperfusão em ratos para a remoção de veneno ofídico (Capítulo I) e apresentar os resultados de avaliação do cartucho de hemoperfusor confeccionado por Yoshida et al. (2015) (Capítulo II).

Os objetivos específicos foram:

- a) implantar um circuito de hemoperfusão em ratos para a remoção de venenos ofídicos;
- b) avaliar a eficácia de cartuchos de hemoperfusor confeccionados com grânulos de carvão ativado (adsorção) aprisionados em ácido tântico comercial (precipitação) contra o veneno de *Crotalus durissus terrificus* comparativamente ao seu antiveneno específico, que representou a condição de controle;
- c) avaliar a influência da técnica de hemoperfusão sobre o perfil hematológico (contagem de eritrócitos, plaquetas e leucócitos).

### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Material

Soro anticrotálico (Instituto Vital Brazil S.A – Lote: 1352002 C; Fab.: 10/2013: Val.:10/2016 e soro antibotrópico (Instituto Vital Brazil S.A – Lote: 135101 E; Fab.:01/2013: Val.: 01/2016) comerciais foram doados pelo Escritório Regional de Saúde (ERSA) de Piracicaba (SP). Cartuchos confeccionados *in house* (Figura 2) para permitir o fluxo de um volume de sangue proporcional à massa corpórea do rato, foram doados pela professora Dra. Valquíria Miwa Hanai Yoshida e acadêmica Roberta Lima Cavalcante. Brevemente, a coluna foi construída utilizando-se seringa de polipropileno de 5 mL – cortada num comprimento de 3 cm - preenchida com grânulos de carvão ativado (Sigma-Aldrich®). Os grânulos de carvão ativado (0,9 g) foram mantidos dentro da coluna entre dois filtros de poliuretano revestidos com 0,02 µg de ácido tânico, fechados por meio de uma tampa especialmente concebida e constituíram o adsorvente do hemoperfusor.

**Figura 2 - Cartucho confeccionado *in house***



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

#### 3.2 Veneno ofídico

O veneno ofídico de *Crotalus durissus terrificus* foi doado pelo professor Dr. José Carlos Cogo, da Universidade Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

### 3.3 Concentrações do veneno e antiveneno

Utilizaram-se concentrações de 500 µg/100 g peso do rato do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) para a obtenção de efeito tóxico visível, embora a DL50 para esse veneno seja de 180 µg/100 g peso do rato (BATINA, GIGLIO, SAMPAIO, 1997). A administração do veneno ocorreu pela via intramuscular (i.m.) no membro posterior direito (coxa) do animal. A dose de soro anticrotálico foi calculada e administrada de acordo com as orientações do fabricante (Instituto Vital Brasil S.A), ou seja, 1 mL neutraliza 1500 µg de veneno.

### 3.4 Delineamento do estudo

Experimental com animais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 031/2014). Foram utilizados ratos machos Wistar (pesando entre 290 g a 400 g) adquiridos da Anilab - Animais de Laboratório, Paulínia (SP) e ambientados no Biotério da Uniso, em sistema isolado micro ambiental Smaflex®.

### 3.5 Grupos experimentais

- I. Grupo Controle do processo de Hemoperfusão: os animais não receberam nenhum tratamento (nem veneno, nem antiveneno) e foram hemoperfundidos;
- II. Grupo Controle Cdt tratado com antiveneno específico: os animais receberam as concentrações acima descritas do veneno de Cdt e após 10 minutos foram tratados com antiveneno anticrotálico;
- III. Grupo Cdt tratado por Hemoperfusão: os animais cirurgicamente preparados receberam as concentrações acima do veneno e após 10 minutos foram hemoperfundidos;

### 3.6 Hemoperfusão

Os pontos técnicos foram preparados de acordo com Winchester (1990) e adaptados para o modelo experimental em ratos. Previamente ao procedimento de

hemoperfusão, o cartucho foi enxaguado com 4 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9 % (m/v) heparinizado (2.500 U/L). Após o preparo do sistema, seguiu-se o procedimento anestésico do animal, que foi dividido em: medicação pré-anestésica (MPA), anestesia geral e período pós-cirúrgico. A MPA foi realizada com Xilazina (10 mg/kg, Ceva®) + Midazolam (1 mg/kg, Medley®, Campinas, SP, Brasil) + Ketamina (10 mg/kg, Ceva®, Paulínia, SP, Brasil); a anestesia geral com Isoflurano (volátil, Virbac®, Jurubatuba, SP, Brasil) e o pós-cirúrgico com Tramadol (5 mg/kg, Medley®). Após a anestesia, procedeu-se à canulação do animal.

O acesso vascular para hemoperfusão foi realizado através da canulação da veia jugular e da artéria carótida (de acordo com a técnica utilizada no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp, Campinas, SP, e aprimorada em relação ao tempo operacional e à preservação das estruturas musculares envoltórias, minimizando os efeitos de anestesia prolongada e sem comprometer a saúde do animal), em animais anestesiados por via inalatória (Unicamp, VETCARE – PLUS, fabricado pela INCOTEC CIENTIFICA LTDA) (Figura 3).

**Figura 3 - Suporte Inalatório Vetcare – Plus  
(Prof. Dr. Stephen Hyslop/Unicamp)**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira

O circuito de hemoperfusão foi desenvolvido com o auxílio de uma bomba peristáltica (Terofusion Infusion Pump TE-135), que permite a detecção de bolhas de ar dentro do circuito e, por segurança, interrompe o fluxo garantindo, assim, a segurança do animal.

Uma vez preenchido o cartucho e o animal cuidadosamente canulado, administrou-se uma dose *in bolus* de heparina 10 U.I./mL na linha arterial (RYAN et al., 1979), quantidade suficiente para manter o tempo de coagulação de Lee-White, em torno de 30 min, e o tempo de coagulação ativada ou o tempo de tromboplastina parcial sanguínea total em torno de duas vezes o valor normal. Durante o estudo, o uso da heparina foi monitorado, pois poderia agravar o quadro do envenenamento.

O cartucho foi mantido com o lado de entrada voltado para baixo e o fluxo sanguíneo foi então iniciado. Terminada a hemoperfusão, o animal foi analgesiado com Tramadol (5 mg/kg), e observado por 24 h, quando foram coletadas amostras sanguíneas dos diferentes grupos. Os animais tiveram um rebaixamento do nível de consciência com Halotano embebido em algodão dentro de uma cubeta de vidro, onde o rato era colocado; ao inalar, seu nível de consciência era rebaixado, em alguns minutos, ao ser retirado do recipiente, para a punção, um algodão com Halotano era colocado em suas narinas para manter o nível de rebaixamento de consciência. A seguir, testava-se o nível apertando as interdigitais do animal, não obtendo resposta motora, assim, iniciava-se o procedimento de coleta da amostra de sangue com punção intracardíaca (WEISS et al., 2000).

### 3.7 Perfil Hematológico

As amostras de sangue foram coletadas após 24 h do procedimento de hemoperfusão, utilizando-se anticoagulante de sal dissódico do ácido etileno diamino tetracético (EDTA, 10%) para a realização de hemograma, de contagem de plaquetas e contagem diferencial de leucócitos (JAIN, 1993). As análises foram realizadas no Lapetox – Laboratório de Pesquisa Toxicológica/Uniso e utilizou-se o equipamento automatizado Sysmex – XS-1000i (Figura 4). Os resultados hematológicos obtidos foram interpretados de acordo com Castello Branco et al. (2011) e Melo et al. (2012).

Figura 4 - Equipamento automatizado Sysmex – XS-1000i



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

### 3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos do perfil hematológico foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Tais resultados foram comparados com valores de referência para ratos, através de dados da literatura, de acordo com Castello Branco et al. (2011) e Melo et al. (2012).

## **5 RESULTADOS**

Os resultados são apresentados, a seguir, na forma de Capítulo I e Capítulo II.

## Capítulo 1

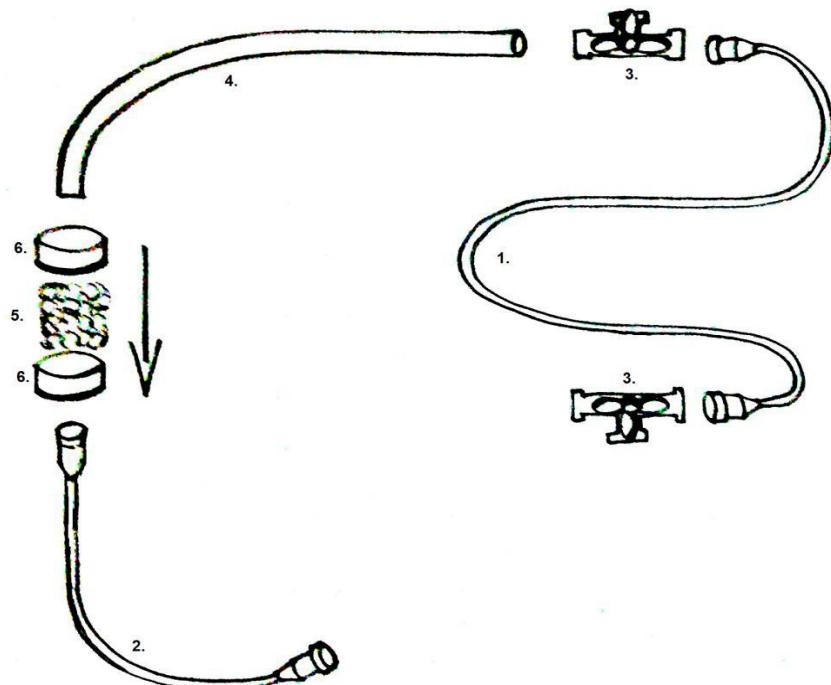
### PROTOCOLO DO CIRCUITO DE HEMOPERFUSÃO EM RATOS PARA A REMOÇÃO DE VENENO OFÍDICO

As etapas a seguir descritas foram padronizadas a partir de dados de literatura e extrações de dados de hemodiálise em humanos.

1. Circuito/cartucho de hemoperfusão para ratos Wistar, adultos com peso médio entre 300 - 400 g.

A Figura 1 ilustra, sequencialmente, os componentes que foram utilizados para compor o circuito e o cartucho para a hemoperfusão. Note que 4 é o equipo macrolúmen específico (Terumo®) para posterior acoplamento à bomba peristáltica.

**Figura 1 - Esquema do circuito/cartucho de hemoperfusão para ratos Wistar.**



Fonte: Elaborado por Jessica Campanholi.

**Legenda:** 1. Extensor de equipamento microlúmen (0,75 mL ou 75 cm); 2. Extensor de equipamento microlúmen (0,25 mL ou 25 cm); 3. Torneira de três vias; 4. Equipo macrolúmen 2 mL ou 22 cm (Terumo®); 5. Carvão ativado; 6. Membranas (onde a primeira na ordem do fluxo contém ácido tânico).

## 2. Volume de preenchimento

Para a implantação de circuito de hemoperfusão para ratos foi considerada, inicialmente, a variável “volume de preenchimento” tanto do cartucho como de todo o sistema. Para isso, extrapolou-se o volume de 5000 mL do modelo de hemodiálise em humanos, que suporta um volume de preenchimento de 500 mL, ou seja, 10% do volume total sanguíneo. Por analogia, para um rato Wistar com volume sanguíneo de 36 mL, o volume de preenchimento esperado seria de 3,6 mL, correspondente aos 10%.

O volume de 1,5 mL preenche o cartucho, tendo sido assim definido, e os 2,5 mL restantes pertencem aos equipos e conectores. Após o término da hemoperfusão são devolvidos 2 mL de volume sanguíneo do circuito visando à reposição das hemácias.

## 3. Velocidade do fluxo sanguíneo

A velocidade de passagem do fluxo sanguíneo pelo cartucho de hemoperfusão também foi monitorada do inicio ao fim. Para isso, a bomba de infusão foi testada e definiu-se a velocidade inicial em 60 mL/h (Figura 2). Assim esta velocidade permitiu que o volume total de sangue percorresse todo o circuito por duas vezes, em 1 hora de hemoperfusão, aproximadamente.

O circuito foi preenchido com 4 mL de Solução Fisiológica NaCl 0,9 % + 10 U.I./mL de heparina. Uma seringa contendo a mesma solução foi conectada ao circuito para uso em infusão contínua (caso houvesse necessidade).

Figura 2 - Bomba de infusão com a velocidade de 60 mL/h durante a hemoperfusão.

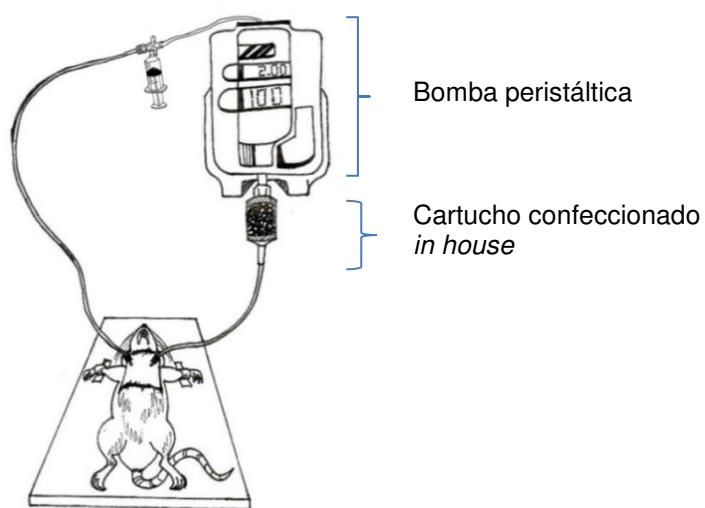


Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

#### 4. Sistema finalizado

A Figura 3 ilustra, esquematicamente, o circuito finalizado para a hemoperfusão em ratos.

Figura 3 - Esquema do circuito completo de hemoperfusão



Fonte: Elaborado por Jessica Campanholi

## 5. Processos da hemoperfusão

A sequência de figuras, a seguir, ilustra o procedimento cirúrgico para a hemoperfusão (do início ao fim).

Realizada a tricotomia e a desinfecção da pele com clorexidina conforme a Figura 4.

**Figura 4 - Tricotomia na região cervical ventral.**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

## 6. Implantação das cânulas

Na Figura 5, mostra-se como isolar o nervo vago da artéria carótida, pois tal procedimento impede que haja parada cardíaca com o estímulo do nervo vago.

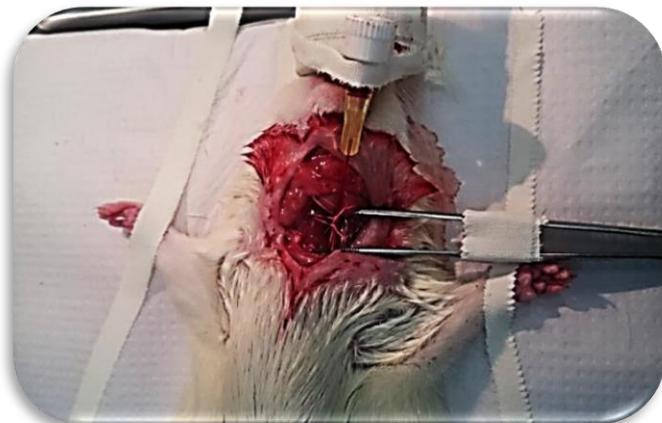
**Figura 5 – Isolamento do nervo vago e artéria carótida**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

Inicia-se, então, o procedimento com incisão longitudinal na região cervical ventral de aproximadamente 3 cm, divulsão dos tecidos adjacentes até exposição e isolamento de veia jugular direita (Figura 6).

**Figura 6 - Canulação da artéria carótida esquerda.**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

Após a divulsão e exposição da artéria carótida esquerda, realiza-se a canulação de ambos os vasos com cateter 24G (Figura 7).

**Figura 7 - Canulação da veia jugular direita.**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira

Após checagem da fixação dos cateteres e o circuito todo conectado, inicia-se a hemoperfusão (Figura 8).

**Figura 8 - Início da Hemoperfusão**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira

Ao final da hemoperfusão, realiza-se ligadura com fio cirúrgico (Nylon 4-0) da artéria e veia canulada a fim de evitar hemorragia, reaproximam-se os tecidos, sutura-se a pele (padrão contínuo), e administra-se curativo com iodo em solução degermante (Figura 9).

**Figura 9 - Sutura de pele e curativo em solução degermante.**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

Após 24 h os animais são anestesiados com aprofundamento para o procedimento de coleta de sangue (Figura 10 ilustra a sequência) visando à contagem de eritrócitos, plaquetas e diferencial de leucócitos.

**Figura 10 - Procedimento de coleta de sangue e análise sanguínea**



Fonte: foto de Maximilian Estevan Oliveira.

## Capítulo 2

### AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE HEMOPERFUSÃO ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE CARTUCHOS CONFECCIONADOS *IN HOUSE* POR YOSHIDA et al. (2016).

#### 1. Técnica de hemoperfusão

Definidos os parâmetros constantes do Capítulo 1 e aplicados aos 3 grupos experimentais, os resultados obtidos são descritos abaixo.

##### 1.1 Grupo I (controle do procedimento de hemoperfusão)

A técnica de hemoperfusão foi aplicada em ratos Wistar ( $n=3$ ), para verificar efeitos colaterais da terapia isolada. Neste grupo, os animais foram hemoperfundidos sem receber nenhum tratamento prévio, exceto o procedimento anestésico (antes e durante). Após a recuperação da anestesia, ainda no laboratório, o animal apresentava uma postura de encolhimento, com as orelhas para trás e ficando imóvel quando alguém se aproximava, sinais característicos de dor, para a qual, já havia o procedimento anestésico pós-cirúrgico, com administração de Tramadol.

Após 24 h, todos os animais estavam alertas, alimentando-se, bebendo e fazendo suas necessidades, demonstrando comportamento de “limpeza” e “postura em pé”.

### 1.2 Grupo controle de animais envenenados e tratados com antiveneno: Grupos II (Cdt & anticrotálico)

A eficácia do antiveneno específico, anticrotálico, foi comprovada em grupos de animais tratados com venenos de Cdt (Grupo II, n=3), respectivamente, conforme descrito em Material e Métodos.

### 1.3 Grupo III: animais envenenados com Cdt e tratados com hemoperfusão

O grupo III que recebeu o veneno de Cdt e foi tratado por hemoperfusão (n=3), sobreviveu ao procedimento e não apresentou nenhum sinal clínico de neurotoxicidade, ao final de 24 h.

## **2. Avaliação da influência da técnica de hemoperfusão sobre o perfil hematológico (contagem de eritrócitos, plaquetas e leucócitos)**

### 2.1 Grupo I (controle do procedimento de hemoperfusão)

Uma diminuição na contagem de plaquetas 459–537 ( $10^3/\mu\text{L}$ ) foi verificada nos hemogramas realizados quando comparada à literatura [837–1455 ( $0^3/\mu\text{L}$ )]; a contagem geral da célula branca e vermelha apresentou-se de acordo com o padrão considerado normal.

### 2.2 Grupo controle de animais envenenados e tratados com antiveneno: Grupo II (Cdt & anticrotálico)

Não se observou alteração no perfil hematológico deste grupo cujos resultados estavam compatíveis ao padrão considerado normal.

### 2.3 Grupo III: animais envenenados com Cdt e tratados com hemoperfusão.

Não se observou alteração no perfil hematológico deste grupo cujos resultados estavam compatíveis ao padrão considerado normal.

Os resultados obtidos do perfil hematológico foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (tabela 1). Tais resultados foram comparados com valores de referência para ratos, através de dados da literatura.

**Tabela 1 – Parâmetros hematológicos dos grupos tratados (grupos 1, 2 e 3)**

	Contagem de leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Contagem de plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Contagem de eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )
De acordo com Melo et al. (2012)	<b>5,7 – 13,9</b>	<b>837 - 1455</b>	<b>5,0 – 7,62</b>
Grupo 1 – rato 1	10,27	521	6,5
	10,37	511	6,49
	9,97	537	6,49
Grupo 1 – rato 2	12,8	461	7,13
	12,8	469	7,14
	12,8	459	7,14
Grupo 1 – rato 3	7,93	461	7,13
	8,07	469	7,14
	7,88	459	7,14
Média $\pm$ EPM	<b>10,32 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>483 <math>\pm</math> 10,3 *</b>	<b>6,92 <math>\pm</math> 0,10</b>
Grupo 2 – rato 1	12,63	716	6,76
	12,36	691	6,74
	12,62	705	6,79
Grupo 2 – rato 2	8,93	925	6,54
	8,96	921	6,54
	8,88	918	6,53
Grupo 2 – rato 3	8,77	793	7,16
	9,01	754	7,17
	9,11	756	7,19
Média $\pm$ EPM	<b>10,14 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>797,6 <math>\pm</math> 32,5</b>	<b>6,8 <math>\pm</math> 0,09</b>
Grupo 3 – rato 1	8,31	314	6,74
	8,11	319	6,79
	7,97	325	6,70
Grupo 3 – rato 2	9,29	734	6,46
	9,10	738	6,49
	9,34	754	6,49
Grupo 3 – rato 3	8,29	686	6,94
	8,51	685	7,01
	5,29	612	6,82
Média $\pm$ EPM	<b>8,24 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>574,11 <math>\pm</math> 65,1 *</b>	<b>6,71 <math>\pm</math> 0,06</b>

Nos hemogramas realizados, como parâmetros, pode-se verificar uma significativa (\*,  $p<0,05$ ) diminuição da contagem de plaquetas nos grupos 1 e 3, sendo  $483 \pm 10,3$  e  $574,11 \pm 65,1$ , respectivamente ( $10^3/\mu\text{L}$ ) comparativamente à

literatura 837 – 1455 ( $10^3/\mu\text{L}$ ) e ao grupo 2; a contagem geral das células brancas e vermelha estava dentro do padrão considerado normal.

## DISCUSSÃO

A implantação de um circuito de hemoperfusão em ratos foi exitosa; contudo, a remoção do veneno ofídico foi parcial, o que pode estar relacionado à eficácia do cartucho, que por sua vez pode estar relacionada à quantidade de ácido tânico.

O impacto da técnica de hemoperfusão sobre as plaquetas já era conhecido (SIA et al., 2011) e confirmou-se também neste estudo. Várias questões que surgiram na realização deste projeto são discutidas, a seguir.

O emprego do ácido tânico na confecção do cartucho se deu pela comprovação da eficácia do fitoquímico comercial ácido tânico em precipitar proteínas presentes nos venenos ofídicos (MELO et al., 2009; SIA et al., 2011). Os taninos são substâncias fenólicas que apresentam atividades antimutagênica, anticarcinogênica, antioxidante e bactericida. O ácido tânico pertence à classe dos galotaninos e é também indicado para infecções causadas por herpes labial ou para uso ginecológico devido à sua ação adstringente (BRANDÃO et al., 2008). As substâncias fenólicas são amplamente distribuídas em alimentos e bebidas. Esta classe de compostos possui a habilidade de formar complexos insolúveis, em água, com alcalóides, gelatina e outras proteínas, além de possuírem compostos os quais têm importantes características gustativas responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais a exemplo de vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas (BRANDÃO et al., 2008).

Para a implantação da técnica de hemoperfusão o animal escolhido foi o rato da raça Wistar devido ao baixo custo do animal, fácil manutenção e pela existência de biotério dentro das normas da CEUA, na Universidade. O peso do animal também foi considerado, pois igualmente requereria menor quantidade de veneno ofídico, de difícil obtenção. A maior desvantagem deste animal é o seu baixo volume sanguíneo de 6 a 8% do peso (VALADARES, 2006). A quantidade de animais utilizada para cada grupo experimental ( $n=3$ ) foi a mínima e está de acordo com as estratégias após a “era dos testes de DL50” (VALADARES, 2006).

O veneno selecionado, proveniente de serpentes da família Viperidae (gênero *Crotalus*), é de interesse médico no Brasil e apresenta alta incidência de acidentes, gravidade e sequelas dos ferimentos da mordida (PINHO e PEREIRA, 2001).

O circuito de hemoperfusão desenvolvido neste estudo baseou-se no menor volume possível de 10% (HARKNESS e WAGNER, 1993), tendo sido definido em 4

mL, para evitar o choque circulatório, que é um quadro de hipoperfusão disseminada dos tecidos que pode resultar em volume circulante efetivo inadequado (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1994).

Sabendo que o veneno de *C. d. terrificus* atinge seus níveis séricos máximos 2 h após o envenenamento dos animais (SANGIORGIO et al., 2008), a intenção de remoção do mesmo era por uma ação conjunta de adsorção (carvão vegetal granulado) e precipitação das proteínas do veneno (ácido tânico), antes que ele provocasse ações de neurotoxicidade graves (VITAL BRASIL, 1972), ou miotoxicidade (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985; MAGALHÃES et al., 1986), ou distúrbios coagulantes (AMARAL et al., 1988).

A sobrevivência e as condições clínicas apresentadas pelos animais submetidos à hemoperfusão, monitorados por 24 h, foram os indicadores de sucesso do procedimento, seguido pelos parâmetros hematológicos como contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Nesta etapa, a maior preocupação era saber as consequências da hemoperfusão sobre os parâmetros hematológicos, pois as desvantagens desta técnica incluem: perda de plaquetas e trombocitopenia, perda de sangue, esgotamento de nutrientes vitais, hormônios ou vitaminas, liberação de coágulos, reações tóxicas, coagulação, leucopenia, hemólise, infecção, hipotensão e distúrbios metabólicos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013).

Durante os experimentos, observou-se que a hemoperfusão não teve nenhum impacto sobre a contagem total de leucócitos e de eritrócitos em todos os grupos tratados, mas, sim, sobre a contagem de plaquetas (grupos I e III).

Como neste estudo a hemoperfusão levou cerca de 1 h, o volume de sangue do animal passou, pelo menos, 2 vezes através do cartucho, permitindo, desse modo, que um sangue “limpo” voltasse ao rato, através da canulação da veia jugular direita. A maior vantagem da hemoperfusão está na adsorção de tipos de toxinas, como o inoculado do veneno de *C. d. terrificus*.

Com os resultados obtidos na pesquisa, sugerimos modificações nos seguintes padrões: inclusão dos grupos de veneno isolado (juntamente com teste e identificação da dose DL50 para o veneno, pelas variações das doses encontradas na literatura); teste *in vitro* dos cartuchos com encaixes diferentes pelos problemas com a hemorragia que foi identificada neste projeto; testes *in vitro* da dose de ácido tânico e carvão ativado de forma separada para cada veneno (que não foi feito neste projeto pela limitação de quantidade de veneno).

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a implantação da técnica de hemoperfusão em ratos foi exitosa, em que pese o impacto sobre a redução de plaquetas. Os cartuchos de hemoperfusão mostraram-se promissores uma vez que o veneno de *C. d. terrificus* é o de maior letalidade. Sugere-se que os cartuchos confeccionados *in house* sejam repensados em suas quantidades de carvão ativado e ácido tânico para melhorar sua eficácia contra variações de proteínas presentes nos venenos ofídicos. Finalmente, antiveneno específico foi acertado para atuar como controle de eficácia nesta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL C.F.S.; REZENDE N.A.; PEDROSA T.M.G.; da SILVA O.A.; PEDROSO, E.R.P. Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 288-292, 1988.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.
- BATINA, M.F.C.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V. Methodological care in the evaluation of the LD50 and of the neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by the plant *Peschiera fuchsiaeifolia* (Apocynaceae). **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 1997.
- BERNARDE, P.S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. São Paulo: Anolisbook, 224, p. 117-118, 2014.
- BICUDO P.L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In: Barraviera B. (Ed.), **Venenos Animais: uma visão integrada**. EPUC, Rio de Janeiro, p. 375-387, 1994.
- BICUDO, P.; BIONDO, A. Acidentes ofídicos atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ. UNESP, Botucatu, SP, no período de 1972 a 1989. Estudo retrospectivo. In: **Anais da Mostra de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, UNESP, Botucatu, São Paulo, 1992.
- BRANDÃO, L.F.G.; COSTA, C.M.D.; LACERDA, D.P.; SIQUEIRA, J.M. Controle de qualidade do ácido tântico de algumas farmácias de manipulação de Campo Grande (MS), Brasil. **Rev. Eletrônica Farm.**, v. 5, n. 3, p. 33-38, 2008.
- BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, p. 26, 2001.
- BUENO, L.G.F.; LEITE, G.B.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Effects of manganese ( $Mn^{2+}$ ) on neurotoxic and myotoxic activities induced by *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms in chick biventer cervicis preparations. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 2, p. 479-499, 2007.
- CAMARGO, T.M.; NAZATO, V.S.; SILVA, M.G.; COGO, J.C.; GROOPPO, F.C.; OSHIMA-FRANCO, Y. *Bothrops jararacussu* venom-induced neuromuscular blockade inhibited by *Casearia gossypiosperma* Briquet hydroalcoholic extract. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 16, n. 3, p. 432-441, 2010.
- CASTELLO BRANCO, A.C.S.; DINIZ, M.F.F.M.; DE ALMEIDA, R.N.; SANTOS, R.B.; DE OLIVEIRA, K.M.; RAMALHO, J.A. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **R. Bras. Ci. Saúde**, v.15, n. 2, p. 209-214, 2011.

CHANG T.M. Haemoperfusions over microencapsulated adsorbent in a patient with hepatic coma. **Lancet**, v. 2, n. 7791, p. 1371-1372, 1972.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M.G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; et al. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. **Phytother. Res.**, v. 22, n. 6, p. 784-790, 2008.

COLLAÇO, R.C.O.; COGO, J.C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ROCHA, T.; OSHIMA-FRANCO, Y.; RANDAZZO-MOURA, P. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 614-622, 2012.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic basis of disease**. ed. Philadelphia, Saunders Company, p. 1400, 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Executive Summary Prepared for the June 27, 2013, **Meeting of the Gastroenterology and Urology Devices Panel Classification of Sorbent Hemoperfusion Systems**. p. 37, 2013.

FERRAZ, M. C.; PARRILHA, L.A.C.; MORAES, M.S.D.; FILHO, J.A.; COGO, J.C.; SANTOS, M.G.; et al. The effect of lupane triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the *in vitro* neuromuscular blockade and myotoxicity of two Snake Venoms. **Curr. Org. Chem.**, v. 16, n. 22, p. 2717-2723, 2012.

HARKNESS, S.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. São Paulo, Livraria Roca Ltda, 3. ed., p. 238, 1993.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 417, 1993.

KUPPUSAMY, U.R.; DAS, N.P. Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. **Pharmacol. Toxicol.** v. 72, n. 4-5, p. 290-295, 1993.

MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F.; RESENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S. Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.4, n. 28, p. 228-233, 1986.

MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFIM, M.R.; ARAUJO, A.A.S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal do Sergipe. **Sci. Plena**, v. 8, n. 4, p.1-6., 2012.

MELO, R. S.; FARRAPO, N.M.; ROCHA JUNIOR, D.S.; SILVA, M.G.; COGO, J.C.; DAL BELO, C.A.; et al. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In: KELLER, R. B. (Ed.). Nutrition and diet research progress series - **Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources**. New York: Nova Science Publishers, Inc, p. 249-262, 2009.

OSHIMA-FRANCO, Y.; ALVES, C.M.V.; ANDRÉO-FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A.C.O.; LEITE, G.B.; et al. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a

hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga) **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 4, p. 465-478, 2005.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin - I. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 12, p. 1832-1839, 2000.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crototoxin. **Toxicology**, v. 37, n. 10, p. 1341-1357, 1999.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; CARDOSO, D.F.; HYSLOP, S.; GIGLIO, J.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neutralization of the pharmacological effects of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom by crototoxin antiserum and heparin. **Toxicology**, v. 39, n. 10, p. 1477-1485, 2001.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; DAL BELO, C.A.; HYSLOP, S.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CINTRA, A.C.O.; et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 95, n. 4, p. 175-182, 2004.

OSHIMA-FRANCO, Y.; LEITE, G.B.; VALÉRIO, A.A.; HYSLOP, S., ANDRIAOSCARSO, S.; GIGLIO, J.R.; et al. Rabbit antivenom efficacy against myotoxic and neurotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 8, n. 2, p. 226-243, 2002.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 1, n. 47, p. 24-29, 2001.

PITHAYANUKUL, P.; RUENRAROENGSAK, P.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R.; SAEN-ONN, S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, n. 3, p. 527-533, 2005.

PITHAYANUKUL, P.; RUENRAROENGSAK, P.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRL, R. *In vitro* investigation of the protective effects of tannic acid against the activities of *Naja kaouthia* venom. **Pharmacol. Biol.**, v. 45, n. 2, p. 94-97, 2008.

PUEBLA, P.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L.M.; DOS SANTOS, M.G.; DA SILVA, R.V.; RUBEM-MAURO, L.; et al. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 8193-8204, 2010.

RANDAZZO-MOURA, P.; LEITE, G.B.; SILVA, G.H.; PAFFARO JUNIOR W.; CINTRA, A.C.O.; CRUZ-HÖFFLING, M.A.; et al., A study of the myotoxicity of bothropstoxin-I using manganese in mouse phrenic nerve-diaphragm and extensor digitorum longus preparations. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 23, n. 2, p. 237-246, 2006.

- ROMMES, J. H. Hemoperfusion, indications and side-effects. In: Arch. Toxicol. (H.M. Bolt et al. (eds.) **Medical Toxicology**, v. 15, p.40-49, 1992.
- ROSA, L.J.R.; SILVA, G.A.A.; AMARAL FILHO, J.; SILVA, M.G.; COGO, J.C.; GROPPPO, F.C.; et al. The inhibitory effect of *Camellia sinensis* extracts against the neuromuscular blockade of *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Venom Res.**, v. 1, p.1-7, 2010.
- ROSTELATO-FERREIRA, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Heparin and commercial bothropic antivenom against the paralyzing effect of *Bothrops jararacussu* snake venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 16, n. 1, p. 34-45, 2010.
- RYAN, C.J.; COURTNEY, C.B.; WOOD, R.G.; BLUMGART, L.H. Activated charcoal haemoperfusion via an extracorporeal circuit in the unrestrained and unanaesthetized rat. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 60, n. 4, p. 400-410, 1979.
- SANGIORGIO, F.; SAKATE, M.; NOGUEIRA, R.M.B.; ARAÚJO JUNIOR, J.P.; CHAVES-OLORTEGUI, C. Kinetics of venom and antivenom serum levels, clinical evaluation and therapeutic effectiveness in dogs inoculated with *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 14, n.1, p. 100-112, 2008.
- SIA, F.Y.; VEJAYAN, J.; JAMUNA, A.; AMBU, S. Efficacy of tannins from *Mimosa pudica* and tannic acid in neutralizing cobra (*Naja kaouthia*) venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 17, n. 1, p. 42-48, 2011.
- SOARES, A.M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C.A.; LEITE, G.B.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; et al. Mn<sup>2+</sup> ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin- I, a myotoxic Lys49 phospholipase A 2 homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, n. 6, p. 668-677, 2002.
- STEFANINI, D.L. Estatística de mortalidade em sete fazendas localizadas nos municípios de São Manuel, Presidente Alves, Botucatu, Anhembi e Bento de Abreu, no período de 1973 a 1991. (Dados não publicados). (Cit. Bicudo 1994), 1991.
- TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes offídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 2, p. 55-68, 2006.
- VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a "era do teste DL50" - Acute toxicity evaluation: strategies post "DL50 test era". **Rev. Eletrônica Farm.**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.
- VITAL BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. **J Formos. Med. Assoc.**, n. 71, p. 394-400, 1972.
- YATZIDIS, H. **Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association**, v. 1, p. 83, University of New Castle upon Tyne, 1964.
- YOSHIDA, V.M.H.; CAVALCANTE, R.L.; CAMPANHOLI, J.; ARANHA, E.F.C.; OLIVEIRA, M.E.; YOSHIDA, E.H.; et al. Development and Preliminary Assessment of

Hemoperfusion Cartridge with Tannic Acid for Toxic Proteins' Precipitation: An In Vitro Model. **RABM**, v. 2, p. 62-70, 2016.

WEISS, J.; TAYLOR, G.R.; ZIMMERMANN, F.; NEBENDAHL, K. Collection of Body Fluids. In: **The Laboratory Rat** (Krinke, G.J., ed.), p. 485-510, 2000.

WINCHESTER, J. F. Active Methods for Detoxification: Oral Sorbents, Forced Diuresis, Hemoperfusion, and Hemodialysis. In: HADDAD, L.M., WINCHESTER, J.F. (Ed.). **Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose**. Philadelphia, Saunders, 1990.

## **ANEXO A - PARECER DO CEUA**

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CEUA-UNISO**

**PARECER**

<b>Protocolo nº 031/2014</b>
<b>Interessado (a): Yoko Oshima Franco e Jéssica Campanholi</b>
<b>Orientador (a): Yoko Oshima Franco</b>
<b>Titulo do Projeto: Desenvolvimento de cartucho com ácido Tanico/taninos (provenientes de plantas medicinais) para hemoperfusor como tratamento alternativo a acidentes ofídicos graves.</b>
<b>Título do Experimento:</b> o mesmo

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

**APROVADO.**

**APROVADO com RECOMENDAÇÃO**, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

**COM PENDÊNCIA**, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

**REPROVADO**

*Manifestação do Parecerista:*

Favor trocar a capa do formulário que esta indicando ano errado. O projeto esta ok

Nome: Renata de Lima

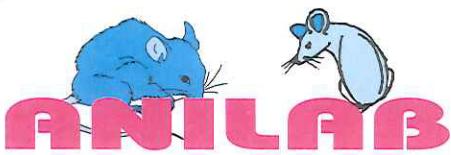
Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 24/02/2015

\* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail [ceua@uniso.br](mailto:ceua@uniso.br) e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

**ANEXO B - ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL**



Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. - EPP  
CNPJ (MF) 65.440.612/0001-40 - INSC. EST.: 513.020.551.116  
CRMV - SP - 17018/J - CIAEP/CONCEA Nº 01.0264.2014

Paulínia, 22 de Janeiro de 2016.

## ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL

Atesto para os devidos fins que os Ratos wistar procedentes deste estabelecimento, constantes na Nfe 003903 estão em perfeitas condições de saúde e livres de doenças infecto-contagiosas, cumprindo-se, dessa forma, o que determinam os dispositivos legais vigentes, no que se referem às exigências sanitárias para o deslocamento dos animais.

Outrossim, informo que os referidos animais são provenientes de matrizes igualmente saudáveis e isentas de quaisquer tipos de tratamento medicamentoso ou por meio de vacinas.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Devanir Perecini  
Médico Veterinário  
CRMV-SP 32825



Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. - EPP  
CNPJ (MF) 65.440.612/0001-40 - INSC. EST.: 513.020.551.116  
CRMV - SP - 17018/J - CIAEP/CONCEA N° 01.0264.2014

Paulínia, 20 de junho de 2016.

## ATESTADO DE SANIDADE ANIMAL

Atesto para os devidos fins que os Ratos Novergicus wistar e camundongos swiss procedentes deste estabelecimento e constantes na Nota Fiscal eletrônica 004127 estão em perfeitas condições de saúde e livres de doenças infecto-contagiosas, cumprindo-se, dessa forma, o que determinam os dispositivos legais vigentes, no que se referem às exigências sanitárias para o deslocamento dos animais.

Outrossim, informo que os referidos animais são provenientes de matrizes igualmente saudáveis e isentas de quaisquer tipos de tratamento medicamentoso ou por meio de vacinas.

Atenciosamente,

Emerson Perecini  
Médico Veterinário  
CRMV-SP 36906

**ANEXO C - RATS HEMOPERFUSION: EXPERIMENTAL MODEL FOR THE  
*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* SNAKE VENOM REMOVAL.**

E-ISSN: 2378-654X

Recent Advances in Biology  
and Medicine

# Original Research Article

Development and Preliminary  
Assessment of Hemoperfusion  
Cartridge with Tannic Acid for  
Toxic Proteins' Precipitation:  
An In Vitro Model

HATASO, USA

# Development and Preliminary Assessment of Hemoperfusion Cartridge with Tannic Acid for Toxic Proteins' Precipitation: An In Vitro Model

**Valquíria Miwa Hanai Yoshida<sup>1</sup>, Roberta Lima Cavalcante<sup>2</sup>, Jessica Campanholi<sup>2</sup>, Élvio Franco de Camargo Aranha<sup>3</sup>, Maximilian Estevan Oliveira<sup>4</sup>, Edson Hideaki Yoshida<sup>4</sup>, Yoko Oshima-Franco<sup>2,4,\*</sup>**

<sup>1</sup>Biomaterials and Nanotechnology Laboratory, University of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Veterinary Medicine Course, University of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Institute Dante Pazzanese of Cardiology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, University of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil.

**\*Correspondence:** yoko.franco@prof.uniso.br

**Received: Jul 4, 2016; Accepted: Aug 7, 2016; Published: Sep 11, 2016**

## **Abstract**

Charcoal hemoperfusion (CHP) is one of the extracorporeal removal techniques that are used to remove toxins from the body. CHP generally is considered the preferred method for extracorporeal extraction of several toxins—toxins that are adsorbed by activated charcoal. Assessments of the tannic acid's protective effects on ophidian poisoning are associated with the toxic proteins' precipitation by tannic acid. The challenge in treating a snakebite lies in removing the injected poison with minimal damage to blood constituent proteins. An alternative is CHP, and this investigation proposed to develop a column for hemoperfuser cartridge, combining charcoal granules trapped between layers of polymeric material conjugated to tannic acid, using an in vitro model scaled to the Wistar rat, which can be tested in an animal model. The cartridge was evaluated using the 2<sup>2</sup> full factorial design, in duplicate, as a method to study the effects of granulated-charcoal size and tannic acid concentration on the hematologic profile (platelet and leukocyte counts) and biochemical profile (total serum protein and albumin dosages) of sheep blood. The results demonstrate that charcoal in hemoperfuser cartridge: (1) decreases the serum in sheep blood volume, as consequence, (2) increases the serum proteins' concentration, and (iii) exerts slight influence on albumin. The inclusion of tannic acid in hemoperfuser column precipitates some of serum proteins and albumin, decreasing their concentrations in the plasma serum. In conclusion, based on these effects we can suggest the use of 0.02 g tannic acid concentration and 8–20 mesh granulated charcoal in hemoperfuser cartridge for precipitating toxic proteins from snake venoms.

**Keywords:** Charcoal granules; Hemoperfusion; Snake venom; Tannic acid.

## **1. INTRODUCTION**

Charcoal hemoperfusion (CHP) is one of the extracorporeal removal techniques that are used to eliminate toxins from the body [1, 2]. According to the Toxic Exposure Surveillance System (TESS), developed by American Association of Poison Control Centers, the number of patients who received hemoperfusion (normalized per million calls) decreased from 53 to 12 during 1985–2005. Theophylline was the most common toxin removed by hemoperfusion from 1985 to 2000, but carbamazepine became the most frequent toxin removed during 2001–2005 [1].

CHP is a method in which blood circulates through an activated charcoal-containing cartridge added to the circuit of a hemodialysis (HD) machine. CHP generally is considered the preferred method for extracorporeal extraction of several toxins—toxins that are adsorbed to activated charcoal [3, 4]. Like HD, CHP is very effective for toxins that are distributed in a small volume. Unlike HD, it can effectively remove toxins that are bound to plasma proteins [4].

Kuppusamy and Das [5] showed the protective effects of tannic acid and its related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. Pithayanukul *et al.* [6], reported in vitro investigation of the protective effects of tannic acid against the action of *Naja kaouthia* venom. Melo *et al.* [7] demonstrated the effectiveness of tannic acid in precipitating the constituent proteins of the complex mixture of snake venom (*Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus terrificus*).

The challenge in treating snakebite lies in removing the active poison with minimal damage to blood constituent proteins, which makes tannic acid intravenous administration not optional, even if the acid is able to precipitate the poison's proteins. An alternative to this method is CHP, and in this project, we proposed to develop a column for hemoperfuser cartridge, combining activated charcoal granules trapped between layers of semi-permeable polymeric material conjugated to tannic acid, in an in vitro model scaled to the Wistar rat, which can be tested in an animal model.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Materials**

The materials used are tannic acid (Sigma-Aldrich®, lot MKBV0516V), sheep blood (NewProw Prod Lab, lot 16318M), sodium heparin (5000 UI/mL, Cristália, lot 14107351), activated charcoal—4–8 mesh (Sigma-Aldrich®, lot SLBH5329V) and 8–20 mesh

(Sigma-Aldrich®, lot MKBR2258V), 5 mm thickness and 23 g/mL density polyurethane filter (Junseal®), 5 mL polypropylene syringe (BD Luer-LokTip™ Plastipak™), capillary hemoperfusion tube (Silastic® RX-50), sterile saline solution 0.9 % (JP, lot 16715), albumin monoreagent (Bioclin®, K040, lot 125), total protein monoreagent (Bioclin®, K031, lot 134), and normal and pathological controls—Biocontrol N (Bioclin®, K073, lot 52) and Biocontrol P (Bioclin®, K074, lot 39), respectively.

## 2.2. Cartridge Development

Charcoal granules are contained between two polyurethane polymer filter and into a 5 mL polypropylene syringe—specially modified (*made in house*). A mass of 0.01 or 0.02 g (Ohaus, Explorer, USA) of tannic acid impregnated on the tannic acid polymer filter column was kept in the oven (37°C) with air circulation (Tecnal®, TE-394, Piracicaba, Brazil). Carbon granules were pre-washed with ultrapure water obtained from Purelab Option-Q Elga Milli-Q system, AV50, Araraquara, Brazil. The polyurethane membranes and syringes were cut, properly washed, and dried but not sterilized. The column was prepared with 2.50-2.75 mL of heparin and 0.9 % sodium chloride solution (1000 U/100 mL) after washing with 100 mL of heparinized saline. The active carbon granules are available commercially in different diameters, 4-8 mesh, and 8-20 mesh. Thus, it is possible to evaluate the effect of the charcoal granules' size in hemoperfusion and to select the best feature with bead diameter to compose the column under development. Each column received a mass of 1.42 g of activated carbon, as suggested in the work of Ryan *et al.* [8]. A column without treatment with tannic acid was built to be used as a reference. The system, including the column and polyurethane filters, was sterilized using ethylene oxide (Sterileno, Sorocaba, Brazil).

## 2.3. Simulated Hemoperfusion

An *in vitro* experiment of the simulated hemoperfusion is illustrated in Figure 1. Sheep blood was used to mimic the hemoperfusion, and the experiments were repeated by changing the activated carbon column and tannic acid in the multivariate experimental design. The blood was injected at a constant flow rate (3 mL/min) (Terumo Medical, TE-135, Brazil) in the hemoperfuser column test. The factors of interest for the development of hemoperfuser column study were varied as set out in selected design of experiments.

## 2.4. Analysis of Results

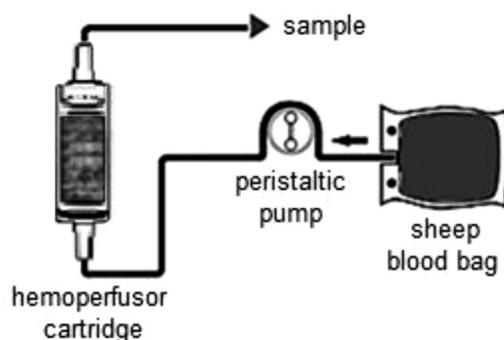
In order to evaluate the cartridge, the 2<sup>2</sup> full factorial design was selected in duplicate as a multivariate method to study the factors (average diameter of granulated charcoal and the amount of tannic acid which makes up the premembrane of the column for hemoperfusion), effects on the hematologic profile—platelet count (PLT) and white blood cells or leukocyte (WBC)—and effects on the biochemical profile—total serum protein (SP) and albumin (ALB) dosages in the sheep blood. The serum proteins' components were represented by the total SP, all protein fractions, and the ALB fraction.

Assays were performed in random order to avoid the occurrence of distortion in the statistical results. The effects of the main factors and the interaction's effects were calculated using the software Action Stat 3.1, as well as using ANOVA, variance, standard error, standard error of an effect, and a model of an independent test, providing data sufficient for the interpretation of the results. With the standard error, we can construct confidence intervals for the values of the effects, using the Student distribution ( $\hat{\eta} - t_{\nu} \times s(\text{effect}) < \eta < \hat{\eta} + t_{\nu} \times s(\text{effect})$ ), where  $\eta$  is the true value of an effect, that is, population and the caret indicates an estimated value obtained in this experiment. According to this equation, we only considered statistically significant with 95 % confidence an effect whose absolute value was greater than  $t_{\nu} \times s(\text{effect})$  [9].

Hematologic profile was obtained by the hematological system (Roche®, Sysmex XS-1000i, Kobe, Japan) which provides platelet count (PLT) and total leukocyte count (WBC) of heparinized sheep blood, and commercial blood was used as control (Echeck). Blood samples were collected before and after simulated hemoperfusion [10].

Biochemical profile was obtained using Biuret (BIU) and bromocresol green (BCG) colorimetric tests. These tests were used to determine the total serum protein (SP) and albumin (ALB), respectively, with spectrophotometric readings (Perkin Elmer,

**Figure 1: Simulated hemoperfusion illustration.**



lambda 35, Brazil). As serum controls, the biocontrol kits N (normal) and P (pathological) were used. Three vials—B (baseline), S (sample), ST (standard)—were identified and followed in the procedure as shown in Table 1.

In the biuret method, tubes B, S, ST, and the normal (N) and pathological (P) controls were homogenized on the vortex and left to stand for 10 min. Further, a spectrophotometer B was used as a baseline, and analyses were taken at the wavelength 545 nm (absorbance), while the colors of the samples S, ST, N and P were stable (30 min). For calculations:

$$SP(g/dL) = \frac{\text{Sample Absorbance}}{\text{Standard Absorbance}} \times 4$$
. As the reaction follows the Lambert-Beer Law, the calibration factor can be used (Equation (1)), and SP concentration was calculated by Equation (2).

$$\text{Calibration Factor} = \frac{\text{Standard Concentration (4 g/dL)}}{\text{Standard Absorbance (nm)}} \quad (1)$$

$$SP \text{ Concentration (g/dL)} = \text{Sample Absorbance} \times \text{Calibration Factor} \quad (2)$$

For the N batch used, the value of the concentration of SP was 5.3 g/dL, with a variation range set between 4.5 to 6.1 g/dL, and the P batch used an SP concentration of 8.8 g/dL, with a variation range set between 7.9 to 9.7 g/dL.

In the VBP test tubes, B, S, ST, and the N and P controls were homogenized by vortexing and left to stand for 5 min. Further, in a spectrophotometer, B was used as a baseline, and readings were taken at 630 nm, while the colors of the samples S, ST, N and P were stable (30 min). For calculations:  $ALB(g/dL) = \frac{\text{Sample Absorbance}}{\text{Standard Absorbance}} \times 3.8$ . As the reaction follows the Lambert-Beer Law, the calibration factor can be used (Equation (3)), and SP concentration was calculated by Equation (4).

$$\text{Calibration Factor} = \frac{\text{Standard Concentration (3.8 g/dL)}}{\text{Standard Absorbance (nm)}} \quad (3)$$

$$ALB \text{ Concentration (g/dL)} = \text{Sample Absorbance} \times \text{Calibration Factor} \quad (4)$$

For the N and P batches, the values of ALB concentration were 2.8 and 4.5 g/dL, with a variation range set between 2.4 and 3.2 g/dL and between 4.0 and 5.0 g/dL, respectively.

### 3. RESULTS

The development of hemoperfuser-column design and assembly of the columns have been successfully made.

#### 3.1. Hematologic and Biochemical Profiles

Hematologic profile (HP) of the sheep blood is represented by platelet count (PLT) and total leukocyte count (WBC), whereas these same tests were performed for all treated samples of sheep blood by simulated hemoperfusion in this study.

The biochemical methods—biuret to determine SP and bromocresol green to determine ALB—were validated for sheep blood in the spectrophotometer, and the results can be checked from the data in Table 2. SP values concentrations obtained were 5.37 and 8.86 g/dL for the N and P batches used, respectively, and ALB values of the concentration obtained were 2.91 and 3.90 g/dL for N and P batches used, respectively.

HP analysis results are showed in the Tables 3-5 by PLT and WBC values to sheep blood before and after simulated hemoperfusion.

Values of protein fractions concentrations—SP and ALB—for sheep blood treated by simulated hemoperfusion, initially without tannic acid and subsequently with tannic acid are exhibited on Table 4.

**Table 1: Procedure for testing biuret and green bromocresol (BCG) methods in test tubes B (baseline), S (sample) and ST (standard), separately.**

Biuret method			
	B	ST	S
S	...	...	50 µL
ST	...	50 µL	...
Biuret	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
BCG method			
S	...	...	10 µL
ST	...	10 µL	...
BCG	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL

**Table 2: Serum protein (SP) values in the BIU method and albumin (ALB) values in the BCG method.**

Assay	BIU method			BCG method		
	Absorbance ( $\lambda = 545 \text{ nm}$ )	SP <sub>Mean</sub> (g/dL)	FC <sub>BIU</sub>	Absorbance ( $\lambda = 630 \text{ nm}$ )	ALB <sub>Mean</sub> (g/dL)	FC <sub>BCG</sub>
ST <sub>1</sub>	0.233			0.417		
ST <sub>2</sub>	0.234	Mean 0.233	...	0.430	Mean 0.424	
ST <sub>3</sub>	0.233		17.17	0.424	...	8.96
N <sub>1</sub>	0.313	Mean 0.313	5.37	0.323	Mean 0.325	2.91
N <sub>2</sub>	0.312		...	0.327		...
P <sub>1</sub>	0.513	Mean: 0.516	8.86	0.434	Mean: 0.435	3.90
P <sub>2</sub>	0.519		...	0.435		...
S <sub>1</sub>	0.409			0.372		
S <sub>2</sub>	0.408	Mean 0.409	7.02	0.374	Mean 0.372	3.33
S <sub>3</sub>	0.411		...	0.370		...

Sheep blood sample (S), standard (ST), normal control (N), and pathological control (P).

**Table 3: Platelet count (PLT) and leukocyte count (WBC) in sheep blood before the simulated hemoperfusion ( $n = 5$ ).**

HP	Assay						Mean $\pm$ DP
	1	2	3	4	5	6	
PLT ( $10^3/\mu\text{L}$ )	225	226	212	222	223	231	223.17 $\pm$ 6.31
WBC ( $10/\mu\text{L}$ )	5.07	5.23	5.51	5.49	5.66	6.03	5.50 $\pm$ 0.34

**Table 4: Platelet count (PLT), leukocyte count (WBC) and protein fractions concentrations in sheep blood.**

Assay in drawn order	Assay order	Granulated charcoal (mesh)	Tannic acid (g)	PLT Mean ( $10^3/\mu\text{L}$ )	WBC Mean ( $10/\mu\text{L}$ )	SP Mean (g/dL)	ALB Mean (g/dL)
After the simulated hemoperfusion without tannic acid ( $n = 3$ )							
4	1	8-20	0	275	5.83	11.15	3.53
3	2	4-8	0	272	5.87	11.07	3.55
2	3	8-20	0	264	5.69	10.93	3.51
1	4	4-8	0	269	5.73	10.88	3.51
After the simulated hemoperfusion with two levels of tannic acid ( $n = 3$ )							
4	1	8-20	0.02	216	5.84	7.28	1.86
4	2	8-20	0.02	221	6.03	7.26	1.81
3	3	4-8	0.02	224	5.85	7.35	1.99
2	4	8-20	0.01	213	6.07	7.13	2.02
1	5	4-8	0.01	211	5.92	7.10	1.98
3	6	4-8	0.02	224	5.67	7.44	2.05
2	7	8-20	0.01	206	5.86	7.33	2.06
1	8	4-8	0.01	212	5.56	7.31	1.96

### 3.2. 2<sup>2</sup> Full Factorial Design in Duplicate

Results of the influence of factors—charcoal granule size and amount of tannic acid—were evaluated by the effects on the PLT, WBC, SP, and ALB amounts after treatment by simulated hemoperfusion with 4 mL of sheep blood. Total serum protein was represented by SP and ALB, thus enabling the calculation of the main effects and interaction of factors selected for this study, summarized in Tables 5 and 6.

In Table 5, the results of the effects (PLT, WBC, PS and ALB) were considered statistically significant, with 95 % confidence, when the absolute value was greater than its respective  $t_{4} \times s(\text{effect})$ . But by ANOVA analysis only the concentration of tannic acid had significant difference compared to the model tested for PLT (P-value  $\approx 0.008$ ), and the concentration of tannic acid and interaction effects showed a significant difference for ALB (P-values  $\approx 0.03$  and 0.005, respectively).

**Table 5: Results of 2<sup>2</sup> full factorial design in duplicate to study the effects of the diameter of granulated charcoal and amount of tannic acid from hemoperfusion column after simulated hemoperfusion.**

Factors				(-)	(+)		
1 Granulated charcoal (mesh) 2 Tannic acid (g)				4-8 (A) 0.01	8-20 (B) 0.02		
i	1	2	12	HP			
				PLT <sub>Mean</sub> (10 <sup>3</sup> /μL)	WBC <sub>Mean</sub> (10/μL)		
1	-	-	+	211.50	5.74		
2	+	-	-	209.50	5.97		
3	-	+	-	224.00	5.76		
4	+	+	+	218.50	5.94		
Effects				PLT ± s(effect) (10 <sup>3</sup> /μL)	WBC ± s(effect) (10/μL)		
1	Main			-3.75 ± 1.08	0.200 ± 0.06		
2	Main			10.75 ± 1.08	-0.005 ± 0.06		
12	Interaction			-1.75 ± 1.08	-0.025 ± 0.06		
<i>t</i> <sub>4</sub> × s(effect)				2.998	0.171		
					0.106		
					0.031		
SP <sub>Mean</sub> (g/dL)							
ALB <sub>Mean</sub> (g/dL)							

Experimental assay (i), hematologic profile (HP), platelet count (PLT), leukocyte count (WBC), serum protein (SP), albumin (ALB) and estimate, with four degrees of freedom in the Student's t distribution and 95 % confidence, the standard error of an effect (*t*<sub>4</sub> × s(effect)).

**Table 6: Results of 2<sup>2</sup> full factorial design in duplicate to study the effects of the diameter of granulated charcoal and presence of tannic acid from hemoperfusion column after simulated hemoperfusion.**

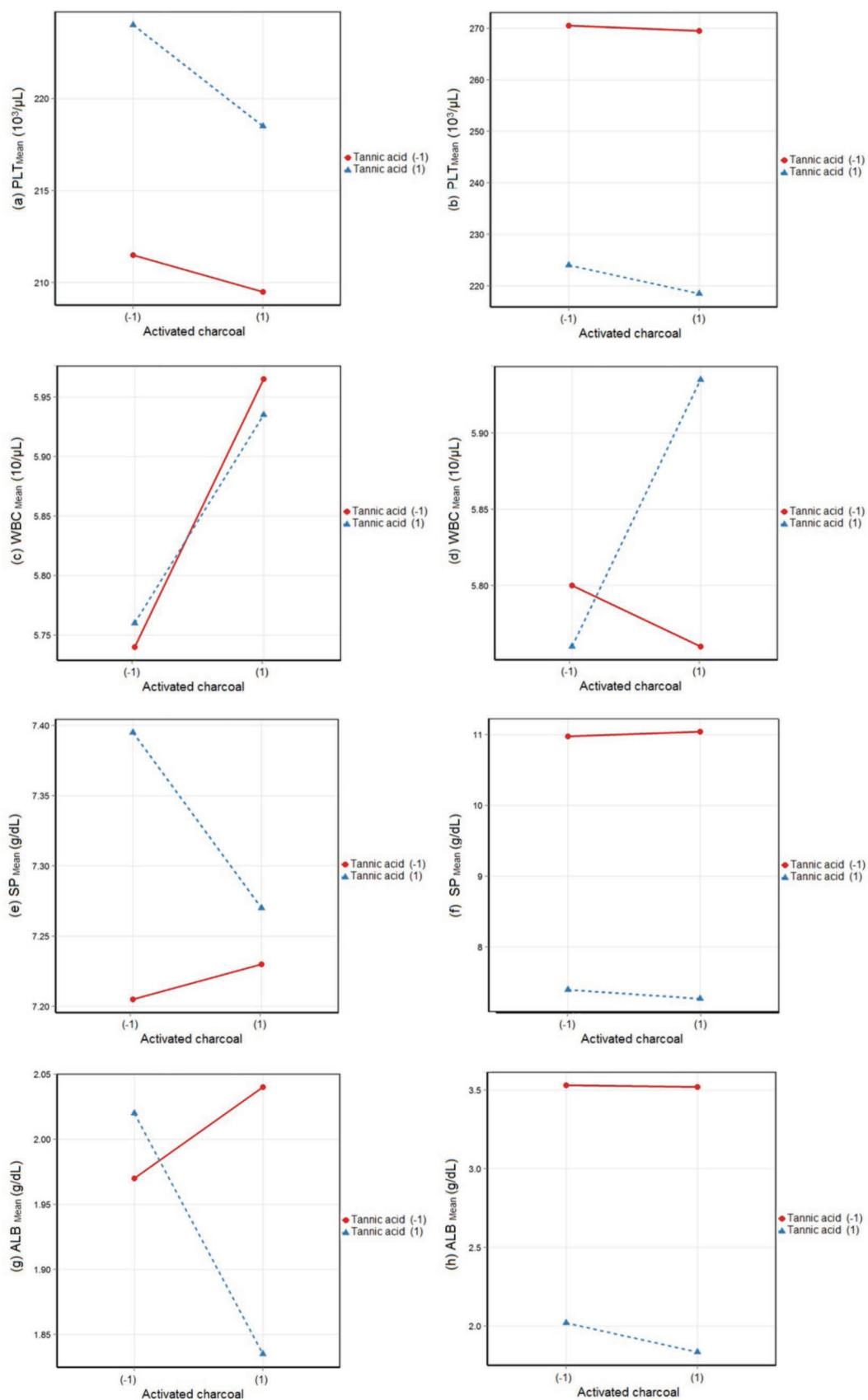
Factors:				(-)	(+)		
1: Granulated charcoal (mesh) 2: Tannic acid (g)				4-8 (A) 0	8-20 (B) 0.02		
i	1	2	12	HP			
				PLT <sub>Mean</sub> (10 <sup>3</sup> /μL)	WBC <sub>Mean</sub> (10/μL)		
1	-	-	+	270.50	5.80		
2	+	-	-	269.50	5.76		
3	-	+	-	224.00	5.76		
4	+	+	+	218.50	5.94		
Effects:				PLT ± s(effect) (10 <sup>3</sup> /μL)	WBC ± s(effect) (10/μL)		
1	Main			-3.25 ± 1.56	0.07 ± 0.04		
2	Main			-48.75 ± 1.56	0.07 ± 0.04		
12	Interaction			-2.25 ± 1.56	0.11 ± 0.04		
<i>t</i> <sub>4</sub> × s(effect)				8.640	4.320		
					0.114		
					0.106		
SP <sub>Mean</sub> (g/dL)							
ALB <sub>Mean</sub> (g/dL)							

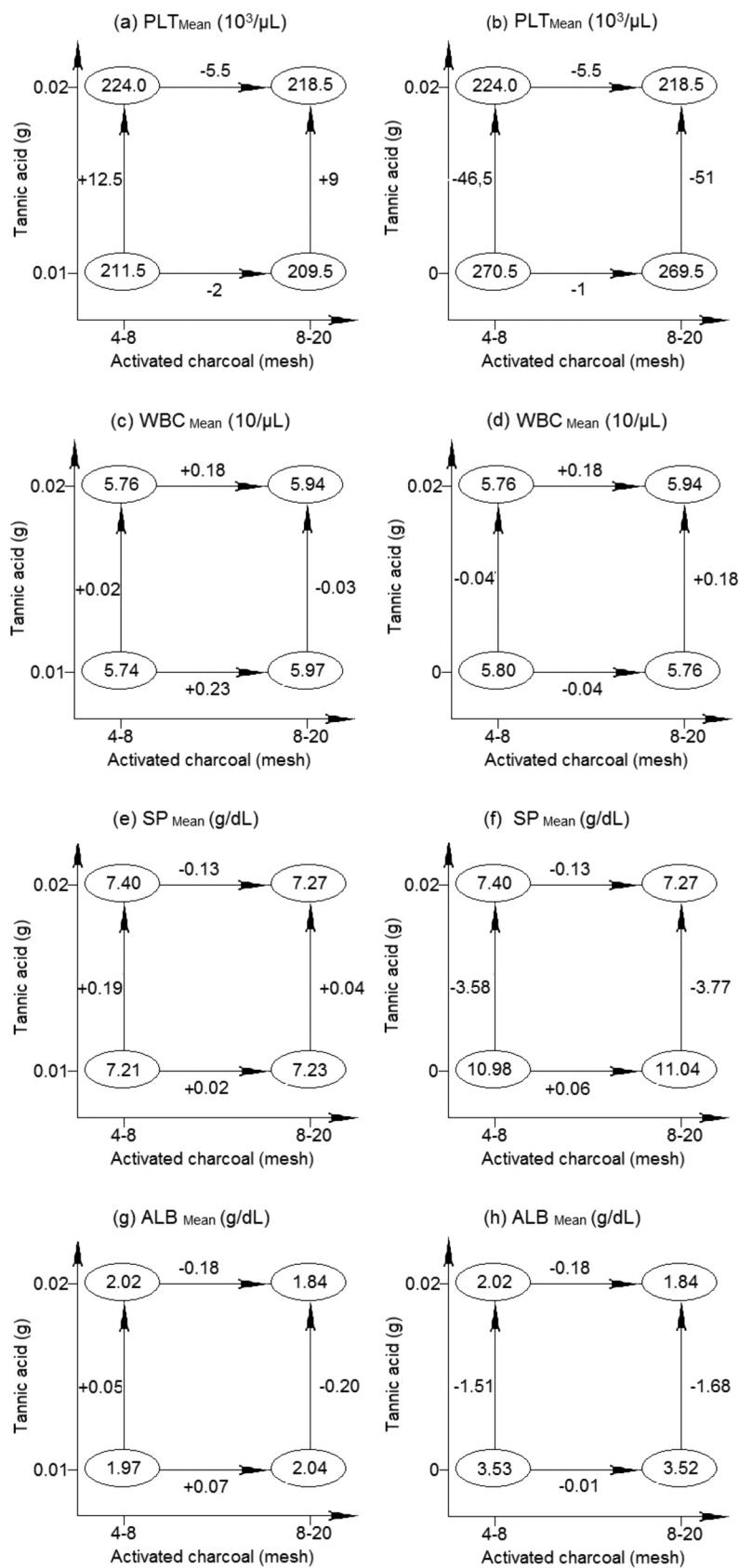
Experimental assay (i), hematologic profile (HP), platelet count (PLT), leukocyte count (WBC), serum protein (SP), albumin (ALB) and estimate, with four degrees of freedom in the Student's t distribution and 95 % confidence, the standard error of an effect (*t*<sub>4</sub> × s(effect)).

Similarly, in Table 6 were considered statistically significant, with 95 % confidence, the effects (PLT, WBC, SP and ACB) whose absolute value was greater than their respective *t*<sub>4</sub> × s(effect). But by ANOVA analysis only the concentration of tannic acid had significant difference to the model tested for PLT ( $p \approx 9.7 \times 10^{-5}$ ) and for SP ( $p \approx 1.1 \times 10^{-6}$ ), and the granulated charcoal size, concentration of tannic acid, and interaction effects showed significant difference for ALB ( $p \approx 0.01$ ,  $2.4 \times 10^{-7}$ , and  $0.02$ , respectively). ANOVA analysis showed no significant difference in the results of all WBC assays in the Tables 5 and 6. The Durbin-Watson test of independence does not reject the hypothesis that the statistical model used for the experiments was well adjusted ( $p > 0.1$ ). Calculations of the main effects and interactions were made by determining the mean of results ( $n = 2$ ) obtained for PLT, WBC, SP, and ALB in randomized trials (Tables 5 and 6). To simplify interpretation of the results obtained in this study, interactions graphics (Figure 2) and variables, diagrams of mean responses for all levels combinations of the variables may be observed in Figure 3.

#### 4. DISCUSSION

In the assessment of the effects (Figure 2a) of the platelet count (PLT) results, the main effects whose absolute values were greater than  $t_4 \times s(\text{effect}) = 2.998 \times 10^3/\mu\text{L}$  were considered statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Table 5). Wherein the Figure 3a

**Figure 2: Interactions graphs of average responses of the variables.**

**Figure 3: Diagrams of mean responses for all levels and combinations of the variables.**

the diagram shows that: (1) by decreasing the diameter of the charcoal granule, PLT diminishes, but the effect is more pronounced with a higher concentration of tannic acid (0.02 g) than 0.01 g tannic acid. (-5.5 against -2); (2) by changing the 0.01 g tannic acid membrane to 0.02 g PLT increased, and this effect was greater for 4-8 mesh than for 8-20 mesh charcoal granule (+12.5 against +9); and (3) a smaller PLT value ( $209.4 \times 10^3/\mu\text{L}$  on average) was obtained with 0.01 g tannic acid membrane and 8-20 mesh charcoal granules, although this last effect has no significant interaction.

In this work, we evaluated the effect of the tannic acid concentration (Figure 2b) on the membrane and the interaction effect thereof with the charcoal granule size for the results of platelet counts (PLT) (Figure 3b); the absolute values of these effects were much higher than  $t_4 \times s(\text{effect}) = 4.32 \times 10^3/\mu\text{L}$  (Table 6), indicating that the use of tannic acid significantly decreased PLT ( $p << 0.05$ ) wherein: (1) the diameter of the charcoal granule did not affect PLT significantly; (2) replacing the membrane without tannic acid by 0.02 g tannic acid membrane decreased PLT, and this effect was more significant for 8-20 mesh than 4-8 mesh charcoal granule (-51 against -46.5); and (3) smaller PLT value ( $218.5 \times 10^3/\mu\text{L}$  on average) was obtained with 0.02 g tannic acid membrane and 8-20 mesh charcoal granule.

In the effects' assessment ( $p < 0.05$ ) of total leukocyte count (WBC) results, absolute values of the main effects were close to  $t_4 \times s(\text{effect}) = 0.171 \times 10^3/\mu\text{L}$  (Tables 5 and 6) show that in relation to  $t_4 \times s(\text{effect}) = 0.114 \times 10^3/\mu\text{L}$ , the effect of the tannic acid concentration in the membrane, the charcoal granule diameter, and the interaction effect with the charcoal granules size thereof was not significant in the selected experimental condition ( $p > 0.05$ ). Therefore, they are not determinative of CTL (Figures 3c and 3d); despite this, the interactions graphs, shown in Figure 2d, point to a possible interaction.

When evaluating the effects ( $p < 0.05$ ) for the concentration of serum proteins' (SP) results (Figures 2e and 2f), the absolute values of the main effects were less than  $t_4 \times s(\text{effect}) = 0.106 \text{ g/dL}$  in Tables 5 and 6; therefore, they were not significant, and the effect of the concentration of tannic acid could be considered significant (Figure 2e and Table 5), although the ANOVA  $p$  value was 0.205, demonstrating that 0.01 and 0.02 g tannic acid concentrations had no significant difference in PS. However, the presence of tannic acid is significant for PS (Table 6 and Figure 2f), wherein the largest SP values (7.40 and 11.04 g/dL on average in the experimental conditions in Tables 5 and 6, respectively) were obtained with 0.02 g tannic acid membrane of 4-8 mesh charcoal granules (Figure 3e) and with a membrane without tannic acid of 8-20 mesh charcoal granules (Figure 3f). Therefore, there is evidence that SP decreases with increasing concentration of tannic acid. This is important to achieve the proposed toxic-protein precipitation in ophidian venom.

In the assessment of the effects ( $p < 0.05$ ) for albumin (ALB) concentration results (Figures 3g-3h), the absolute values of the main effects and interactions effects were higher than  $t_4 \times s(\text{effect}) = 0.031 \text{ g/dL}$  in Tables 5 and 6, consequently considered significant. And (1) the charcoal granule diameter had slight influence on the ALB concentration; (2) by changing the 0.01 g tannic acid membrane by 0.02 g, ALB increased slightly to 4-8 mesh charcoal granules, and ALB decreased to 8-20 mesh charcoal granules (+0.05 against -0.2); this may be due to the smaller size granules having larger surface area thus adsorb more blood plasma; and (3) the highest ALB values (2.04 and 3.53 g/dL on average in the experimental conditions listed in Tables 5 and 6, respectively) were obtained with a membrane with low levels of tannic acid concentration, and there was slight significant influence of the charcoal granules size. Therefore, there is evidence that the ALB decreases with increasing concentration of tannic acid.

The ALB fraction was selected based on the fact that the association between serum albumin and clinical status, constituting a marker of severity; the lower serum levels were, the higher was the severity of the case [10].

Results of this research suggest that the hemoperfuser cartridge's carbon granules decrease blood plasma in sheep blood volume, thereby increasing the concentration of serum proteins and slightly influencing ALB values. The inclusion of tannic acid in hemoperfuser column precipitates some of serum proteins and albumin, decreasing their concentrations in the blood plasma.

As part of the tannic acid reacts with plasma proteins, it is suggested to increase its concentration in the hemoperfuser cartridge aiming, in future work, the precipitation of the ophidian-venom proteins.

## 5. CONCLUSION

The development of hemoperfuser column design and assembly of the columns have been successfully made. The hematologic and biochemical profile data were used as the study results of the effects of factors, charcoal granule size, and the amount of tannic acid in the column for hemoperfusion and precipitation of toxic proteins. Based on these effects, we can suggest a membrane with a concentration of 0.02 g of tannic acid and the use of 8-20 mesh granulated charcoal in hemoperfuser cartridge. Subsequently, our research group wants to investigate the precipitation of ophidian-venom proteins for animal models (Wistar rat) using the column model developed in this work.

### Author Contributions

Valquíria Miwa Hanai Yoshida invented the cartridge-column concept and wrote the manuscript. Roberta L. Cavalcante developed the tannic acid membranes. Jessica Campanholi developed the circuit of the preliminary hemoperfuser. Élvio Franco de Camargo Aranha together with Valquíria Miwa Hanai Yoshida shared the cartridge-column concept and the production of the column in large scale. Maximilian Estevan Oliveira was responsible for validation of hematological analysis using sheep blood.

Edson Hideaki Yoshida was responsible for hematological analysis and interpretation. Yoko Oshima-Franco designed the global project and helped in writing the manuscript.

#### **Source of Funding/Acknowledgement**

The authors wish to thank Scientific Initiation Program of the University of Sorocaba, PIBIC-CNPq/PROBIC-Uniso, Fapesp 2015/01420-9, and FINEP 07/2010 for financial support and Sterileno (Brazil), Bioclin (Brazil), and Junseal (Brazil) for material support.

#### **Conflict of Interest**

None.

#### **References**

1. Holubek WJ, Hoffman RS, Goldfarb DS, Nelson LS. Use of hemodialysis and hemoperfusion in poisoned patients. *Kidney Int.* 2008; 74(10):1327.
2. Winchester JF. Active methods for detoxification: oral sorbents, forced diuresis, hemoperfusion, and hemodialysis. In "Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose," 2nd ed. Editors - Haddad LM, Winchester JF; Philadelphia, PA: Saunders (1990).
3. Goldfarb DS. Principles and techniques applied to enhance the elimination of toxic compounds. In "Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 7th ed." Editors - Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, et al.; New York: McGrawHill (2002), pp: 58-68.
4. Shalkham AS, Kirrane BM, Hoffman RS, Goldfarb DS, Nelson LS. The availability and use of charcoal hemoperfusion in the treatment of poisoned patients. *Am J Kidney Dis.* 2006; 48(2):239-41.
5. Kuppusamy UR, Das NP. Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. *Pharmacol Toxicol.* 1993; 72(4-5):290-5.
6. Pithayanukul P, Ruenraroengsak P, Bavovada R, Pakmanee N, Suttisri R. *In vitro* investigation of the protective effects of tannic acid against the activities of *Naja kaouthia* venom. *Pharm Biol.* 2007; 45(2):94-97.
7. Melo RS, Farrapo NM, Rocha Junior DS, Silva MG, Cogo JC, et al. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In "Nutrition and Diet Research Progress Series—Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources." Editor - Keller RB; New York: Nova Science Publishers, Inc (2009), pp: 249-62.
8. Ryan CJ, Courtney JM, Wood CB, Hood RG, Blumgart LH. Activated charcoal haemoperfusion via an extracorporeal circuit in the unrestrained and unanaesthetized rat. *Br J Exp Pathol.* 1979; 60(4):400-10.
9. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. Como fazer experimentos: Aplicações na ciência e na indústria. 4 ed: Bookman (2010), 414 p.
10. Sysmex. XS-1000i™ Automated Hematology Analyzer. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/English/XS-1000i-English.pdf>: Sysmex America Inc.; 2012 [Document Number MKT-10-1139 01/2012 1M].

**Citation:** Yoshida VMH, Cavalcante RL, Campanholi J, Aranha ÉFC, Oliveira ME, et al. Development and preliminary assessment of hemoperfusion cartridge with tannic acid for toxic proteins' precipitation: an in vitro model. *Recent Adv Biol Med.* 2016; 2:62-70.

**ANEXO D - RATS HEMOPERFUSION: EXPERIMENTAL MODEL FOR THE  
*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* SNAKE VENOM REMOVAL.**

**RATS HEMOPERFUSION: EXPERIMENTAL MODEL FOR THE CROTALUS  
DURISSUS TERRIFICUS SNAKE VENOM REMOVAL**

<sup>1</sup>Maximilian Estevan Oliveira, <sup>2</sup>Jéssica Campanholi, <sup>2</sup>Roberta Lima Cavalcante, <sup>2</sup>Felipe Silveira Moreno, <sup>1</sup>Edson Hideaki Yoshida, <sup>1</sup>Murilo Melo Juste Dini, <sup>3</sup>Élvio Franco de Camargo Aranha, <sup>4</sup>José Carlos Cogo, <sup>5</sup>Lourdes Dias, <sup>6</sup>Valquíria Miwa Hanai Yoshida,  
<sup>1,2</sup>Yoko Oshima-Franco \*

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, University of Sorocaba (UNISO), Rodovia Raposo Tavares km 92.5, Sorocaba, SP. Zip code 18023-000, Brazil. E-Mails: maxaph@live.com; ehideakiy@gmail.com; murilo\_juste@hotmail.com

<sup>2</sup>Veterinary Medicine Course, University of Sorocaba (UNISO), Rodovia Raposo Tavares km 92.5, Sorocaba, SP. Zip code 18023-000, Brazil. E-Mails: jecampanholi@hotmail.com; roberta-cavalcante06@hotmail.com; felipe\_fsm1@hotmail.com

<sup>3</sup>Institute Dante Pazzanese of Cardiology, University of São Paulo, Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, São Paulo, SP. Zip code 04012-909, Brazil. E-Mail: elvio@smaflex.com.br

<sup>4</sup>Post-Graduate Program in Animal Production, University Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), Av. Hilário da Silva Passos, 950, Zip code 13690-000, Descalvado, SP, Brazil. E-Mail: jccogo@gmail.com

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), R. Tessália de Camargo, 126 Zip code 13083-970, Campinas, SP, Brazil. E-Mail: phdlourdes@gmail.com

<sup>6</sup>Post-Graduate Program in Technological and Environmental Processes, University of Sorocaba (UNISO), Rodovia Raposo Tavares km 92.5, Sorocaba, SP. Zip code 18023-000, Brazil. E-Mail: valquíria.yoshida@prof.uniso.br

Running title: The fundamentals of hemoperfusion

\*Correspondence to: yoko.franco@prof.uniso.br; Phone: +55-15-21010-7197. Fax: 55

15 2101-7112

## **Abstract**

The use of hemoperfusion is controversial and hemodialysis is much more familiar in the clinical practice. Hemodialysis depends on characteristics of the toxin such as lipid solubility, molecular weight, volume of distribution, protein binding, and technique used for hemodialysis. On the other hand, the toxic substance to be removed by hemoperfusion must have binding affinity to the sorbent in the cartridge and a low volume of distribution. However, the hemodialysis requires an expensive hospitalar apparatus, whereas hemoperfusion is a simpler procedure, basically depending on a good adsorbent material in the cartridge. In this work our aims were 1) to point out the parameters and challenges of hemoperfusion; and, 2) to purpose a model in rats of a hemoperfuser cartridge for the *Crotalus durissus terrificus* venom removal.

Keywords: hemoperfusion, hemoperfusion in small animals, history of hemoperfusion.

## INTRODUCTION

Hemoperfusion is an extracorporeal modality for drugs and toxins removal aiming the treatment of overdoses and intoxications [1-3]. During this purification process, the blood passes through an adsorbent material that attract toxic agents, as activated charcoal contained in a column, until the toxic amount removal [1].

In the XIX century, Thomas Graham gave the first pass in the dialytic therapy through an osmotic membrane creation, by which he was recognized in 1854 [4]. However, the first historical description of hemodialysis ascend to 1913, when Abel, Rowtree and Turner did create an experimental model with anaesthetized dogs using a tubes circuit of cellulose semipermeable membranes by where the blood passing. In order to hinder the blood coagulation these authors used hirudine as anticoagulant produced by bloodsuckers [5].

Georg Haas, a german physician, did the first human hemodialysis, in 1924. Willem Kolff, in 1943, improved the hemodialysis technology by rotating drum kidney creation [5], performing the first successful human hemodialytic treatment in an acute kidney injury patient.

Concerning to veterinary area, Butler performed the first haemodialysis in dogs at Universities of California and Purdue, in 1980. Larry Cowgill did implant at University of California the first world program of hemodialysis for pets [4]. Since 1990, a crescent technological advance has been seen in the extracorporeal techniques in pets, increasing the safety and efficacy of the therapy [6]. Nowadays, hemodialysis is every more time disponible in the clinical veterinary [5, 7].

According to Winchester (1990) [1], hemoperfusion is also a kind of dialysis, which is used as support in the treatment of kidney injury patients. This procedure is

applied in emergencial medical treatments in cases of intoxication with toxic doses for kidney, such as barbiturates. Depending on the kind of toxic substance, hemodialysis is better than hemoperfusion, as alcohol as example, avoiding the cartridge saturation. When a toxic substance is well removed from blood by both procedures, hemodialysis is the prefered procedure by also allowing the treatment of any coexisting acid-basic disturbance using a dialysis solution properly. However, hemoperfusion is the treatment of choice when drugs are bound to proteins [8].

Hemodialysis is an artificial procedure of blood filtration for removing the toxic agentes in patients who progress to chronic kidney disease stage 5 (CKD5d) and do not receive a transplant [9], through a mechanic artificial kidney, replacing the not working kidneys [10]. In this procedure, normally the blood is removed from body by a vascular access, which results in an artificial fistulae that links a superficial vein and an artery from arm, and is impelled by a pump until the mechanic filter of dialysis, contained in a machine. In this filter, the blood is put in contact with dialysis solution, isolated by a semipermeable membrane, by which occurs the change between the both liquids. After filtration, the blood is returned to patient by the same vascular access. The dialysis machine has several automatic controls similar to that existing in the organismo, such as a pressure and temperature monitor, conductivity of dialysis liquid, filtration volume, air detection, etc. [10].

Hemodialysis depends on characteristics of the toxin, i.e., lipid solubility, molecular weight, volume of distribution, protein binding, and technique used for hemodialysis [11] , whereas to be removed by hemoperfusion, the toxic substance must have binding affinity to the sorbent in the cartridge and a low volume of distribution [12].

In the veterinary area, hemoperfusion was already made in animals as dogs [13-15], pigs [16, 17], and cats [18]. This technique had one of pioneer works carried out by Ryan et al. [19] using rats, and modernly also carried out by Masuda et al. [20]. Rats used experimentally show advantages as use of small amounts of anesthetics, venoms and drugs to be assayed; costs of these animals and theirs maintainability and ease of handling. Major disadvantages are size of animal for arterial/venous system cannulation; small blood amount and need of qualified personnel.

Our objectives in this work were 1) to point out the parameters and challenges of hemoperfusion; and, 2) to evaluate the efficacy of a cartridge of hemoperfuser to removal the *Crotalus durissus terrificus* snake venom from intoxicated rats, before any renal injury development, comparatively to specific antivenom treatment. The snake venom selected in this study is one of the most medical interest in Brazil due its letality caused mainly by acute renal failure [21].

## **1. Parameters and challenges**

### **1.1. Column to hemoperfusion**

Mauer et al. [22] described a case report of a newborn (12 days) weighing 3.2 kg, accidentally intoxicated with chloranphenicol. Child was successfully treated using a column of hemoperfusion containing activated charcoal. Authors recommended the hemoperfusion technique for these specific cases of intoxication in small children.

Lehmann and Konstantin [23] were the inventors of a column to remove undesired substances from a liquid mixture, which patent was deposited by Gambro. Nowadays, Gambro markets Adsorba® C cartridges for human use that contain activated charcoal for the drugs and toxins removal, by hemoperfusion.

Columns for hemoperfusion can be filled with granules of an adsorbent material and of ionic exchange. The activated charcoal and adsorbent polymers (as examples, polystyrene with macropores bound to divinilbenzene and, if necessary, loaded with functional groups) are the more known for such purpose [23].

### **1.2. Sterilization**

Even in invasive as well as in non-invasive medical devices, disinfection and sterilization of medical facilities can ensure the safe use of these products. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities (2008) is disponibile for consulting of the most appropriate method [24]. In our study we choose 100 % ethylene oxide (ETO) since it penetrates packaging materials, device lumens; single-dose cartridge and negative- pressure chamber minimizes the potential for gas leak and ETO exposure; simple to operate and monitor, and is compatible with most medical materials, as advantages. However, ETO sterilization requires aeration time to remove ETO residue (here we applied 8 days); sterilization chamber size from 4.0-7.9 ft<sup>3</sup> total volume (varies with model type); ETO is toxic, a carcinogen, and flammable; ETO emission regulated by states but catalytic cell removes 99.9% of ETO and converts it to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O; and ETO cartridges should be stored in flammable liquid storage cabine, as disadvantages.

### **1.3. *In vitro* assays and parameters**

A cartridge containing a polyurethane polymer filter (superior) filled with activated charcoal and also limited by other polyurethane polymer filter impregnated with tannic acid (inferior) was developed and described by Yoshida et al. (2016) [25].

### **1.4. *In vivo* assays and parameters**

It is necessary to know the biological parameters of the animal to be hemoperfused. In case of male rats Wistar (*Rattus novergicus*), which possess blood volume around 7% of the weight in 100 grams [26], the reference values of hematological parameters [27], as well as the recommended doses of anesthesia (before, during and after) [28], are shown in Table 1.

Table 1. Normal hematological parameters and anesthetic schedule for male Wistar rats (*Rattus novergicus*)

Hematological Parameters [27]	Total leukocyte count ( $10^3/\mu\text{L}$ ) 5.7 – 13.9	Platelet count ( $10^3/\mu\text{L}$ ) 837 – 1455	Erythrocytes count ( $10^6/\mu\text{L}$ ) 5.0 – 7.62
Anesthetic Schedule [28]	Before  Xylazine (10 mg/kg) + Midazolam (1 mg/kg) + Ketamine (10 mg/kg)  (intraperitoneal via; i.p. via)	During  Isoflurane (inhalatory via)	After  Tramadol (5 mg/kg)  (i.p. via)

## 2. Rats hemoperfusion: a purpose of a cartridge for the *Crotalus durissus terrificus* snake venom removal

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (290 - 400 g) were supplied by Anilab (Animais de Laboratório, Paulínia, SP, Brazil). The animals were housed at  $25 \pm 3$  °C on a 12 h light/dark cycle (Smaflex®) and had access to food and water *ad libitum*. The protocol was approved by the institutional Committee for Ethics in Research from University of Sorocaba (CEUA 31/2014). The experiments were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation and with the guide for the care and use of laboratory animals, Eighth Edition [29].

## **2.2.** Snake venom and specific antivenom

*Crotalus durissus terrificus* venom was collected from adult specimens kept in Nature Studies Centre's Serpentary of University of Vale do Paraiba, UNIVAP, SP, Brazil. The venom was lyophilized, maintained at 4 to 8°C until the use, and certified by Professor Dr. José Carlos Cogo, from University Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado, SP, Brazil.

Commercial antivenom against the *Crotalus durissus terrificus* venom (lot 135202/C, expiry date for human use: October 2016) produced by the Instituto Vital Brazil S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was kindly donated by Escritório Regional de Saúde of Piracicaba, Piracicaba, SP, Brazil.

## **2.3.** Equipments

An equipment for inhalatory anesthesia (Vetcare Plus®, from Incotec Científica Ltda, Serra, ES, Brazil) was used during all experimental procedure of hemoperfusion with isoflurane anesthetic (Cristália, SP, Brazil). For circulation circuit it was applied a peristaltic Finger Method using a Terofusion Infusion Pump TE-135 (Terumo Thailand Co. Ltd.). Vital conditions were monitored through multiparametric monitor DL1000 touch screen Vet (DeltaLife®, S.J. dos Campos, SP, Brazil). Hematological parameters were obtained through an hematology analyzer Sysmex® - XS -1000i.

## **2.4.** Anesthetics

Xylazine and Ketamine were purchased from Ceva® (Paulínia, SP, Brazil); Midazolam and Tramadol were purchased from Medley® (Campinas, SP, Brazil); and Isoflurane was purchased from Virbac® (Jurubatuba, SP, Brasil).

## **2.5.** Experimental design

Male rats were subjected to the following protocols:

Group 1 (n=3) – hemoperfusion technique control: animals were only submitted to hemoperfusion technique. After 24 h blood samples were collected aiming to determine the hematological parameters.

Group 2 (n=3) – animals were intoxicated with 500 µg/100 g *Crotalus durissus terrificus* venom (right thigh, i.m.). After 10 min, animals were treated with recommended dose of anticrotalic antivenom (1 mL of antivenom neutralizes 5 mg of the *Crotalus durissus terrificus* venom) and they kept alive during 24 h until blood samples collection.

Group 3 (n=3) – animals were intoxicated with 500 µg/100 g *Crotalus durissus terrificus* venom (right thigh, i.m.). After 10 min, animals were hemoperfused and they kept alive during 24 h until blood samples collection.

It is estimated that the lethal dose 50 (LD50) of *C. d. terrificus* venom is 180 µg/100 g rat weight [30]. The concentration of the venom used in this study, 500 µg/100 g, was selected after assays where the venom did exhibit characteristic neurotoxic signals, visible discomfort, and ataxia.

#### 2.5.1. Detailed procedure

Initially, the cartridge was rinsed with 2 L of heparinized (2500 U/L) NaCl 0.9 % (w/v) in a 50-150 mL/min flow. After the system preparation, animals were anesthetized (see anesthetic schedule) and the jugular vein and carotid artery carefully canulated, under isoflurano anesthesia. A peristaltic pump (Terofusion Infusion Pump TE-135), which detects air bubbles interrupting the flow and ensuring the animal safety, was used in order to promote the circuit of hemoperfusion. A dose of 10 UI/mL heparine was administered *in bolus*, at the arterial line [19], and also biomonitorized

avoiding the worsening of poisoning. The entry side of cartridge was kept facing down and the blood flow was then started. Animals were submitted to different protocols as described in 2.5. section. Finishing the hemoperfusion (after around 1 h), animals were anesthetized with Tramadol; observed during 24 h, after which were anesthetized with isoflurane for subsequent blood samples collection. At the end, animals were sacrificed using isoflurane deepening.

#### **2.5.1.1. Blood samples collection**

Blood samples were collected using 10 % ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) after 24 h of hemoperfusion procedure, for the determination of hematological data of treated groups.

#### **2.5.1.2. Hematological parameters**

Total leukocyte, platelet, and erythrocytes counts, all in triplicates, were obtained using an automated hematology analyzer Sysmex - XS -1000i. The obtained results were interpreted according to Melo et al. [27].

#### **2.6. Circuit (desenhar: Jéssica? Cunhada da Val?)**

#### **2.7. Data analysis**

Each protocol of the hematological assays was made in triplicate and the results are shown as the mean  $\pm$  SEM. All results were compared to reference values described by Melo et al. [27]. The platelets count among the treated-groups was analysed statistically using Student's *t*-test with the confidence level set at 5%.

#### **2.8. Results and Discussion**

In this study, a purpose of cartridge of hemoperfusion [29] (Figure 1), for rats, was assayed using 3 groups of 3 animals each, where the hemoperfusion procedure (group 1), and the ability of a cartridge in removing a crude snake *Crotalus durissus terrificus* venom (group 3) were compared to the commercial anticrotalic antivenom (group 2).



Figure 1. Cartridge of hemoperfusion made by Yoshida et al. [29], containing granulated charcoal (8-20 mesh) and a polymer filter impregnated with 0.02 g tannic acid, a phytochemical protein precipitant [31].

The *C. d. terrificus* venom reaches maximum serum levels 2 h after envenomation in animals [32]. Here, we did intend to remove the venom by a joint action of adsorption (granulated charcoal) and snake venom protein precipitation (tannic acid), before it sparking actions of severe neurotoxicity [33, 34], or myotoxicity [35-37], or coagulant disturbances [38]. Thus, the survival and the clinical conditions observed during 24 h were our main indicators of the successful procedure, besides to monitor the hematological parameters as leukocyte, platelet and erythrocytes counts. At this step our concern was to know about the impact of hemoperfusion over the hematological parameters, the disadvantages of this technique include: platelet loss and thrombocytopenia, blood loss, depletion of vital nutrients, hormones, or vitamins,

release of emboli, toxic and/or pyrogenic reactions, clotting, leucopenia, hemolysis, infection, hypotension and metabolic disturbances [39].

All animals survived after the experimental protocols, in a 24 h of observation.

Animals from group 1 subjected to hemoperfusion procedure had a complete recovery (Figure 2).



Figure 2. Animal subjected to hemoperfusion procedure (photograph taken 24 h after). Around 3 h after hemoperfusion procedure the animal began to recover. When the recovery was complete the rat showed explorer and alert behavior, it did eat, drink and clean normally, and kept standing. No signal of infection or other complication was observed.

The group 2 was not submitted to the hemoperfusion procedure, since the conventional treatment for snake bite is the serum therapy [40], administered intravenously, in human, but i.p. in our study with rats. The action of antivenom is indisputable, and reaffirmed be a highly effective treatment. The recovery happened just as soon the anesthesia effect (before schedule) passed (< 1 h).

The group 3 (*C. d. terrificus* venom followed by hemoperfusion) did not show clinical signals of neurotoxicity, discomfort or ataxia, at the end of 24 h. In general, the recovery of animals of group 1 and 3 was more later than group 2 since the anesthesia included before, during and after schedules.

The obtained results from hematological parameters are shown in Table 2.

**Table 2. Hematological parameters of treated rats (groups 1, 2 and 3).**

According to Melo et al. (2012) [27]	Total leukocyte count ( $10^3/\mu\text{L}$ ) 5.7 – 13.9	Platelet count ( $10^3/\mu\text{L}$ ) 837 – 1455	Erythrocytes count ( $10^6/\mu\text{L}$ ) 5.0 – 7.62
Group 1 – rat 1	10.27	521	6.5
	10.37	511	6.49
	9.97	537	6.49
Group 1 – rat 2	12.,8	461	7.13
	12.8	469	7.14
	12.8	459	7.14
Group 1 – rat 3	7.93	461	7.13
	8.07	469	7.14
	7.88	459	7.14
M ± SEM	$10.32 \pm 0.7$	$483 \pm 10.3$ *	$6.92 \pm 0.10$
Group 2 – rat 1	12.63	716	6.76
	12.36	691	6.74
	12.62	705	6.79
Group 2 – rat 2	8.93	925	6.54
	8.96	921	6.54
	8.88	918	6.53
Group 2 – rat 3	8.77	793	7.16
	9.01	754	7.17
	9.11	756	7.19
M ± SEM	$10.14 \pm 0.6$	$797.6 \pm 32.5$	$6.8 \pm 0.09$
Group 3 – rat 1	8.31	314	6.74
	8.11	319	6.79
	7.97	325	6.70
Group 3 – rat 2	9.29	734	6.46
	9.10	738	6.49
	9.34	754	6.49
Group 3 – rat 3	8.29	686	6.94
	8.51	685	7.01
	5.29	612	6.82
M ± SEM	$8.24 \pm 0.4$	$574.11 \pm 65.1$ *	$6.71 \pm 0.06$

\* $p < 0.05$  in comparison with group 2.

Notice that hemoperfusion had no impact on the total leukocytes and erythrocytes counts in all treated-groups, but had on the platelet count (groups 1 and 3). In fact, it is the main adverse event in hemoperfusion which, in turn, can decline when the charcoal is coated [40]. As in this study the hemoperfusion took around 1 h, the rat blood volume has passed at least 2 times through the cartridge, allowing a clean blood returning to the

rat. An advantage of hemoperfusion is cleaning a large volume and a broad types of toxins, as the injected *C. d. terrificus* venom amount.

Comparing statistically the platelet count among the treated-groups, either group 1 as group 3 were significantly different from group 2 ( $p<0.05$ ), but not between them, showing that the platelet loss is a real event, independently of the snake venom presence. However, considering the survival of all hemoperfused animals from group 1 and 2, either the cartridge as the hemoperfuser process adopted in this study were able to remove the circulant venom or to avoid the beginning of its action.

## 2.9. Conclusion

The purposed double action hemoperfuser cartridge by ability of adsorption (granulated charcoal) and protein precipitant (tannic acid) was a successful model of removing *Crotalus durissus terrificus* snake venom, avoiding the envenomation progress.

## Acknowledgements

The authors thank to Prosup/Capes, Pibic/CNPq, Probic and PPGCF/Uniso for fellowships; Fapesp - The State of São Paulo Research Foundation for financial support (15/01420-9), Finep 07/2010, and Pharmacology Department FCM/Unicamp by loan of an equipment for inhalatory anesthesia.

## References

1. Winchester JF. Active methods for detoxification: oral sorbents, forced diuresis, hemoperfusion, and hemodialysis. In: Haddad LM and Winchester JF (Ed.)

Clinical management of poisoning and drug overdose. 2. Philadelphia:Saunders, 1990.

2. Rommes JH. Haemoperfusion, indications and side-effects. In: (Ed). Medical Toxicology:Springer, 1992. p. 40-49. ISBN 3642772625.
3. Cabrera VJ, Shirali AC. We use continuous renal replacement therapy for overdoses and intoxications. *Semin Dial*. 2016, 29(4):275-7. doi: 10.1111/sdi.12505
4. Santos ET. Hemodiálise em cães e gatos. 2006. (Master). Pós-Graduação em clínica de pequenos animais. Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro.
5. Pereira MT. Acidente botrópico em cães. 2006. (Especialização). Clínica Médica e Cirúrgica em Pequenos Animais. Universidade Castelo Branco, Campo Grande, MS.
6. Cowgill LD, Francey T. Hemodialysis and extracorporeal blood purification A2. Di Bartola SP (Ed.). Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice (4<sup>th</sup> ed.). Saint Louis: Elsevier Saunders, 2012. p. 680-713.
7. Cowgill LD, Langston CE. Role of hemodialysis in the manegement of dogs and cats with renal failure. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1996, 26(6):1347-1378.
8. Guimarães PTC, Veado JCC, Melo MM, Oliveira J, Bandeira CM. Perfil bioquímico de cães intoxicados experimentalmente com carbamato (Aldicarb) e submetidos à hemodiálise e hemoperfusão. **Medvep. Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 9, n. 31, p. 711-716, 2011. ISSN 1678-1430.

9. Sandeman SR, Howell CA, Phillips GJ, Zheng Y, Standen G, Pletzenauer R, Davenport A, Baysnayake K, Boyd O, Holt S, Mikhalovsky SV. An adsorbent monolith device to augment the removal of uraemic toxins during haemodialysis. *J Mater Sci: Mater Med* (2014) 25:1589–1597 DOI 10.1007/s10856-014-5173-9
10. Daugirdas T. Princípios fisiológicos. In: Daugirdas JT; Ing TX (Eds.). *Manual de diálise*. 2. São Paulo:Medsi, 1994. p. 13-27.
11. Orlowski JM, Hou S, Leikin JB. Extracorporeal removal of drugs and toxins. In: Ford M, Delaney KA, Ling L, editors. *Clinical Toxicology*. 1st ed. St. Louis, MO: WB Saunders Company; 2001. p. 43–50.
12. Garg SK, Singh O, Deepak D, Singh A, Yadav R, Vashist K. Extracorporeal treatment with high-volume continuous venovenous hemodiafiltration and charcoal-based sorbent hemoperfusion for severe metformin-associated lactic acidosis. *Indian J Crit Care Med*. 2016; 20(5): 295–298. doi: 10.4103/0972-5229.182205
13. Risler T, Grabensee B. Hemoperfusion in the management of digoxin toxic reaction. The Journal of the American Medical Association, v. 242, n. 11, p. 1140, 1979. ISSN 0098-7484.
14. Hampson ECGM, Effeney DJ, Pond SM. Efficacy of single or repeated hemopersusion in a canine model of paraquat poisoning. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 254, n. 2, p. 732-740, 1990. ISSN 00223565.
15. Guimarães PTC, Veado JCC, Melo MM, Oliveira J, Melo MB. Comportamento clínico e perfil hematológico de cães intoxicados experimentalmente com

carbamato (Aldicarb) e submetidos à hemodiálise e hemoperfusão. Rev Bras Ciênc Vet., v. 15, n. 1, p. 33-39, 2008.

16. Medd R, Widdop B, Braithwaite RA, Rees AJ, Goulding R. Comparison of haemoperfusion and haemodialysis in the therapy of barbiturate intoxication in dogs. **Archives of Toxicology**, Berlin/Heidelberg, v. 31, n. 2, p. 163-174, 1973. ISSN 0003-9446.
17. Yang TS, Chang YL, Yen CK. Haemoperfusion treatment in pigs experimentally intoxicated by paraquat. **Human and Experimental Toxicology**, v. 16, n. 12, p. 709-715, 1997. ISSN 0960-3271.
18. Ronco C, Klein DJ. Polymyxin B hemoperfusion: a mechanistic perspective. **Critical Care**, v. 18, n.3, p. 309-315, 2014. ISSN 1364-8535/1466-609X.
19. Ryan CJ, Courtney JM, Wood CB, Hood RG, Blumgart LH. Activated charcoal haemoperfusion via an extracorporeal circuit in the unrestrained and unanaesthetized rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 60, n. 4, p. 400-410, 1979. ISSN 0007 1021.
20. Masuda T, Mitaka C, Khin Hnin Si M, Kido K, Qi Y, Uchida T, Abe S, Miyasho T, Tomita M. Rat polymyxin b hemoperfusion model: preventive effect on renal tubular cell death in a rat cecal ligation and puncture model. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 127, 2015.
21. Frezzatti R, Silveira PF (2011) Allopurinol Reduces the Lethality Associated with Acute Renal Failure Induced by *Crotalus durissus terrificus* Snake Venom: Comparison with Probenecid. **PLoS Negl Trop Dis** 5(9): e1312. doi:10.1371/journal.pntd.0001312

22. Mauer SM, Chavers BM, Kjellstrand CM. Treatment of an infant with severe chloramphenicol intoxication using charcoal- column hemoperfusion. **The Journal of Pediatrics**, v. 96, n. 1, p. 136-139, 1980. ISSN 0022-3476.
23. Lehmann HD, Konstantin P. **Column for the removal of undesired substances from a liquid mixture**. Fed. Rep. of Germany: Gambro Dialysatoren GmbH & Co. US Patent 4,250,141 1981.
24. Rutala WA, Weber DJ, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008.
25. Yoshida
26. Lee HB, Blaufox MD. Blood volume in the rat. *J Nucl Med*, 1985, 26(1): 72-76.
27. Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Araújo AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal do Sergipe. *Scientia Plena*, v. 8, n. 4, 2012, p. 1-6.
28. Neves SMP. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP / Silvânia M. P. Neves [et al.]. -- São Paulo : FCF-IQ/USP, 2013. 216 p. il.
29. Guide for the care and use of laboratory animals, Eighth Edition, 2011. National Research Council of the National Academies. Washington DC: National Academic Press. Available at: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>
30. Batina M de FC, Giglio JR, Sampaio SV. Methodological care in the evaluation of the LD50 and of the neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus*

- terrificus* venom by the plant *Peschiera fuchsiaefolia* (Apocynaceae). J. Venom. Anim. Toxins [Internet], v. 3, n. 1, p. 22- 31, 1997.
31. Melo RS, et al. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In: Keller RB (Ed.). Nutrition and diet research progress series – Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources. New York:Nova Science Publishers, Inc. 2009. p. 249-262.
32. Sangiorgio F, Sakate M, Nogueira RMB, Araújo Jr J, Chavez-Olortegui C. Kinetics of venom and antivenom serum levels, clinical evaluation and therapeutic effectiveness in dogs inoculated with *Crotalus durissus terrificus* venom. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 2008, 14, 1, p. 100-112.
33. Vital Brazil O. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. J Formos Med Assoc 1972, 71, 394-400.
34. Vital Brazil O. Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev Assoc Med Bras, 1980, 26, 212-228.
35. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. Toxicology, 1985, 23, 631-6.
36. Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. Toxicology, 1987, 11, 1163-8.

37. Magalhães RA, Ribeiro MMF, Rezende NA, Amaral CF. Rabdomiólise secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1986, 28, 228-33.
38. Amaral CFS, Rezende NA, Pedrosa TMG, Silva OA, Pedroso ERP. Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1988, 30, 288-92.
39. FDA Executive Summary Prepared for the June 27, 2013 meeting of the Gastroenterology and Urology Devices Panel Classification of Sorbent Hemoperfusion Systems, 37 p.
40. WHO - World Health Organization. (2007) Neglected tropical diseases. Available online: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/) (accessed on 24.07.2011).