

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA**

**“COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE  
DOS ANTISOROS BOTRÓPICOS COMERCIAL E  
MONOESPECÍFICO FRENTE A PEÇONHA DE B.  
ERYTHROMELAS”**

**MONIQUE MÔNIA PONTES BEZERRA**

**ORIENTADORA: Dra. Míriam Camargo Guarnieri**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre.

**Recife, 2000**

Posso todas as coisas Naquele que me fortalece.

Apóstolo Paulo

Dedico à minha adorável família e ao meu amor, Ivens.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu criador e sustentador.

À Dra. Míriam Camargo Guarnieri, minha orientadora e conselheira.

A Érika, Renata Kali, Claíne, Marliete, Maria Amélia, Cláudio e Aldo, companheiros do LAPTx.

A Celusa, Sr. Fredson, Jorge e Josivan, funcionários do Departamento de Biofísica e Radiobiologia.

A D. Zizi e Kildare, funcionários do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco.

A Rejane, técnica do Dept<sup>o</sup> de Fisiologia.

Aos Drs. Elizabete Malagueno Valfrido Santana, chefes do laboratório de imunologia do LIKA.

A Ronnie, Beré e Dodgi, componentes do laboratório de imunologia do LIKA.

Ao Dr. David Toledo Velarde, chefe da Divisão de Imunobiológicos da FUNED – MG.

Ao Dr Paulo Andrade, coordenador do laboratório de Biologia Molecular do Dept<sup>o</sup> de Genética da UFPE.

Ao Dr. Emerson Araújo, professor do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

A Marcílio, Álvaro, Alberto, Luíz, Fábio, Lânia e Suy, mestrandos do Dept<sup>o</sup> de Biofísica e Radiobiologia.

Aos irmãos da Primeira Igreja Batista do Engenho do Meio e da Igreja Batista do Novo Juazeiro-CE.

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	12
3 - MATERIAIS.....	13
3.1 – Peçonha.....	13
3.2 – Soros.....	13
3.3 – Animais experimentais.....	14
4 – MÉTODOS.....	14
4.1 – Determinação das atividades biológicas da peçonha.....	14
4.2 – Determinação das atividades enzimáticas da peçonha.....	17
4.3 – Ensaio imunológico <i>in vitro</i> .....	18
4.3.1 – Imunoprecipitação.....	18
4.3.2 – “Western blotting”.....	19
4.4 – Ensaio de neutralização.....	21
4.4.1 – Neutralização das atividades biológicas da peçonha.....	22
4.4.2 – Neutralização das atividades enzimáticas da peçonha.....	24

5 – RESULTADOS.....	26
5.1 –Atividades biológicas.....	26
5.2 –Atividades enzimáticas.....	28
5.3 – Atividade Neutralizante dos Soros.....	31
5.3.1 - Atividades biológicas.....	31
5.3.2 – Atividades enzimáticas.....	33
5.4 – Imunoprecipitação .....	39
5.5 – Perfil eletroforético das proteínas da peçonha (SDS- PAGE).....	40
5.6 – Perfil antigênico reconhecido da peçonha reconhecido pelos soros antibotrópicos poli e monoespecíficos.....	41
6 – DISCUSSÃO.....	42
7 – CONCLUSÕES.....	50
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

## RESUMO

A administração parenteral de antivenenos de origem eqüina constitui o recurso mais aceito cientificamente para o tratamento de envenenamentos por picadas de serpentes. O antiveneno botrópico produzido no Brasil inclui apenas cinco espécies desse gênero, dentre as quais não se encontra a espécie *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca), serpente botrópica endêmica da região Nordeste. Primeiramente foram determinadas as dose mínimas que constituíram o desafio de neutralização para os antivenenos em cada atividade. Em seguida a neutralização foi calculada e expressa como DE50, dose que inibe 50% da atividade testada. As Doses Mínimas encontradas foram: 22,119  $\mu\text{g}$ /camundongo (hemorrágica), 78,38  $\mu\text{g}$ /camundongo (necrosante), 21,37  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Coagulante) e 0,05 mg (Fosfolipásica). A DL50 foi 5,11 mg/kg. A eletroforese em gel de poli-acrilamida, sob condições redutoras, da peçonha de *B. erythromelas*, corada por Comassie blue mostrou sete bandas confirmadas pelo “imunoblotting” quando revelado com os antivenenos comercial e monoespecífico diluídos 1/16.000. Foi demonstrado também, através da técnica de imunoprecipitação, que o antiveneno monoespecífico apresenta maior capacidade de formar imunocomplexos com os determinantes antigênicos presentes na peçonha de *B. erythromelas*, enquanto que a capacidade de complexação do antiveneno comercial não foi suficiente para precipitar os antígenos dessa peçonha. Nos experimentos de neutralização, foi observada uma eficácia cerca de 2x maior do antiveneno monoespecífico em relação ao comercial, em todas as atividades testadas. As Doses Efetivas 50% para o antiveneno comercial e monoespecífico, respectivamente, foram: 49,21



$\mu\text{l/mg}$  peçonha e 26,95  $\mu\text{l/mg}$  peçonha (hemorragia); 9,50  $\mu\text{l/mg}$  e 7,34  $\mu\text{l/mg}$  (necrosante); 85,2  $\mu\text{l/mg}$  e 51,2  $\mu\text{l/mg}$  (letal); 12,61  $\mu\text{l/mg}$  e 6,35  $\mu\text{l/mg}$  (coagulante) e, 285,38  $\mu\text{l/mg}$  e 166  $\mu\text{l/mg}$  (fosfolipásica). Neste trabalho, foi demonstrado que o antiveneno botrópico monoespecífico foi mais efetivo que o botrópico comercial na neutralização das atividades testadas (letal, hemorrágica, necrosante, coagulante e fosfolipásica), na capacidade de formar imunocomplexos *in vitro* com a peçonha de *Bothrops erythromelas* e no reconhecimento das proteínas separadas eletroforeticamente.

## ABSTRACT

The administration of antivenoms from equine origin constitutes the most scientific useful method for treatment of envenomation due to snake bites. IN BRAZIL *Bothrops* antivenom includes only five species of this genera, among those *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca), endemic snake in Northeast Brazil, is not included. In the present work, firstly were determined minimum doses that constituted the DESAFIO in neutralisation for the antivenoms in each activity. In a second step the neutralisation was calculated and expressed as ED<sub>50</sub>, a dose that inhibits 50% of the tested activity. The minimum doses reached for each activity were: 22,119% µg/mouse (haemorrhagic), 78,38 µg/mice (necrotising), 21,37 µg/mouse (clotting) and 0,05 mg (phospholipasic). LD<sub>50</sub> was 5,11 mg/kg. The SDS-PAGE of *Bothrops erythromelas* venom under reducing conditions stained with Coomassie Blue-R showed seven BANDAS confirmed for the immunoblotting analysis when studied together with commercial and monoespecific antivenoms diluted 1/16.000. It was also demonstrated towards immunoprecipitation technique that the monoespecific antivenom presents a major ability on forming immunocomplexes with the antigenic determinants present on *Bothrops erythromelas* venom, while this ability was not enough to precipitate the antigens of this venom. On neutralisation experiments it was observed an efficacy almost 2X greater of the monoespecific antivenom related to the commercial one in all the tested activities. The Effective Doses 50% for the commercial and the monoespecific antivenoms, respectively, were: 49,21 µl/venom and 26,95 µl/venom (haemorrhagic); 9,50 µl/venom and 7,34 µl/venom (necrotizing); 85,2 µl/venom and

51,2 µl/venom (lethal); 12,61 µl/venom and 6,35 µl/venom (clotting) and lately 185,38 µl/venom and 166 µl/venom (phospholipasic). It was demonstrated in this work that the *Bothrops* monoespecific antivenom was more effective than the commercial one on the neutralisation of the tested activities (lethal, haemorrhagic, necrotising, clotting and phospholipasic), on the ability to form immunocomplexes *in vitro* with *Bothrops erythromelas* venom and on the recognition of the proteins separated by SDS-PAGE.

# 1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo que o estudo sobre a fauna ofídica, sua classificação, bem como seus hábitos e atividades têm despertado grande interesse à humanidade.

Devido à sua astúcia, ao seu rastejar ondulante, aos seus ataques imprevisíveis e à sua peçonha, por vezes fatal, as serpentes ainda causam temor e um horror não raro mórbido por parte dos humanos; por isso é fascinante estudar e descobrir caracteres bioquímicos de sua peçonha, aspectos fisiológicos e comportamentais a cerca desses seres, muitos dos quais são indiscutivelmente úteis à ciência.

Envenenamentos por picadas de serpentes constituem um grave perigo em muitas partes do mundo, particularmente nas áreas rurais de países tropicais (White, 1995; Warrel, 1996).

Embora informações epidemiológicas precisas não sejam acessíveis em muitos países, a mortalidade mundial devido a picadas de serpentes pode chegar a 100.000 casos por ano (Swaroop and Grab, 1954; White, 1995; Warrell, 1996). A importância dos acidentes ofídicos como problema de saúde tem sido subestimada, parcialmente, devido à falta de informação concernente à mortalidade por picada de serpente pelas autoridades médicas oficiais.

As quatro famílias de serpentes peçonhentas – Atractaspididae, Viperidae, Elapidae e Hydrophiidae- compreendem cerca de 500 espécies, das quais menos de 200 têm sido descritas como capazes de provocar envenenamento severo em humanos (Warrell, 1996).

No Brasil, as famílias de interesse médico compreendem a Família Viperidae, cujos gêneros representantes são *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*, e Elapidae, representada pelo gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus* (Bjarnson & Fox, 1988, 1989).

O gênero *Bothrops* ainda é o maior representante em número e espécies e subespécies, que se distribuem por todo território brasileiro. Embora os acidentes botrópicos apresentem baixo coeficiente de mortalidade (0,5/100), devido ao grande número de ocorrências, os mesmos são responsáveis por 41% de mortes por acidentes ofídicos registrados no país (Cardoso, 1992).

Dentre as 32 variedades de serpentes do gênero *Bothrops* no Brasil, a serpente *B. erythromelas*, conhecida como jararaca-da-seca ou malha de cascavel, encontra-se amplamente distribuída desde o estado da Bahia até o Ceará (Romano-Hoge, 1990), sendo uma das principais serpentes responsáveis pelos acidentes ofídicos registrados na região Nordeste do Brasil (Cardoso, 1990). É uma serpente de pequeno porte medindo, aproximadamente, 95 a 125 cm e que habita, principalmente, as caatingas (Cordeiro & Hoge, 1973; Cardoso, 1992).

As manifestações locais induzidas pela picada de serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizadas pela dor e por alterações, como edema endurecido no local da picada, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo, bolhas e necrose. Esses sintomas podem ser atribuídos, inicialmente, à ação proteolítica da peçonha e possivelmente decorrem da atividade de proteases, hialuronidasas e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória e da ação pró-coagulante da peçonha (Fundação Nacional de Saúde, 1998).

A maioria das peçonhas botrópicas ativa, de modo isolado ou simultâneo, os fatores X, II (protrombina) e fibrinogênio da coagulação sanguínea (Kamiguti & Sano Martins, 1995). As enzimas que coagulam o fibrinogênio diretamente são denominadas enzimas trombina-símile (Stocker, 1988; Ouyang *et al.*, 1992). As peçonhas de serpentes de várias espécies do gênero *Bothrops* que apresentam tal capacidade, digerem apenas as cadeias  $\alpha$ (A) (Arg<sub>16</sub>-Gly<sub>17</sub>) da região N-terminal do fibrinogênio liberando o fibrinopeptídeo A, não sendo capaz de liberar o fibrinopeptídeo B das cadeias  $\beta$  (B) (Arg<sub>14</sub>-Gly<sub>15</sub>) (Ouyang *et al.* 1992; Kamiguti & Sano Martins, 1995). Nestas condições, na ausência de ativação do fator XIII, a fibrina resultante é bastante instável, sendo rapidamente degradada através da ativação secundária do sistema fibrinolítico (Cardoso, 1992; Kamiguti & Sano Martins, 1995).

A espécie *Bothrops erythromelas* destaca-se entre as espécies do gênero por apresentar a mais potente atividade coagulante do grupo (Ferreira *et al.*, 1992b; Zappellini, 1991), além da particularidade de não exibir ação trombina-símile (Nahas *et al.*, 1979; Tomy *et al.*, 1988; Furtado *et al.*, 1991; Sanchez *et al.*, 1992).

Vasconcelos (1996) demonstrou a presença de potentes ativadores de fatores X e II na peçonha de *B. erythromelas* e, após inoculação desta peçonha em animais experimentais, observou um quadro de coagulação intravascular disseminada que culminou numa coagulopatia de consumo

As manifestações hemorrágicas, um dos efeitos mais drásticos dos envenenamentos botrópicos, ocorrem devido à ação de proteínas que provocam

lesões na membrana basal dos capilares, ocasionando o sangramento. Estas proteínas são chamadas hemorraginas, fatores hemorrágicos ou toxinas hemorrágicas (Bjarnason & Fox, 1994) que, além de agravarem o quadro de choque circulatório por efeitos diretos na perda de sangue, atuam indiretamente através da inibição da agregação plaquetária, dificultando o processo da hemostasia. Várias hemorraginas de peçonhas botrópicas já foram isoladas e caracterizadas, incluindo *B. jararaca* (Mandelbaum *et al.*, 1976), *B. neuwiedi* (Mandelbaum *et al.*, 1984) e *B. moojeni* (Assakura *et al.*, 1985).

Valença (1997), estudando o processo hemorrágico induzido pela peçonha de *B. erythromelas*, constatou que a atividade hemorrágica é induzida por metaloproteinases, cujas massas relativas estão compreendidas entre 55.000 e 170.000. Neste trabalho, também foi observado que as principais alterações clínicas durante envenenamento experimental em cães, por via endovenosa, utilizando a dose de 0,5 mg/Kg, foram: gengivorragia, petéquias hemorrágicas cutâneas, hematúria e sangramento nos locais de incisões cirúrgicas. A análise histológica dos animais experimentais revelou um quadro hemorrágico sistêmico, onde os principais órgãos afetados foram pulmões, rins e fígado.

As complicações locais decorrentes do envenenamento botrópico que ocorrem, principalmente, em casos de atendimento tardio, são:

- Síndrome Compartimental: caracteriza casos graves e decorre da compressão do feixe vásculo-nervoso consequente ao forte edema que se desenvolve no membro atingido, produzindo isquemia de extremidades, cujos sinais mais importantes são a dor intensa, parestesia, diminuição da temperatura do segmento distal, cianose e déficit motor;

- Abscesso: de ocorrência variável entre 10 a 20%, decorre primariamente da ação proteolítica da peçonha e secundariamente da ação de bactérias (bacilos Gram-negativos, anaeróbios e, mais raramente, cocos Gram-positivos) provenientes da boca do animal, da pele do acidentado ou do uso de contaminantes sobre o ferimento;

-Necrose: devido principalmente à ação proteolítica da peçonha, está associada à isquemia local por causa da lesão vascular e de outros fatores como infecção, trombose arterial, síndrome de compartimento ou uso indevido de torniquetes (Fundação Nacional de Saúde,1998).

As complicações sistêmicas mais frequentes compreendem choque e insuficiência renal aguda. A patogênese do choque é multifatorial, podendo decorrer da liberação de substâncias vasoativas, do sequestro de líquido na área do edema e de perdas por hemorragias. A insuficiência renal aguda pode ser consequência da ação direta da peçonha sobre os rins, isquemia renal secundária à deposição de microtrombos nos capilares, desidratação ou hipotensão arterial e choque (Borges, 1999) .

Com base nas manifestações clínicas e visando orientar a terapêutica a ser empregada, acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* podem ser classificados em leves, moderados e graves (Fundação Nacional de Saúde,1998).

Nos acidentes considerados leves, há predominância de dor e edema local pouco intenso ou ausente, manifestações hemorrágicas discretas ou ausentes, com ou sem alteração do tempo de coagulação. Acidentes definidos como moderado, são caracterizados por dor e edema intenso que ultrapassa o segmento anatômico picado e acompanhados ou não de alterações hemorrágicas



locais ou sistêmicas como gengivorragia, epistaxe e hematúria. Nos acidentes graves, o edema local endurecido é extenso, podendo atingir todo o membro picado; é geralmente acompanhado de dor intensa e, eventualmente bolhas. Como consequência do edema, podem aparecer sinais de isquemia local (Fundação Nacional de Saúde, 1998).

A medicação popular de urgência se constitui num verdadeiro perigo ao prognóstico do envenenamento. Álcool e querosene, substâncias utilizadas com maior frequência, longe de curar, dificultam ainda mais recuperação do paciente envenenado. O álcool, numa primeira fase proporciona aumento da tensão arterial, favorecendo a absorção da peçonha e numa segunda fase, uma diminuição da pressão sanguínea, retardando a reação do organismo e a eliminação do tóxico. Portanto, administrado sob qualquer forma, o álcool produz efeitos opostos aos desejáveis após uma terapia: a parada de absorção da peçonha seguida de sua eliminação o mais rapidamente possível. Quanto ao querosene, seus efeitos são ainda mais prejudiciais. Este derivado do petróleo, agrava muito mais os sintomas, porquanto por si só é capaz de causar uma intoxicação aguda com destruição do sangue e degeneração do fígado (Amaral, A.1935).

O único tratamento específico, cientificamente aceito, para acidentes com serpentes consiste na administração, o mais precocemente possível, do antiveneno ofídico (Vital Brazil, 1997; Russell, 1988). Há um século da sua descoberta e a despeito do progresso experimental em sua produção, o uso do antiveneno permanece largamente empírico. O princípio da imunoterapia é baseado na complexação do antígeno com o anticorpo apropriado, sendo a

neutralização um processo que expressa uma mudança estrutural no antígeno nativo, prevenindo o seu funcionamento normal. Se essa mudança estrutural afeta o sítio ativo do antígeno, sua atividade será modificada (Chippaux and Goyffon, 1998).

Segundo Hawgood (1999), Sewall, em 1887, foi o pioneiro na utilização de princípios soroterápicos, quando imunizou pombos contra a peçonha da serpente *Sistrurus catenatus* usando repetidas inoculações da mesma tratada com glicerina. Embora o protocolo não fosse padronizado, experimentos demonstraram que cobaios resistiram ao desafio de seis doses letais da peçonha .

Em 1894, Phisalix e Bertrand demonstraram a atividade antitóxica do sangue de animais imunizados contra a peçonha de *Vipera aspis*, estando a peçonha detoxificada pelo aquecimento. Simultaneamente, Calmette (1894), trabalhando com peçonha de *Naja*, estudou três protocolos de imunização e, da mesma forma que Phisalix e Bertrand, observou que o soro de animais imunizados possuíam atividade terapêutica (Hawgood, 1999).

Calmette (1894) foi o primeiro a preparar antiveneno para uso médico contra picadas de serpentes, tornando-se então, o real promotor da terapia com antiveneno. A partir de então, passou a distribuir o 'serum antivenimeux', como o denominou, em várias partes do mundo, em particular, na Índia, Indochina, Austrália e Europa. Depois disso, muitos cientistas começaram a desenvolver antivenenos em seus próprios países: Tidwell na Austrália, em 1902; Vital Brazil no Brasil, em 1905; Ishizaka no Japão, em 1907- todos utilizando os protocolos de Calmette.(Chippaux and Goyffon, 1998).

Vital Brazil foi o primeiro pesquisador a demonstrar, em 1901, a especificidade dos soros antiofídicos, o que levou ao grande desenvolvimento da eficácia na soroterapia no mundo. Partindo dessa descoberta, no mesmo ano, o Brasil já possuía antissoros mono e polivalentes para uso médico. Após ter demonstrado a especificidade dos soros antiofídicos, e iniciado o preparo dos soros antibotrópico, anticrotálico e antiofídico, Vital Brazil verificou em suas pesquisas que o soro preparado por Calmette era incapaz de neutralizar a peçonha da elapídia *Bungarus fasciatus* e das viperídeas *Echis carinatus* e *Vípera russellii*, serpentes causadoras de acidentes na Índia. Vital Brazil foi, portanto, o introdutor da soroterapia antiofídica em bases realmente eficazes. A sua orientação de que os antissoros fossem preparados para emprego em determinada região tem sido mundialmente adotada (Vital Brazil, 1989).

Os antivenenos ofídicos são produzidos inoculando-se concentrações crescentes de peçonha em animais de grande porte, geralmente cavalos por apresentarem grande volume sanguíneo. O título de anticorpos (IgG) no sangue é monitorado a cada inóculo, após a obtenção do título adequado é realizada a sangria total nos animais soroprodutores, e os eritrócitos são devolvidos aos mesmos, após a hemossedimentação. O soro total foi originalmente usado para terapia, mas, há muitos anos, tem sido purificado por etapas sucessivas para reduzir reações anafiláticas. Após a eliminação dos elementos celulares por centrifugação, proteínas não imunes, especialmente albumina, são descartadas por precipitação com sulfato de amônio. As imunoglobulinas são, então, digeridas com pepsina para produzir a fração F(ab)<sub>2</sub>. Antes do envazamento final e liberação pelos produtores, o antiveneno é submetido a cultura bacteriológica em

meio apropriado e estudos toxicológicos usando inoculação animal para pirogenicidade (Raw *et al*, 1991; Chippaux and Goyffon, 1998).

Os antivenenos brasileiros, produzidos no Rio de Janeiro pelo Instituto Vital Brazil; em Belo Horizonte, pela Fundação Ezequiel Dias e em São Paulo, pelo Instituto Butantan, são gênero-específicos. Nos acidentes com serpentes do gênero *Laquesis* (surucucus) deve ser administrado o soro anti-laquetico; nos acidentes pelo gênero *Bothrops* (jararacas), o antibotrópico, nos acidentes por *Crotalus* (cascaváis), o anti-crotálico, e nos acidentes por serpentes da família Elapidae (corais), o anti-elapídico.

Usualmente, o soro botrópico comercial distribuído pelo Ministério da Saúde é utilizado como único tratamento para envenenamentos pelas 18 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* em todo o país.

A neutralização cruzada entre peçonhas botrópicas e os antivenenos específicos e paraespecíficos mono e polivalentes, tem sido investigada desde a década de 30.

Césari e Boquet (1937) estudaram as reações cruzadas entre peçonhas e antivenenos ofídicos e concluíram que os antivenenos neutralizam satisfatoriamente as peçonhas específicas, mas são total ou parcialmente destituídos de capacidade neutralizante para outras peçonhas não específicas.

Glenn (1983) e Rael (1984) demonstraram que ocorrem variações intraespecíficas na composição das peçonhas, em função da distribuição geográfica das serpentes. Estas variações bioquímicas e farmacológicas mostram diferenças significativas em algumas propriedades como a letalidade, atividade enzimática, reações imunológicas e outras (Gutiérrez e Chaves, 1980). Moura da

Silva e cols (1990) mostraram que as peçonhas de serpentes botrópicas compartilham muitos antígenos e, desse modo, o antiveneno é capaz de neutralizar os efeitos letais de peçonhas de diferentes espécies, porém, os mesmos também demonstraram a existência de antígenos individuais.

Zappellini (1991) demonstrou que o soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan não foi eficaz na neutralização da letalidade da peçonha de *B. erithromelas* em cães. As alterações na coagulação somente foram revertidas utilizando antiveneno em dose trinta vezes maior do que aquela recomendada pelo conceituado instituto. Ferreira e cols. (1992) concluíram que a ineficiência do antiveneno botrópico em neutralizar a atividade coagulante da peçonha de *B. erithromelas* seja devido a diferentes proporções das enzimas coagulantes presentes nestas peçonhas. Além da letalidade e atividade coagulante, as atividades edemaciante e fosfolipásica A<sub>2</sub> também não foram eficientemente neutralizadas pelo antiveneno.

Desse modo, verifica-se que o soro antibotrópico, única alternativa no tratamento de pacientes picados, não é eficaz em evitar todos os efeitos consequentes ao envenenamento por *B. erithromelas*, tendo em vista que sua peçonha não está incluída no “pool” inoculado nos animais utilizados na produção do soro antibotrópico.

Por não haver trabalhos conclusivos sobre a eficiência do antiveneno botrópico frente à peçonha de *B. erythromelas*, sendo esta a serpente botrópica endêmica da região Nordeste e devido à inexistência de trabalhos que indiquem uma alternativa para o tratamento das vítimas de acidentes causados pela picada desta serpente, é que nos propusemos a realizar este estudo.

A administração parenteral de antivenenos de origem eqüina constitui o recurso mais aceito cientificamente para o tratamento de envenenamentos por picadas de serpentes. O antiveneno botrópico produzido no Brasil inclui apenas cinco espécies desse gênero, dentre as quais não se encontra a espécie *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca), serpente botrópica endêmica da região Nordeste. Primeiramente foram determinadas as doses mínimas que constituíram o desafio de neutralização para os antivenenos em cada atividade. Em seguida a neutralização foi calculada e expressa como DE<sub>50</sub>, dose que inibe 50% da atividade testada. As Doses Mínimas encontradas foram: 22,119 µg/camundongo (hemorrágica), 78,38 µg/camundongo (necrosante), 21,37 µg/ml (Coagulante) e 0,05 mg (Fosfolipásica). A DL<sub>50</sub> foi 5,11 mg/kg. A eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições redutoras, da peçonha de *B. erythromelas*, corada por Comassie blue mostrou sete bandas confirmadas pelo “imunoblotting” quando revelado com os antivenenos comercial e monoespecífico diluídos 1/16.000. Foi demonstrado também, através da técnica de imunoprecipitação, que o antiveneno monoespecífico apresenta maior capacidade de formar imunocomplexos com os determinantes antigênicos presentes na peçonha de *B. erythromelas*, enquanto que a capacidade de complexação do antiveneno comercial não foi suficiente para

precipitar os antígenos dessa peçonha. Nos experimentos de neutralização, foi observada uma eficácia cerca de 2x maior do antiveneno monoespecífico em relação ao comercial, em todas as atividades testadas. As Doses Efetivas 50% para o antiveneno comercial e monoespecífico, respectivamente, foram: 49,21  $\mu\text{l}/\text{mg}$  peçonha e 26,95  $\mu\text{l}/\text{mg}$  peçonha (hemorragia); 9,50  $\mu\text{l}/\text{mg}$  e 7,34  $\mu\text{l}/\text{mg}$  (necrosante); 85,2  $\mu\text{l}/\text{mg}$  e 51,2  $\mu\text{l}/\text{mg}$  (letal); 12,61  $\mu\text{l}/\text{mg}$  e 6,35  $\mu\text{l}/\text{mg}$  (coagulante) e, 285,38  $\mu\text{l}/\text{mg}$  e 166  $\mu\text{l}/\text{mg}$  (fosfolipásica). Neste trabalho, foi demonstrado que o antiveneno botrópico monoespecífico foi mais efetivo que o botrópico comercial na neutralização das atividades testadas (letal, hemorrágica, necrosante, coagulante e fosfolipásica), na capacidade de formar imunocomplexos *in vitro* com a peçonha de *Bothrops erythromelas* e no reconhecimento das proteínas separadas eletroforicamente.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o potencial de neutralização da peçonha de *B. erythromelas* pelos antivenenos botrópicos comercial e monoespecífico.



### 3. MATERIAIS

#### 3.1. PEÇONHA

A peçonha de *Bothrops erythromelas* foi obtida de serpentes procedentes da Ilha de Itaparica, Bahia, cedida pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). A peçonha liofilizada foi estocada a -20°C até o momento do uso.

#### 3.2. SOROS

Os soros antiofídicos comercial (lote 990302-06) e monoespecífico. *B.erythromelas*, (lote nº981209-12), cujas potências frente à peçonha de referência nacional (*B. jararaca*) foram 6,18 e 5,86 mg/mL, respectivamente, foram provenientes do setor de Imunobiológicos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

O soro antiofídico poliespecífico comercial foi produzido a partir do inóculo de um “pool” das peçonhas de *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%), provenientes de diferentes regiões do Brasil. Para produção do soro monoespecífico anti-*B. erythromelas*, foi utilizado um “pool” das peçonhas de 20 espécimes de *B. erythromelas* provenientes de Itaparica-BA.

### 3.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Camundongos *Swiss* machos (18-22g) e fêmeas (25-30g) utilizados nos ensaios de neutralização *in vivo*, foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE.

## 4. MÉTODOS

### 4.1.DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 4.1.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA

A toxicidade das amostras de *B. erythromelas* foi avaliada pela determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>)- dose de peçonha capaz de matar 50% da população analisada- calculada segundo o manual da Organização mundial de saúde (1981), pelo método de Sperman-Karber.

Grupos de 4 camundongos machos (18-22g) foram inoculados, por via intraperitoneal, com diferentes doses de peçonha (35; 65; 120; 220; 395; 711 µg/camundongo), em um volume final de 0,5 mL, diluídas em NaCl 0,85%. Após 48 horas, o número de animais mortos para cada dose foi registrado.

A DL<sub>50</sub> foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$m = X_{100} - d/n (\sum r - n/2)$$

onde: **m** = log DL<sub>50</sub>; **X<sub>100</sub>** = log da dose em que se obteve 100% de mortos para todos os grupos inoculados com quantidades superiores; **d** = log do fator de diluição; **n** = número de camundongos de cada dose; **r** =  $\sum$  do número de camundongos mortos que se encontram entre **X<sub>100</sub>** e **X<sub>0</sub>** inclusive.

O cálculo dos limites fiduciais para o valor da DL<sub>50</sub> foi realizado segundo as equações abaixo:

$$V_{(m)} = \frac{d^2}{n^2 (n-1)} \sum$$

O limite fiducial de 95% para m é aproximadamente:

$$m \pm t_{0,05} V_{(m)}$$

onde:  $t_{0,05}$  para  $\sum n-1$  graus de liberdade, considerando os grupos, cujas quantidades de peçonha provocam 0 e 100% de morte, excluindo esses valores.

#### 4.1.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE NECROSANTE

Grupos de cinco camundongos fêmeas (25-30g), com a pele do dorso previamente depilada, foram injetados pela via intradérmica com 50  $\mu$ l de

diferentes concentrações de peçonha diluída em NaCl 0,85% (75; 90; 105; 120  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ ), segundo o método de Kondo *et al* (1960) modificado por Ownby *et al* (1984).

Três dias após o inóculo, os animais foram sacrificados por inalação excessiva de éter. Após o sacrifício dos animais, a pele do dorso foi removida, estendida entre placas de vidro e a área necrótica medida.

A necrose foi quantificada pelo produto das medidas transversal e longitudinal da lesão. Uma dose mínima necrosante (DMN) foi definida como a menor quantidade de peçonha, em  $\mu\text{g}$ , que produz uma lesão necrótica de 5 mm de diâmetro.

#### 4.1.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A atividade hemorrágica foi determinada segundo o método de Kondo *et al* (1960) modificado por Ownby *et al* (1984).

Grupos de 5 camundongos fêmeas Swiss (25-30 g) foram inoculados, por via intradérmica, na pele do dorso previamente depilada, com diferentes doses de peçonha (10, 15, 30 e 45  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ ) diluída em 50  $\mu\text{l}$  de NaCl 0,85%. Após 1,5 h, os animais foram sacrificados por inalação excessiva de éter.

A hemorragia foi quantificada pelo produto das medidas transversal e longitudinal da lesão. Uma Dose Mínima Hemorrágica (DMH) foi definida como a menor quantidade de peçonha, em  $\mu\text{g}$ , que produz uma lesão hemorrágica de 10 mm de diâmetro.

## 4.2. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 4.2.1. ATIVIDADE COAGULANTE SOBRE O PLASMA

A atividade coagulante da peçonha de *B. erythromelas* foi avaliada segundo o método de Theakston & Reid (1983).

Alíquotas de 400 µl de plasma humano citratado foram mantidos a 37° C, por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de peçonha diluída em NaCl 0,85% nas concentrações de 7,94; 15,88; 31,76; 62,5; 125; 250 µg/mL e o tempo de coagulação cronometrado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Uma Dose Mínima Coagulante foi definida como a dose de peçonha, em µg, que coagula o plasma humano citratado normal em 60 segundos.

### 4.2.2. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

A atividade fosfolipásica foi determinada de acordo com o método de Marinetti (1965) com algumas modificações.

Gema de ovo diluída 1:90 em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, de modo que a absorvância a 925 nm, correspondesse a aproximadamente 0,6 foi utilizada como substrato. Várias concentrações de peçonha diluída em NaCl 0,85% (400; 800, 1200, 1600 e 2000 µg/mL, num volume de 50µL) foram adicionadas ao substrato e o decréscimo da absorvância decorrente da atividade fosfolipásica da peçonha

sobre o substrato foi acompanhado a cada 15 segundos, durante um intervalo de 2 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Micronal B 442.

Uma dose mínima fosfolipásica foi definida como a quantidade de peçonha capaz de reduzir 150 U de densidade ótica por minuto.

### 4.3. ENSAIOS IMUNOLÓGICOS “IN VITRO”

#### 4.3.1. IMUNOPRECIPITAÇÃO

Com o objetivo de comparar a capacidade de formação de imunoprecipitado como consequência da afinidade dos soros antibotrópicos poliespecífico comercial e monoespecífico pela peçonha de *B. erythromelas*, usou-se a metodologia de Kabat e Mayer (Kabat e Mayer, 1961, *apud* Russel & Boche, 1968).

Em um volume de 0,4 mL de soros antibotrópicos (comercial e monoespecífico) diluído 1:3, 1:4, 1:5, 1:8, 1:11, 1:22, 1:41, 1:91 foi adicionado 0,1 mL de salina contendo 110,6 µg de peçonha de *B. erythromelas*. Após a incubação a 37° C, por 1 hora, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 g, em centrífuga refrigerada Sigma 2K 15. O precipitado foi lavado com 2 mL de salina, por 3 vezes, ressuspenso em 1 mL de NaOH 1 N e lido em espectrofotômetro Varian

Techtron modelo 635, em 280 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.3.2. "WESTERN BLOTTING"

Esta técnica foi utilizada com o objetivo de avaliar o reconhecimento de diferentes frações antigênicas da peçonha de *B. erythromelas* pelos soros antibotrópicos comercial e monoespecífico.

A- Eletroforese em Gel de PoliAcrilamida (EGPA) com Dodecil Sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em Gel de PoliAcrilamida foi realizada de acordo com o método de LaemmLi (1970) modificado, utilizando gel de empilhamento 5,5% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e gel de resolução 12% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,75, nas proporções descritas abaixo:

TABELA I. Reagentes utilizados na preparação de géis em EGPA-DSS

Soluções	Gel de resolução (12%)	Gel de empilhamento (5%)
Acrilamida/bisacrilamida	1790 µl	280 µl
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	350 µl
Tris-HCl 1,5 M pH 8,75	1120 µl	-

DSS* 10%	45 µl	14 µl
Água deionizada	1520 µl	860 µl
TEMED**	5 µl	3 µl
Persulfato de amônia 10%	18 µl	6 µl

\*Dodecil sulfato de sódio; \*\* N, N, N' , N' Tetrametil etilenodiamina

Quinze microlitros de peçonha ou dos padrões de massa relativa (2 mg/mL) (Tabela II), previamente diluídos em tampão de amostra (Tris 12,4 mM; SDS 4%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,05%) e aquecidos a 100° C por 5 minutos, foram aplicados em cada poço do gel. O tampão de corrida empregado foi Tris 0,025 M- glicina 0,192 M- SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese processou-se a 15 mA e 93 V, por 1 hora e vinte minutos, à temperatura ambiente.

TABELA II. Padrões de peso molecular utilizados na EGPA-SDS: MW-SDS-200 Kit Sigma

PADRÕES	PESO MOLECULAR KDa
Anidrase Carbônica	29
Ovoalbumina	45
Albumina bovina	66
Fosforilase B	97
β-galactosidase	116
Miosina	205



Dois géis foram corridos: um gel foi utilizado como controle da separação eletroforética sendo corado com Coomassie e o outro foi mantido em tampão de transferência (Tris 50 mM – SDS 0,1%-metanol 20% ) a 4° C, por 12 horas.

#### B- Eletrotransferência

A transferência das frações proteicas contidas no gel de poliacrilamida foi realizada em sistema semi-seco em aparelho de transferência ATTA, utilizando tampão de transferência (Tris 0,025 M; glicina 0,192; Metanol 25%, pH8,3). A transferência processou-se em voltagem constante de 40 V, variação de corrente de 120-152 mA e à temperatura ambiente, durante 3 horas.

Após 3 horas, o gel de poliacrilamida foi corado como descrito anteriormente para certificação da transferência de todas as frações e a membrana de nitrocelulose foi incubada em tampão de bloqueio (Tris-HCl 50 mM- albumina de soro bovino 2%; pH 7,4) por 12 horas, a 4° C.

Procederam-se, então, às lavagens com tampão Tris-salina (TBS) tween 20 (0,05%), por cinco vezes, a cada cinco minutos. Após as lavagens, as fitas de nitrocelulose foram incubadas com os respectivos

soros poliespecífico comercial e monoespecífico, durante 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Após cinco lavagens durante 25 minutos, às fitas foi acrescentado Diaminobenzidina (0,3 g/mL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25%) e a reação, interrompida com água destilada.

#### 4.4. ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO

As atividades farmacológicas das misturas foram testadas em várias modalidades de ensaios e a capacidade neutralizante dos sorosantibotrópicos foi determinada e expressa como Dose Efetiva 50% (DE<sub>50</sub>) (Gutiérrez e cols, 1990a).

##### 4.4.1. NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

###### 4.4.1.1. Neutralização da Letalidade

Cinco doses letais 50% foram incubadas com várias proporções de soro antibotrópico comercial (39,11; 70,4; 127,11; 229 e 413 µL soro antibotrópico/mg peçonha) ou monoespecífico (21,52; 39,11; 72,35; 131 e 235 µL soro antibotrópico/mg peçonha). Após 30 minutos a 37° C, as amostras foram centrifugadas refrigerada Sigma 2K 215 e 500 µl do sobrenadante foram

inoculados em camundongos machos pesando 18 a 22 g (5 grupos de 4), pela via intraperitoneal. O grupo controle foi inoculado apenas com peçonha (5 DL<sub>50</sub>).

O número de animais mortos foi acompanhado durante 48 horas e a atividade tóxica foi calculada conforme descrito no item 3.1.1. A dose efetiva 50% foi definida como a razão  $\mu\text{l}$  soro/mg peçonha capaz de reduzir o número de mortes a 50% em uma determinada população.

#### *4.4.1.2. Neutralização da Atividade Necrosante*

A neutralização da necrose foi avaliada incubando-se duas Doses Mínimas Necrosantes (DMN) com diferentes proporções de soro antibotrópico poliespecífico comercial ou monoespecífico e peçonha (32; 51; 83; 140 e 242  $\mu\text{L}$  soro antibotrópico/mg peçonha). Após 30 minutos a 37° C, as amostras foram centrifugadas e 50  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foram injetados, via intradérmica, em camundongos fêmeas (5 grupos de 4). O grupo controle recebeu em 50  $\mu\text{l}$  contendo 2 DMN de peçonha.

A atividade necrosante foi determinada de acordo com o item 3.1.2. A dose efetiva 50% foi definida como a razão  $\mu\text{l}$  soro/mg peçonha capaz de reduzir em 50% a lesão necrótica induzida pela peçonha.

#### *4.4.1.3. Neutralização da Atividade Hemorrágica*

Para avaliar a neutralização da hemorragia causada pela peçonha de *B. erythromelas*, cinco Doses Mínimas Hemorrágicas (DMH) foram incubadas a 37° C, por 30 minutos, com soro antibotrópico poliespecífico comercial ou monoespecífico nas proporções de 10; 20; 40; 63; 100; 125 µl soro/mg peçonha. Após centrifugação, 50 µl do sobrenadante das amostras foram injetados, pela via intradérmica, em camundongos fêmeas (6 grupos de 4), sendo o grupo controle tratado com 5 DMH. de peçonha, em 50 µl.

A atividade hemorrágica foi determinada conforme descrito no item 3.1.3 e a dose efetiva 50% foi definida como a razão µl soro/mg peçonha capaz de reduzir em 50% a lesão hemorrágica induzida somente pela peçonha.

#### *4.4.2. NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS*

##### *4.4.2.1. Neutralização da Atividade Coagulante*

Esta técnica foi realizada, incubando-se duas Doses Mínimas Coagulantes de peçonha de *B. erythromelas* (DMC) com proporções crescentes de soro antibotrópico poliespecífico comercial (5,8; 12; 23,4; 29,2 e 35 µl soro antibotrópico/mg peçonha) ou monoespecífico (5,8; 7; 8,2; 9,3 e 10,5 µl soro antibotrópico/mg peçonha). O controle foi realizado determinando-se o tempo de

coagulação do plasma apenas na presença de 2 DMC de peçonha de *B. erythromelas*.

A atividade coagulante foi determinada segundo o item 3.2.1.. A capacidade neutralizante da atividade coagulante foi expressa como Dose Efetiva, definida como a razão  $\mu\text{l}$  soro antibotrópico/mg peçonha, onde o tempo de coagulação foi prolongado três vezes quando comparado com o tempo de coagulação das amostras de plasma incubadas somente com a peçonha (Gené e cols, 1989).

#### *4.4.2.2. Neutralização da Atividade Fosfolipásica*

Duas Doses Mínimas Fosfolipásicas (DMF) de peçonha de *B. erythromelas* foram incubadas com soro antibotrópico poliespecífico comercial ou monoespecífico (40; 70; 110; 170 e 250; 300 e 350  $\mu\text{l}$  soro antibotrópico/mg peçonha) num volume final de 50  $\mu\text{l}$  e a atividade fosfolipásica foi medida de acordo com o item 3.2.2. O controle positivo (100% de atividade fosfolipásica) foi obtido através da determinação da atividade fosfolipásica de 2 DMF de peçonha.

A dose efetiva 50% foi definida como a proporção  $\mu\text{l}$  soro antibotrópico /mg peçonha que reduziu em 50% a atividade da peçonha.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os resultados da determinação da DL<sub>50</sub> do “pool” de peçonha de *B. erythromelas* em camundongos, pela via intraperitoneal, estão apresentados na tabela III. A partir desses resultados foi calculada a DL<sub>50</sub>: 5,11 mg/kg, com limites fiduciais de 5,10 mg/Kg e 5,12 mg/Kg.

TABELA III Toxicidade da peçonha de *B. erythromelas*, inoculado por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos machos de 18-22 g.

DOSE (µg/camundongo)	MORTALIDADE(%)
35	0
65	50
120	75
220	75
395	100

A atividade necrosante da peçonha de *B. erythromelas* foi dose dependente nas concentrações testadas (Figura 1). A dose de peçonha capaz de induzir uma lesão necrótica de 25mm de diâmetro (DMN), calculada através da equação da

reta e obtida por regressão linear dos resultados da atividade necrosante, foi 78,38  $\mu\text{g}/\text{animal}$ .

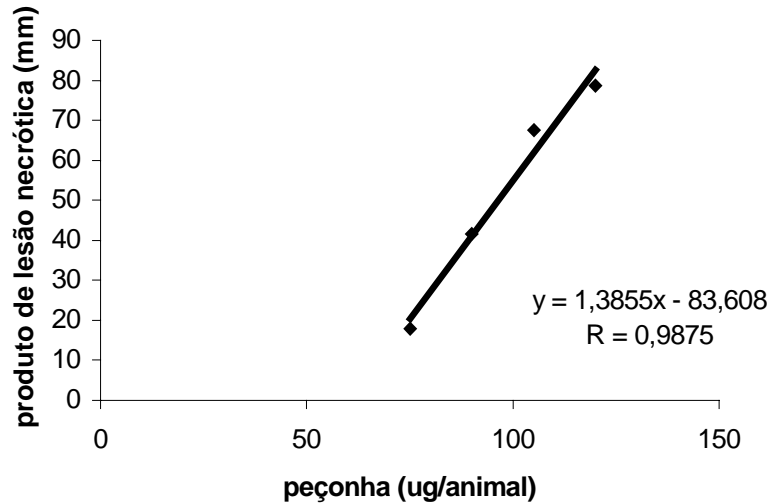


Figura 1. Atividade necrosante da peçonha de *B. erythromelas*.

Cinquenta microlitros de peçonha (75-120  $\mu\text{g}$ ) foram inoculados, via intradérmica, no dorso de camundongos fêmeas e, após 3 dias, o halo necrótico foi medido. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais.

A partir da curva dose-resposta de atividade hemorrágica da peçonha de *B. erythromelas* foi determinada a dose de peçonha capaz de induzir uma hemorragia com diâmetro de 100 mm (DMH): 22,119  $\mu\text{g}/\text{animal}$  (Figura 2).

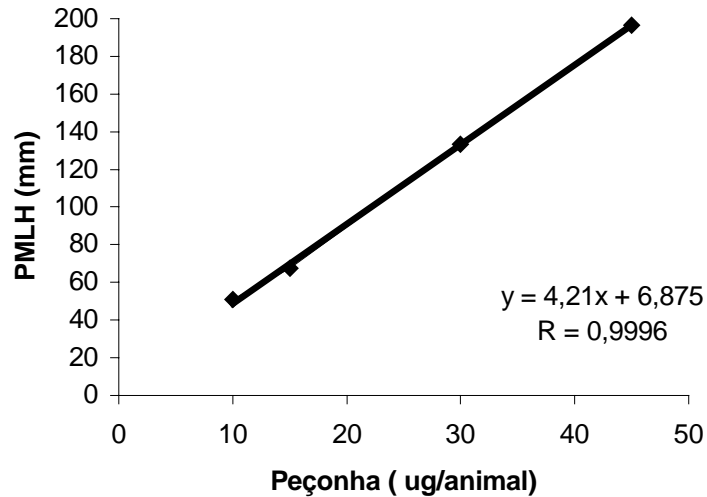


Figura 2. Atividade hemorrágica da peçonha de *B. erythromelas*. Cinquenta microlitros de peçonha (10-45 µg) foram inoculados, via intradérmica, no dorso de camundongos e, após 1,5 horas, o halo hemorrágico foi medido. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais.

## 5.2. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A dose mínima coagulante da peçonha de *B. erythromelas*, estimada a partir dos resultados apresentados na figura 3, foi 21,37 µg/ml. Uma relação linear foi obtida entre o logaritmo do tempo de coagulação e o logaritmo da concentração de peçonha.



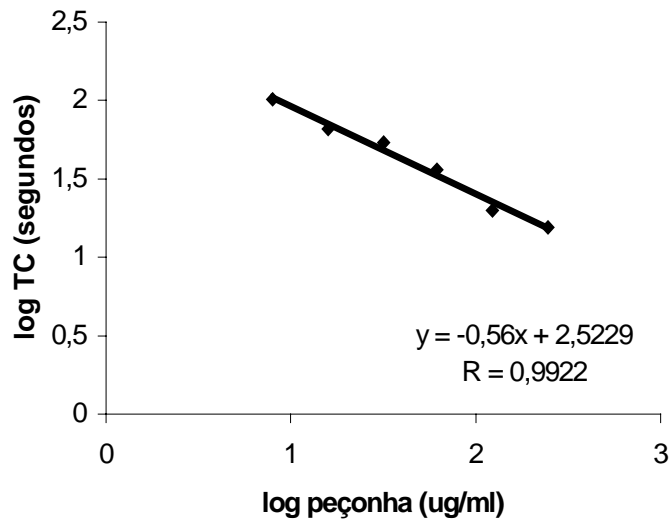


Figura 3. Atividade coagulante da peçonha de *B. erythromelas* sobre plasma humano. Cem microlitros de peçonha (7,94-250  $\mu$ g) foram incubados com 400 $\mu$ l de plasma humano citratado e o tempo de coagulação cronometrado. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

A peçonha de *B. erythromelas* apresentou uma atividade fosfolipásica específica de 2848 U/mg, obtida a partir dos resultados apresentados na figura 4. A dose mínima fosfolipásica, quantidade de peçonha que apresenta atividade de 150 U/min foi 0,05 mg.

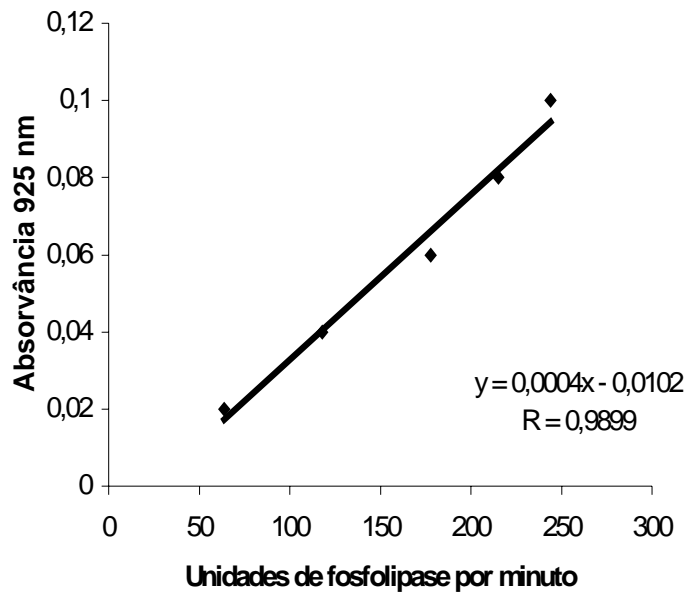


Figura 4. Atividade fosfolipásica da peçonha de *B.erythromelas*. Cinquenta microlitros de peçonha (20-100 $\mu$ g) foram adicionados ao substrato preparado com gema de ovo diluída em tampão Tris-HCl, pH 8,0 e o decaimento da absorvância decorrente da atividade fosfolipásica da peçonha sobre o substrato foi acompanhado a cada 15 segundos, durante um intervalo de 2 minutos.

Os resultados das atividades da peçonha de *B. erythromelas* estão sumarizados na tabela IV.

TABELA IV. ATIVIDADES DA PEÇONHA DE *B. erythromelas*

Atividade	Peçonha de <i>B.erythromelas</i>
DL <sub>50</sub> (mg/kg)	5,11(5,10-5,12)*
DMH (µg/animal)	22,119
DMN (µg/animal)	78,38
DMC (µg/ml)	21,37
DMF (mg)	0,05

DL<sub>50</sub>- Dose letal 50%, (\*) Limite de confiabilidade de 95%, DMH- Dose Mínima Hemorrágica, DMN- Dose Mínima Necrosante, DMC- Dose Mínima Coagulante, DMF- Dose Mínima Fosfolipásica.

### 5.3. NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para avaliar a neutralização da toxicidade da peçonha de *B. erythromelas* foi determinada a razão µl antiveneno/mg peçonha capaz de reduzir a toxicidade em 50%, sendo necessários 85,2µl do antiveneno comercial e 51,2µl do antiveneno monoespecífico para neutralizar 1 mg de peçonha.

A Dose Efetiva 50% para a atividade hemorrágica foi 49,21 µl antiveneno/mg peçonha para o antiveneno comercial e 26,95 µl antiveneno/mg peçonha para o monoespecífico. Na dose de 125 µl, não havia qualquer sinal de área hemorrágica na pele do dorso dos animais que receberam o antissoro botrópico monoespecífico, por outro lado, nos animais em que foi injetado o antissoro

comercial, foi marcante a presença de vasos superficiais com hiperemia. Essas doses foram encontradas a partir da regressão linear obtida a partir dos dados mostrados na Figura 5.

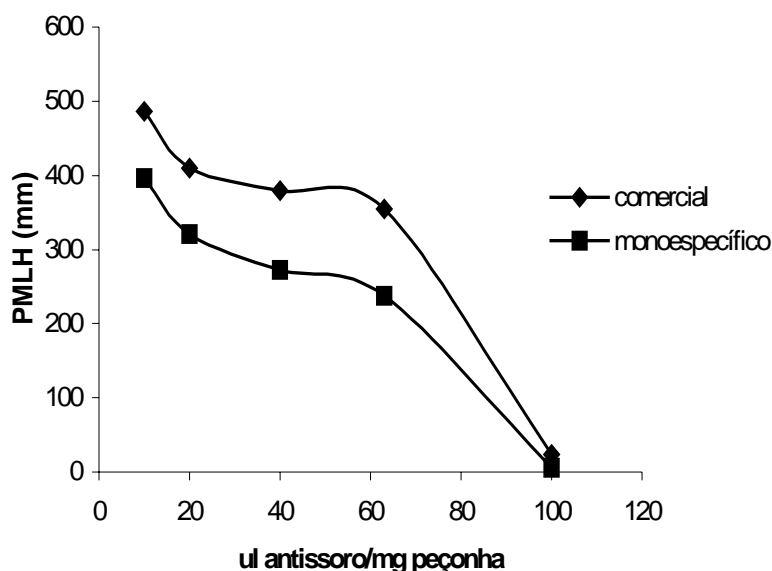


Figura 5. Neutralização da atividade Hemorrágica da peçonha de *B.erythromelas*. Cinco Doses Mínimas Hemorrágicas (110,6 µg) foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos com várias proporções de antiveneno comercial ou monoespecífico (10; 20; 40; 63; 100; 125 µl antiveneno/mg peçonha).As misturas foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante inoculado, via intradérmica, no dorso de camundongos e após 1,5 horas, o halo hemorrágico foi medido. Os animais controle receberam apenas peçonha. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais.

A atividade necrosante foi melhor neutralizada pelo antiveneno monoespecífico, cuja dose Efetiva 50% foi na ordem de 7,34 µl antiveneno/mg peçonha, enquanto para o antiveneno comercial foram necessários 9,50 µl de antiveneno para neutralizar 1 mg de peçonha. Esses resultados foram obtidos a partir de regressão linear dos resultados da Figura 6.

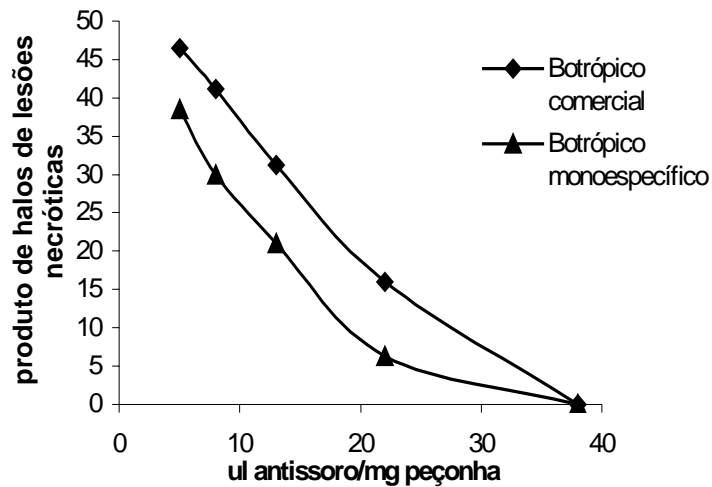


Figura 6. Neutralização da atividade necrosante da peçonha de *B.erythromelas*. Duas Doses Mínimas Necrosantes (156,76 µg) foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos com várias proporções de antiveneno comercial ou monoespecífico (5; 8; 13; 22 e 38 µl antiveneno/mg peçonha).As misturas foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante inoculado, via intradérmica, no dorso de camundongos e após 72 horas, o halo necrótico foi medido. Os animais controle receberam apenas peçonha. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais.

## 5.4. NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A atividade coagulante da peçonha de *B. erythromelas* foi bem neutralizada pelo antiveneno comercial, cuja Dose Efetiva foi 12,61  $\mu\text{l}$  antiveneno/mg peçonha (Figura 7). No entanto, foi ainda melhor neutralizada pelo antiveneno monoespecífico, sendo necessários apenas 6,35  $\mu\text{l}$  de antiveneno para neutralizar 1 mg peçonha, como mostra a Figura 8. A neutralização da atividade fosfolipásica da peçonha de *B. erythromelas* pelos antivenenos comercial e monoespecífico está representada nas figuras 9 e 10, respectivamente. As doses efetivas 50% dos antivenenos comercial e monoespecífico foram determinadas a partir das equações das retas extraídas das figuras 11 e 12, respectivamente. Foram necessários 285  $\mu\text{l}$  de antiveneno botrópico comercial para neutralizar 1mg de peçonha, enquanto que para o monoespecífico, apenas 166  $\mu\text{l}$ .

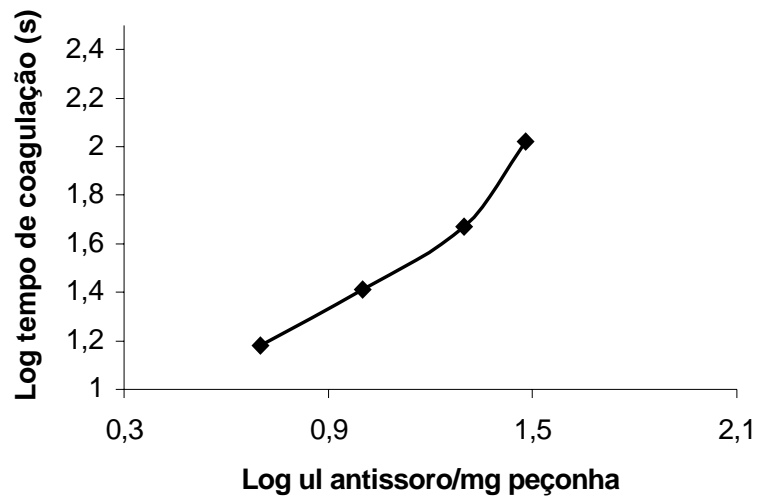


Figura 7. Neutralização da atividade coagulante da peçonha de *B.erythromelas* pelo antiveneno comercial. Duas Doses Mínimas Coagulantes (42,75  $\mu$ g) foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos com várias proporções de antiveneno comercial (5; 10; 20 e 30  $\mu$ l antiveneno/mg peçonha).As misturas foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi adicionado ao substrato (plasma humano citratado) e o Tempo de Coagulação cronometrado. Nos tubos controle havia apenas peçonha e substrato. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 tubos.



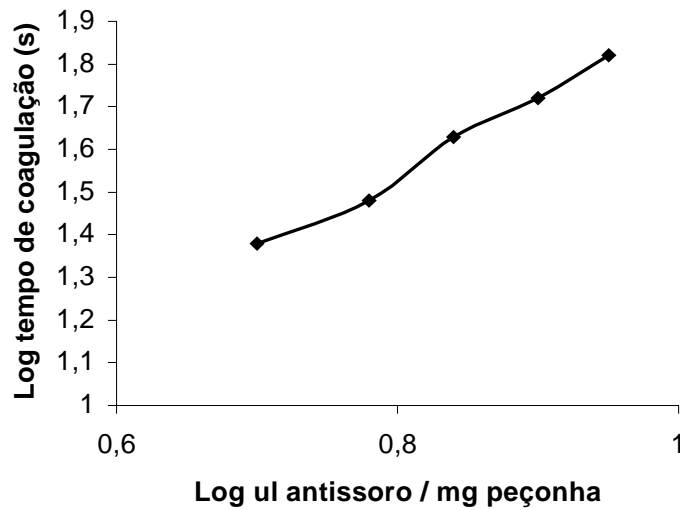


Figura 8. Neutralização da atividade coagulante da peçonha de *B.erythromelas* pelo antiveneno monoespecífico. Duas Doses Mínimas Coagulantes ( $42,75 \mu\text{g}$ ) foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos com várias proporções de antiveneno monoespecífico (5; 6; 7; 8 e  $9 \mu\text{l}$  antiveneno/mg peçonha).As misturas foram centrifugadas a  $10000 \text{ g}$  por 10 minutos, o sobrenadante foi adicionado ao substrato (plasma humano citratado) e o Tempo de Coagulação cronometrado. Nos tubos controle havia apenas peçonha e substrato. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 tubos.

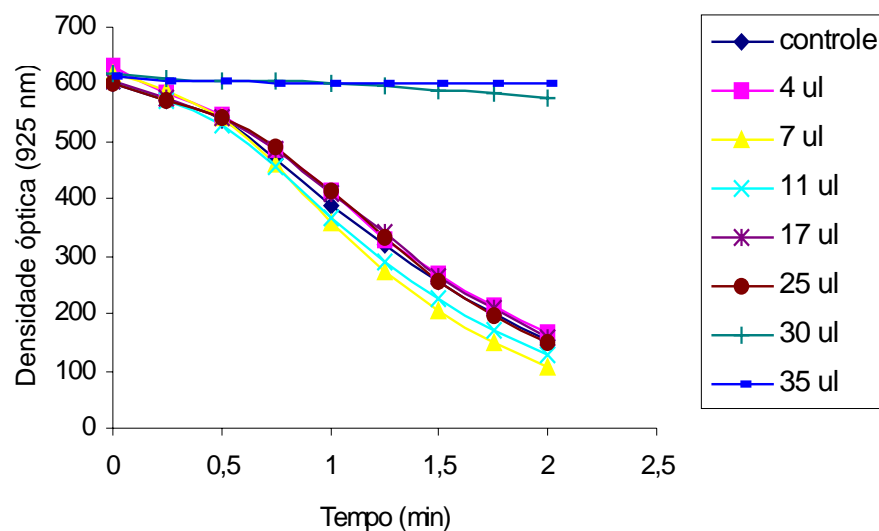


Figura 9. Neutralização da atividade fosfolipásica da peçonha de *B.erythromelas*. pelo antiveneno comercial. Duas Doses Mínimas fosfolipásicas (100  $\mu$ g) foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos com várias proporções de antiveneno monoespecífico (40; 70; 110; 170; 250; 300 e 350  $\mu$ l antiveneno/mg peçonha).As misturas foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi adicionado ao substrato preparado com gema de ovo diluída em tampão Tris-

HCl, pH 8,0 e o decaimento da absorvância decorrente da atividade fosfolipásica da peçonha sobre o substrato foi acompanhado a cada 15 segundos, durante um intervalo de 2 minutos.

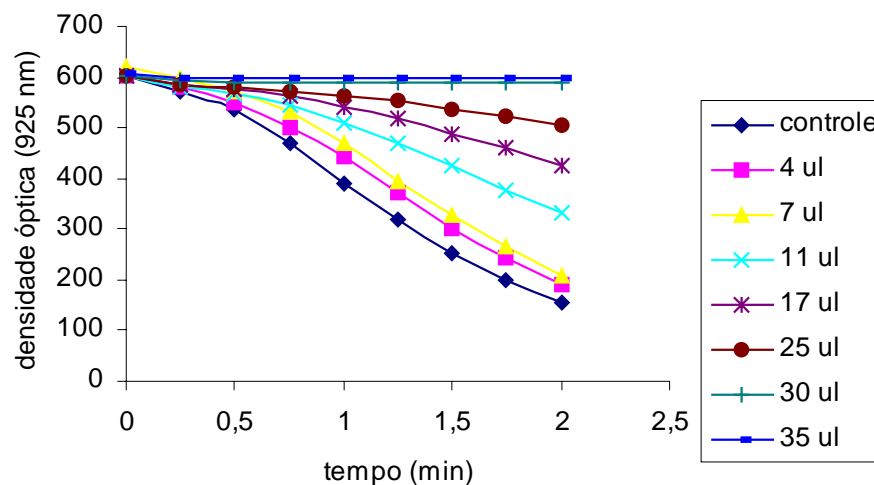


Figura 10. Neutralização da atividade fosfolipásica da peçonha de *B.erythromelas*. pelo antiveneno monoespecífico. Duas Doses Mínimas fosfolipásicas (100 µg) foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos com várias proporções de antiveneno monoespecífico (40; 70; 110; 170; 250; 300 e 350 µl antiveneno/mg peçonha).As misturas foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi adicionado ao substrato preparado com gema de ovo diluída em tampão Tris-HCl, pH 8,0 e o decaimento da absorvância decorrente da atividade fosfolipásica da peçonha sobre o substrato foi acompanhado a cada 15 segundos, durante um intervalo de 2 minutos.

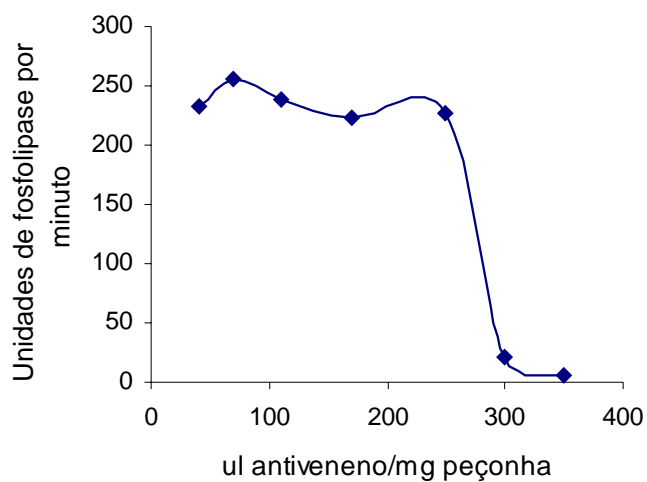


Figura 11. Dose efetiva 50% do antiveneno comercial para a atividade fosfolipásica da peçonha de *B.erythromelas*. A equação obtida por regressão polinomial que permitiu calcular a Dose Efetiva 50% foi:  $Y = -0,00746 x^2 + 1,0107x + 198,48$

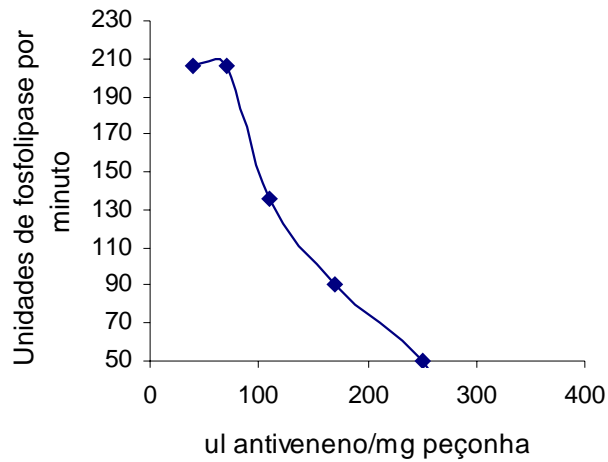


Figura 12. Dose efetiva 50% do antiveneno monoespecífico para a atividade fosfolipásica da peçonha de *B.erythromelas*. A equação obtida por regressão polinomial que permitiu calcular a Dose Efetiva 50% foi:  $Y = -0,7072x + 230,11$

## 5.5 IMUNOPRECIPITAÇÃO

Os resultados da Figura 13 revelaram que o antiveneno monoespecífico apresenta uma capacidade maior de se complexar com os antígenos e formar imunocomplexos, enquanto que o comercial não chega a se complexar com todos os antígenos presentes na peçonha, provavelmente devido à ausência de anticorpos específicos.

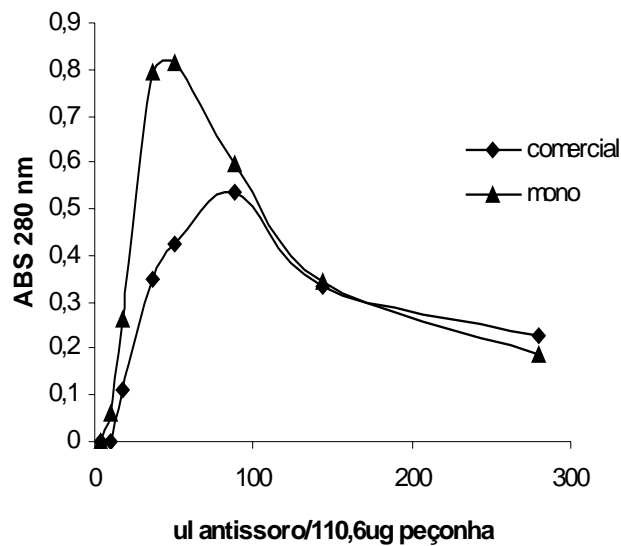


Figura 13. Imunoprecipitação da peçonha de *B.erythromelas* obtida a partir da interação antígeno-anticorpo entre os antivenenos comercial e mono específico. A várias diluições dos antivenenos (1:3, 1:4, 1:5, 1:8, 1:11, 1:22, 1:41, 1:91) foram adicionados 110,6 µg de peçonha de *B. erythromelas* diluídos em 0,1 ml de salina. As misturas foram incubadas a 37° C, por 1 hora. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2000 g, em centrífuga refrigerada. O precipitado foi lavado com 2 ml de salina, por 3 vezes, ressuspensão em 1 ml de NaOH 1 N e lido em 280 nm. Cada ponto representa a média entre 3 tubos.

## 5.6. SDS-PAGE

A análise da peçonha de *B. erythromelas* por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras, revelou sete diferentes bandas, com indicado na figura 14. Estas bandas estão compreendidas entre 16 e 71 kd.

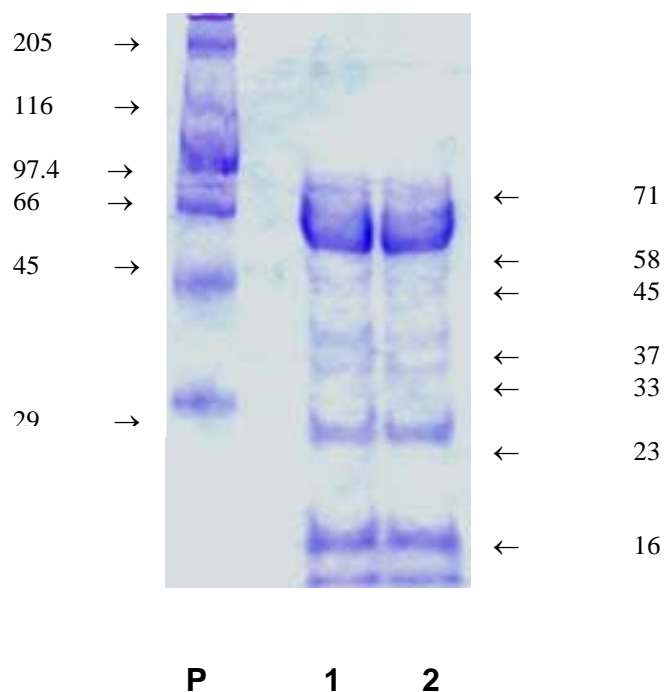


Figura 14. Perfil eletroforético da peçonha de *B. erythromelas* (40 µg/poço) em gel de poliacrilamida –SDS em sistema redutor (1 e 2). (P) Proteína padrão: Miosina (205.000); β-galactosidase (116.000); Fosforilase B (97.400); Albumina bovina (66.000); Ovoalbumina (45.000) e Anidrase carbônica (29.000).



## 5.7. "WESTERN BLOTTING"

A determinação da reatividade existente entre os antivenenos botrópicos (comercial e monoespecífico) e a peçonha de *B.erythromelas*, representada na figura 15, indicou um reconhecimento antigênico mais forte pelo antiveneno monoespecífico, principalmente na faixa de maior concentração proteica (58.000) da peçonha, embora tenha havido ligação cruzada de intensidade fraca, por parte do antiveneno comercial. As mesmas bandas podem ser encontradas no perfil eletroforético dessa peçonha.



Figura 15. Análise de imunoblotting comparando o reconhecimento antigênico dos antivenenos comercial (1), monoespecífico (2) e soro equino pré-imune. Após submetida a eletroforese 12,5%, peçonha de *B. erythromelas* foi transferida à nitrocelulose e revelada com os antivenenos citados anteriormente numa diluição de 1/16.000.

## 6. DISCUSSÃO

Peçonhas de serpentes variam enormemente quanto à sua composição bioquímica e seu perfil farmacológico. Estas diferenças têm sido repetidamente descritas, não somente entre gêneros, mas também dentro de uma mesma espécie, com extensivas variações geográficas e ontogênicas (Gutiérrez *et al.* 1990). Segundo Warrel (1997), as disparidades na eficácia do soro antiofídico são provavelmente baseadas na variabilidade antigênica de componentes entre espécies.

Uma vez que os soros são produzidos usando diferentes misturas imunizantes de peçonha, um soro efetivo contra uma peçonha numa região particular pode não ser efetivo contra uma peçonha diferente em outro país ou região, como tem sido demonstrado em muitos casos (Theakston e cols., 1995, 1996). Estas observações enfatizam a relevância de avaliação da eficácia neutralizante dos soros contra as peçonhas mais importantes de cada país ou região.

A variabilidade das peçonhas apresenta implicações práticas na produção e controle de soros antivenenos, uma vez que a capacidade neutralizante de um soro contra uma peçonha em particular, depende sobretudo das peçonhas incluídas na mistura antigênica inoculada nos animais produtores (Gutiérrez *et al.*, 1988). Por isso, existe a recomendação de que os soros antivenenos, na medida do possível, sejam produzidos em cada país, usando as peçonhas coletadas naquela região geográfica particular (WHO, 1981)

No Brasil, o soro antiofídico poliespecífico comercial, produzido a partir da inoculação das peçonhas de *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%), é distribuído pelo Ministério da Saúde para todas as regiões do Brasil, não estando incluída, portanto, a peçonha da principal serpente ofídica envolvida nos envenenamentos da região Nordeste: *B. erythromelas*.

Nesse trabalho foram comparados dois soros antiofídicos, poliespecífico comercial e monoespecífico, contra a serpente *B. erythromelas*. A necessidade desse estudo advém da existência de vários trabalhos que demonstraram a baixa capacidade neutralizante do soro antiofídico comercial em neutralizar a peçonha de *B. erythromelas* (Zappellini, 1991; Ferreira *et al.*, 1992) e pelo fato dessa serpente ser, praticamente, a única causadora de acidentes ofídicos em vários estados do Nordeste, especialmente Pernambuco. Embora essa propriedade tenha sido demonstrada desde 1991, até então não havia sido estudada uma alternativa para sanar esse problema.

Para o estudo de neutralização de peçonhas por soros, têm sido empregados dois tipos básicos de metodologia, em experimentos que se utilizam de animais: 1) incubação das misturas de peçonha e do soro antiveneno antes da injeção, e 2) injeção de peçonha e do soro antiveneno na forma independente. Modelos animais têm sido desenvolvidos na maior parte dos laboratórios ao redor do mundo (WHO, 1981), embora muitas tenham sido as tentativas de criar estudos *in vitro* com o objetivo de providenciar benefícios de custo e reprodutibilidade comparada aos ensaios *in vivo* (Heneine *et al.*, 1998; Heneine *et al.*, 1995; Olórtegui *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 1988).

Ratanabanankoon & Sunthornandh (1994) encontraram boa correlação entre o método de ELISA e os ensaios que utilizam camundongos para determinação da potência, porém, uma adequada avaliação de neutralização de soros antivenenos precisa incluir em seu protocolo, além de métodos *in vitro*, atividades biológicas como hemorrágica, necrosante, defibrinogenante, coagulante e dose letal (Rojas *et al*, 1990).

Experimentos do tipo pré-incubação foram adotados, uma vez que, para fins comparativos, foi necessário promover *in vitro* a neutralização total da peçonha pelos dois soros antivenenos em questão, cujos resultados não dependem da farmacocinética da peçonha ou do soro (Rojas *et al*, 1990), o que não é observado em estudos de injeção independente, sendo a neutralização apenas parcial na grande maioria dos casos (Gutiérrez, 1987).

A atividade hemorrágica da peçonha de *B. erythromelas*, determinada nesse trabalho, concorda com os resultados de Valença (1997) e é similar à encontrada por Sanchez *et al*. (1992), embora esses últimos tenham utilizado ratos ao invés de camundongos, enquanto Vasconcelos (1996), caracterizando a peçonha de exemplares provenientes da Bahia, encontrou atividade hemorrágica quase três vezes menor.

A análise da letalidade (DL<sub>50</sub>) mostrou que o “pool” da peçonha de *B. erythromelas* estudado é 1,7 vezes menos tóxico do que o utilizado por Zappellini (1991) e duas vezes mais tóxico do que o utilizado por Vasconcelos (1996).

A atividade que apresentou maior variação foi a coagulante, talvez pela presença de filhotes em alguns “pools”, que reconhecidamente possuem atividade coagulante muito mais intensa que os adultos (Furtado *et al.*, 1991). O “pool” da

peçonha de *B. erythromelas* estudado neste trabalho apresentou uma atividade coagulante, aproximadamente, quatorze vezes menor do que a amostra avaliada por Zapellini (1991) e 1,9 vezes menor do que a utilizada por Vasconcelos (1996).

Por outro lado, a amostra avaliada nesse trabalho foi 1,8 vezes mais necrosante do que a estudada por Vasconcelos (1996).

Diferenças como essas podem ser explicadas por variações intraespecíficas decorrentes da distribuição geográfica da serpente, armazenagem da peçonha, etc (Daltry, 1995).

Os resultados encontrados neste trabalho revelam uma notável diferença na neutralização de todas as atividades avaliadas na peçonha de *B. erythromelas* pelos soros antibotrópicos poliespecífico comercial e monoespecífico. Todas as atividades testadas foram neutralizadas por ambos soros, porém as quantidades necessárias para a neutralização foram, aproximadamente, o dobro para o soro antibotrópico poliespecífico comercial quando comparado ao soro monoespecífico.

Nossos achados concordam com os de Gutiérrez (1988) que, estudando a neutralização do soro monovalente anti-*B. asper*, demonstrou que o referido soro foi mais eficaz que o antiveneno polivalente na neutralização das atividades letal e hemorrágica.

Zapellini (1991), utilizando o soro antibotrópico poliespecífico comercial produzido pelo Instituto Butantan, obteve resultados que apontaram para a ineficiência do referido soro na neutralização da letalidade, atividade coagulante e hipotensão causados pela peçonha de *B. erythromelas*. Os resultados da neutralização da atividade coagulante por nós encontrados diferem fortemente daqueles demonstrados por esta autora, que precisou utilizar uma dose de soro

poliespecífico comercial trinta vezes maior do que a recomendada pelo Instituto Butantan, pois ficou evidenciado que a atividade coagulante da peçonha de *B. erythromelas* pode ser neutralizada pelo soro poliespecífico comercial em doses quase duas vezes maiores do que com soro antibotrópico monoespecífico.

O que poderia explicar essa disparidade é o fato de que a peçonha utilizada por Zappellini apresentou uma atividade coagulante muito mais alta quando comparada com o “pool” usado em nossos experimentos.

Dos Santos *et al* (1992), estudando a neutralização da peçonha de *B. jararacussu*, demonstrou que o soro polivalente antibotrópico-crotálico foi três vezes mais potente que o soro antibotrópico específico em neutralizar a ação miotóxica e duas vezes mais potente na neutralização da letalidade e na ação coagulante desta peçonha. De acordo com esses autores, essa peçonha se constituiu num fraco imunógeno. Esses resultados concordam com os obtidos por Gutiérrez (1985), que, para obter uma melhor resposta imune à peçonha de *B. asper*, precisou usar uma mistura antigênica com as peçonhas de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus* e *Lachesis muta*.

A despeito de ser o único constituinte antigênico na produção do soro antibotrópico monoespecífico, a peçonha de *B. erythromelas* demonstrou ser um bom imunógeno. O soro contra esta serpente demonstrou ser duas vezes mais efetivo na neutralização dessa peçonha do que o poliespecífico comercial, cujo “pool” conta com cinco exemplares botrópicos.

A análise do reconhecimento antigênico através da técnica de “imunoblotting” indicam que ambos soros (poli e monoespecífico) identificam todas as proteínas da peçonha de *B. erythromelas*, porém o reconhecimento por parte do soro

antibotrópico monoespecífico é significativamente maior, devido à intensidade das bandas, do que o reconhecimento pelo soro poliespecífico comercial.

Antígenos multirreativos solúveis, em presença de seus anticorpos correspondentes, formam um precipitado, desde que a concentração dos reagentes, de acordo com a lei da ação das massas, permita a constituição de complexos em concentração suficiente para atingir o ponto de precipitação ou insolubilização (Calich, 1988). Os resultados encontrados na imunoprecipitação da peçonha de *B. erythromelas* pelos soros antibotrópicos poliespecífico comercial e monoespecífico demonstraram uma melhor reatividade entre a peçonha e o antiveneno monoespecífico, confirmando a tendência de uma neutralização mais eficaz dessa peçonha pelo referido soro, evidenciada nos demais experimentos realizados nesse trabalho.

As diferenças na capacidade neutralizante existentes entre os dois soros utilizados nesse trabalho poderiam ser explicadas assumindo uma maior avidéz do soro antibotrópico monoespecífico pelos diferentes determinantes antigênicos presentes na peçonha de *B. erythromelas*.

Embora a soroterapia seja o único tratamento de eficácia comprovada nos casos de envenenamento ofídico, este possui o inconveniente de introduzir altas concentrações de proteína estranha às vítimas, o que leva ao aparecimento de reações alérgicas (Theakston & Pug, 1987; Hering *et al.*, 1991).

Segundo Aquino (1999), a letalidade decorrente dos acidentes botrópicos ocorridos no estado de Pernambuco, no período de 1995 a 1997, foi de apenas 0,72%, o que sugere que o soro antibotrópico poliespecífico comercial é eficiente, pelo menos nos casos leves (60%) e moderados (30%), ainda que tenha menor

capacidade neutralizante quando comparado ao soro antiofídico monoespecífico. Esses achados sugerem que o soro antiofídico monoespecífico poderia ser utilizado na mesma potência que o soro comercial vem sendo utilizado até então, e uma vez que este é duas vezes mais potente, as doses envolvidas poderiam ser reduzidas à metade.

A redução da dose de soro antiofídico empregada nas vítimas de acidentes ofídicos implicaria uma notável redução de custos e ainda poderia minimizar a incidência de reações alérgicas decorrentes da utilização de proteínas heterólogas (Theakston & Pug, 1987; Hering *et al.*, 1991).

A eficiência da neutralização da peçonha circulante no paciente depende também do tempo decorrido entre o acidente ofídico e o início da soroterapia (Barral Neto e cols. 1991, Jorge e Ribeiro 1990, Barraviera e Pereira 1994, White 1995, Chippaux e cols. 1996, Russel 1996).

Aquino (1999), estudando a epidemiologia e clínica dos acidentes ofídicos no estado de Pernambuco, relatou o deslocamento de pacientes picados por serpentes, de outros municípios e de outros estados para o Recife, resultando num aumento do tempo entre o momento da picada e o início da soroterapia, que está estreitamente relacionado com a gravidade dos acidentes.

Uma vez que o soro antiveneno tem a capacidade de redistribuir a peçonha dos tecidos para o sangue (Rocha, 1998), seria indiscutivelmente mais segura a utilização de um soro que tivesse uma maior capacidade de redistribuição, através da neutralização mais eficiente dos antígenos presentes nessa peçonha.

Nos casos graves, a adoção do soro antiofídico monoespecífico, nas doses atualmente preconizadas (acima de 10 ampolas), resultaria em um melhor



prognóstico dos pacientes, reduziria o período de internação e, conseqüentemente, o custo de atendimento e aceleraria o processo de recuperação, o que possibilitaria ao paciente retomar suas atividades de trabalho em menos tempo.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o soro antitoxinotrópico monoespecífico é uma alternativa eficaz para os pacientes picados por *B. erythromelas* na região Nordeste.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. Pontos de Vista Básicos na Terapêutica do Ofidismo.

Mem. Inst. Butantan, 1935.

ASSAKURA, M. T. REICHL, A. P; ASPERTI, M. C.; Isolation of the Major Proteolytic Enzyme from the Snake *Botrops moojeni* (caissaca) Toxicon, v. 23, pp. 691-706, 1985.

BARRAL NETO, M.; SCHRIEFFER, A.; BARRAL, A.; ALMEIDA, A. R. P. e MANGABEIRA, A. Serum Levels of Botropia Venom in Patients without Antivenom Intervention. Am J. Trop Med Hyg 45 (6) 751-754, 1991.

BARRAVIERA, B. e PEREIRA, P. C. M. Acidentes por Serpentes do Gênero *Botrops*. In Barraviera, B. Venenos animais. 1ª ed. Rio de Janeiro, Ed. de Publicações Científicas, Cap. 19, p. 261-280, 1994

BJARNSON, J. B. & FOX, J. W. Hemorrhagic Toxins from Snake Venoms. J. Toxinol – Toxin Reviews, 7 (2): 121-209, 1988-1989.

BJARNSON, J. B. & FOX, J. W. Hemorrhagic Metalloproteinases from Snake Venoms. Pharm. & Therap. 62, 325-372, 1994.

BORGES , R. C. Serpentes Peçonhentas Brasileiras, 1999

BRUNO SOCRENSEN. Animais Peçonhentos pp, 22-27, 1990

CARDOSO, J. L. C. Introdução ao Estudo dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: Plantas venenosas e animais peçonhentos; Schvartsman, S., 2<sup>a</sup> ed, 139-187, 1992.

CARDOSO, J. L. C. Bothropic Accidents. A review. Mem. Inst. Butantan 52, 43-44, 1990.

CARDOSO, J. L. C. Acidentes por Animais Peçonhentos na Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos – comentários e sugestões, United Nations development programe, 1993.

CESAPI, E. & BOQUET, P. Recherches sur les Antigènes des Venins et les Sérums Antivenimeux. Ann. Inst. Pasteur, 58: 6-25, 1937.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAM, V. & WHITE, J. Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. Toxicon, vol. 29, nº 11, pp. 1279-1303, 1991.

CHIPPAUX, J. P., AMADI-EDDINE, S., FAGOT, P. et al. Therapeutic Approach to Snake Bite in Tropical Africa. In: Bom, C. e Goyffon, M., Envenomming and their Treatments, Lyon. p. 247-253, 1996.

CHIPPAUX, J. P. and GOYFFON, Venoms, Antivenoms and Immunotherapy, Toxicon, 36, nº 6, 1998.

CORDEIRO, C. L. & HOGE, A. R. Contribuição ao Conhecimento das Serpentes do Estado de Pernambuco. Mem. Inst. Butantan, 37: 261-290, 1973.

DEMPFLE, C. E; KOHL, R; HARENBERG, J; KIRSCHTEIN, W; SCHLAUCH, D. and HEENE, D. L. Coagulopathy after Snake Bite by *Botrops neuwiedi*: Case Report and Results of in Vitro Experiments. Blut, 61: 369-374, 1990.

FERREIRA, M. L.; MOURA DA SILVA, A. M.; FRANÇA, F.O.S.;  
CARDOSO, J. L. and MOTA, I. Toxic Activities of Venoms from nine  
*Bothrops* and their Correlation with Letality and Necrosis. Toxicon,  
30 (22): 1603-1608,1992 b.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, Ministério da Saúde. Manual de  
Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos.  
pp. 21-25, 1998.

FURTADO, M. F. D. MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S. and  
ANTÔNIO, L. C. Comparative Study of Nine *Bothrops snake*  
Venoms from Adult Female Snakes and their Offspring. Toxicon, 29  
(2): 219-226,1991.

GENÉ, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L.  
Comparative Study on Coagulant, Disfibrinating, Fibrinolytic and  
Fibrinogenolytic Activities of Costa Rican Crotaline Snake Venom  
and Their Neutralization by Polyvalent Antivenom. Toxicon, 27, 841-  
848.

GUTIERRÉZ, J. M; AVILA, C.; CAMACHO, Z. and LOMONTE, B,  
Ontogenic Changes in the Venom of the Snake *Lachesis muta*  
*atenophryo* (Bushmaster) from Costa Rica. Toxicom 28, 419-426,  
1990.

GUTIÉRREZ, J. M., Ávila, C., Rojas, E. and CERDAS, L) An  
Alternative *in vitro* Method for Testing the Potency of Polyvalent  
Antivenom: Development of Immune Response in Horses and  
Neutralizing Ability. Rev. Biol. Trop. 36, 511-517, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M; CHAVES F., Rojas E. et al. Production de  
Monovalent Anti-*Bothrops asper* Antivenom: Development of Imune  
Response in Horses and Neutralizing Ability. Rev. Biol. Trop. 36  
(2b), p. 511-517, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G. and CERDAS, L. Ability of a Polivalent  
Antivenom of *Lachesis muta melanocephala*, a New Costa Rican  
Subspecies of the Busmaster Toxicon, vol 25, nº 7, pp. 713-720,  
1987.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G. ; LOMONTE, B.; CHAVES, GENÉ, J. A.; CHAVES, F.; ALVORADO, J.; ROJAS, E. Standardization of Assays for Testing the Neutralizing Ability of Antivenoms. *Toxicom*, 28, 1127-1129, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; ÁVILA, C.; ROJAS, E. and CERDAS, L. An alternative *in vitro* Method for Testing the Potency of the Polyvalent Antivenom Produced in Costa Rica. Toxicon 21, pp. 739-752, 1983.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G. and CERDAS, L. Neutralization of Proteolytic and Hemorrhagic Activities of Costa Rica Snake Venoms by a Polyvalent Antivenom, Toxicon, vol. 23, pp. 887-893, 1985.

HAWGOOD, B. J., Doctor Albert Calmette 1863 – 1933: Founder of Antivenomous Serotherapy and of Antituberculous BCG Vaccination, Toxicon, vol. 37, pp. 1241-1258, 1999.

HENEINE, L. G. D.; CARVALHO, A. D.; BARBOSA, F. C. and DOS SANTOS, M. R. A. Development of an ELISA to Assess the Potency

of Horse Therapeutic Polyvalent Antibiotic Antivenom. Toxicon. Vol. 10, pp. 1363-1370 *Bothrops erythromelas*, 1998.

HENEINE, L. G. D.; BARBOSA, C.F.; RODRIGUES, R.J.; OLÓRTEGUI, C.C. and SANCHEZ, E.F. Determination of the Neutralizing Potency of Horse Antivenom Against Bothropic and Crotalic Venoms by Indirect Enzyme Immunoassay. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, vol. 28, pp. 1077-1080, 1995.

JORGE, M. T. e RIBEIRO, L. Acidentes por Serpentes do Brasil. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 36, n. 2, 1990.

KABAT, E. A. and MAYER, M. M. Experimental Immunochemistry, 2<sup>nd</sup> ed. Springfield (apud Russel, F. E. and Boche, R. D. Passive Hemagglutination Studies with Snake Venom and Antivenin. Toxicon, vol 6, pp. 125-130, 1968), 1961.

KAMIGUTI, A.S. & SANO MARTINS, I. S. South American Snake Venoms Affecting Haemostasis. J. Toxicol – Toxin Reviews, 14 (3): 359-374, 1995.



KAMIGUTI, A. S.; MATSUNAGO, S.; SPIR, M.; SANO MARTINS, I. S. and NAHAS, L. Alteration of the Blood Coagulation System After Accidental Human Inoculation by *Bothrops jararaca* Venom. Braz. J. Med. Biol. Res., 19: 199-204, 1986.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C.; THEAKSTON, R. D. C. Coagulopathy and Hemorrhagic in Human Victims of *Bothrops jararaca* Envenoming in Brazil. Toxicon 29, 961-972, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970.

LANDON, J.; RAWAT, S.; LAING, G.; SMITH, D.C.; THEAKSTON, D. A New Antivenom to Treat Eastern Coral Snake (*Micrurus fulvius fulvius*) Envenoming. Toxicon, vol. 32, n<sup>o</sup> 2, pp. 185-190, 1994.

MENDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Some Physical and Biochemical Characteristics of HF<sub>2</sub>, One the Hemorrhagic in the Venom of *Bothrops jararaca*. In: Osahaka, A.

Hayashi, K.; Saway, Y. Animal, Plant and Microbial Toxins. Vol. 1,  
pp 111-121. London, Plenum Press, 1976.

MENDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.  
Characterization of Two Hemorrhagic Factors Isolated From the  
*Bothrops newiedi* (jararaca pintada). Toxicon 22, pp 193-206, 1984.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S. and BARROS, M.A.R. Thrombing-like  
and Factor X-activator Components of *Bothrops* Snake Venoms.  
Thrombos. Haemostas: (Stuttg.), 41: 314-328, 1979.

OLÓRTEGUI, C. H.; VELARDE, D. T.; COSTA, J.O.; MÁRCIA, O.C.;  
MARIA, W.S. Neutralizing Potency of Horse Antibothropic  
Antivenom. Correlation Between *in vivo* and *in vitro* Methods.  
Toxicon. Vol. 36, nº 10, pp. 1433-1439, 1998.

OUYANG, C.; TENG, C. M. and HUANG, T. T. Characterization of  
Snake Venom Components Acting on Blood Coagulation and  
Platelet Function. Toxicon, 30 (9): 945-966, 1992.

RAW, I, GUILDON, R., HIGASHI, H. G. and KELEN, E. M. Antivenins in Brazil: Preparation. In: Handbook of Natural Toxins, vol. 5, Reptile Venoms and Toxins, pp. 557-581 (tu, A. T., Ed.) New York: Marcel Dekker, 1991.

RIBEIRO, L. A. & JORGE, M. T. Alteração do Tempo de Coagulação Sanguínea em Pacientes Picados por Serpente *B. jararaca* Adulta e Filhote. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo, 44 (4): 143-145, 1989.

ROJAS, E.; ALVORADO, J.; CHAVES, F.; GENÉ, J.A.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Standardization of Assays for Testing the Neutralizing Ability of Antivenoms. Toxicom. Vol. 28, nº 10, pp. 1127-1129, 1990.

ROMANO – HOGE, S. A. R. W. L. Principais Serpentes de Interesse Médico. Reconhecimento, Distribuição Geográfica no Continente Americano. In: Soerensen, B. Animais peçonhentos, ed. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1, 1-45, 1990.

ROSENFELD, G. and KELEN, E. M. A. Cross Neutralization of the Coagulant Activity of Some Snake Venoms by Ativenins. Toxicon 4, pp 7-15, 1966.

RUSSEL, F. E. Snake Venom Poisoning in the United States of America In: Bom C. Envenomings and Their Treatments. Foundation Marcel Mérieus, p. 256-265, 1996.

RUSSEL, F. E. Snake Venom Immunology Historical and Practical Considerations. J. Toxicol. Toxin Rev. 7, 1-82, 1988.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. U., FERREIRA – ALVES, D.L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-GOTTA, G. and DINIZ, C. R. Biological Activities of Venom From South American Snakes. Toxicon, 30 (1): 95-103, 1992.

STOCKER, K. F. & MEIER, J. Thrombin-like Snake Venom Enzymes. Hemostasis and Animal Venoms. Pirkle, H. and Markland Jr. F. S. eds., New York, 1988.

SUNTHORANANDH, P. and RATANABANANGKOON, K. A Comparative Study of Tree Vehicles on Antibody Responses Against Elapid Snake Neurotoxin Immunogens. Toxicon, vol. 32, nº 5, pp. 561-571, 1994.

SWARROUP, S. and GRAB, B. Snake Bite Mortality in the World. Bulletin of the World Health Organization 10, 35-76, 1954.

TAN, N. H. & PONNUDURAI, G. A Comparative Study on the Electrophoretic Patterns of Snake Venoms. Comp. Biochem. Physiol.

THEAKSTON, R. D. G.; PUGH, R. N. H. Antivenom Reaction and Complement Depletion in Snake Bite. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol. 81, nº 1, 73-75, 1987.

TONY, S. C.; GONÇALVES, L. C. R.; MARUYANE, M.; KAMIGUTI, A. and MARIANO, M. Some Biological Properties of *Bothrops erythromelas* Venom. In XII Simpósio Anual da ACIESP Sobre Toxinas Proteicas. pp. 12, Campinas, São Paulo, 1988.

VALENÇA, R. C. Estudo do Processo Hemorrágico Induzido Pela Peçonha de *Bothrops erythromelas*. Dissertação de Mestrado, 1997.

VITAL BRAZIL, O. History of the Primordia of Snake-bite Accident Serotherapy. Mem. Inst. Butantan 49, 7-20, 1987.

VITAL BRAZIL, O. Contribuição para História da Ciência no Brasil, pp. 57-79, 1989.

WARREL, D. A. Clinical Features of Envenoming From Snake Bites. In: Envenoming and Their Treatments, ed. C. Bom. and M. Goyffon, pp. 63-76. Editions Foundation Marcel Mérieux, Lyon, 1996.

WHITE, J. Poisonous and Venomous Animals. The Physician's View. In Handbook of Clinical Toxinology of Animal Venom and Poisons, ed. J. Meier e J. White. pp. 9-26. CRC Press, Boca Raton, FL., 1995.

WHO. Progress in Characterization of Venoms and Standardization of Antivenom. Geneva, in: WHO Offset Publication 58, 1981

ZAPPELLINI, A. Estudos Bioquímicos e Farmacológicos da Peçonha de *Bothrops erythromelas*. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1991.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

**“COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE  
DOS ANTISOROS BOTRÓPICOS COMERCIAL E  
MONOESPECÍFICO FRENTE A PEÇONHA DE B.  
ERYTHROMELAS”**

BANCA EXAMINADORA

**Emerson Azevedo de Araújo**

**Elizabeth Malagueno de Santana**

**David Toledo Velarde**