



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RAFAELA CARVALHAIS BRITO**

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE OVINOS  
IMUNIZADOS COM PEÇONHA DE *Crotalus* spp. (BAHIA/BRASIL) NA  
PRODUÇÃO DE SORO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE**

Salvador  
2014

**RAFAELA CARVALHAIS BRITO**

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE OVINOS  
IMUNIZADOS COM PEÇONHA DE *Crotalus* spp. (BAHIA/BRASIL) NA  
PRODUÇÃO DE SORO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer  
Coorientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ilka Biondi

Salvador  
2014

**RAFAELA CARVALHAIS BRITO**

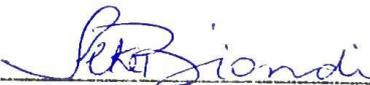
**Análise da resposta imune humoral de ovinos imunizados com peçonha de *Crotalus sp.* (Bahia/Brasil), na produção experimental de soro anticrotálico**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 12 de dezembro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA:**

Ilka Biondi – Co-Orientadora

  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana, UEMS, Brasil.

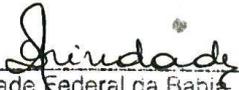
Universidade Estadual de Feira de Santana

Milton Ricardo de Abreu Roque

  
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Universidade Federal da Bahia.

Soraya Castro Trindade

  
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.

Universidade Estadual de Feira de Santana.

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

, Rafaela Carvalhais Brito  
Avaliação da resposta imune humoral de ovinos imunizados com  
peçonha de *Crotalus* spp. (Bahia/Brasil) na produção de soro  
anticrotálico monovalente / Rafaela Carvalhais Brito . --  
Salvador, 2014.  
103 f. : il

Orientador: Roberto José Meyer.  
Coorientadora: Ilka Biondi.  
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde, 2014.

1. soro ovino anticrotálico. 2. *Crotalus*. 3. neutralização.  
I. Meyer, Roberto José. II. Biondi, Ilka. III. Título.

"A única felicidade da vida está na consciência de ter realizado algo de  
útil em benefício da comunidade".  
VITAL BRAZIL

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, força maior em minha vida; fonte de inspiração e mentor espiritual que me amparou em todos os momentos de execução deste trabalho.

Aos meus pais, **Antônio Sérgio** e **Cássia Mara**, e minhas irmãs **Juliana** e **Carina** pelo apoio incondicional.

Ao meu amado esposo **Anderson Moscoso**, pelo companheirismo, amor e compreensão nas minhas ausências.

A **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ilka Biondi**, minha mãe na ciência, que tem me guiado na vida acadêmica com muito amor e carinho. Sou eternamente grata a senhora.

Ao **Prof. Dr. Roberto Meyer**, pela orientação, respeito e pelo carinho com que me acolheu.

A **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Vale**, pelo carinho e por estar sempre presente e disposta a ajudar nos momentos difíceis.

Ao **Instituto Vital Brazil** pela importante parceria.

Aos **Prof. Dr. Alfredo Goes** e **Prof. Dr. Dawson Gomes** do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM/UFMG), que tão gentilmente me acolheram e orientaram em um momento de grande dificuldade.

A **Thaís Brito** e **Luiz Eduardo**, grandes amigos.

Agradeço especialmente a **Elen Azevedo**, pelo imenso apoio na fase final da escrita da dissertação, pelas noites de sono sacrificadas e imensa paciência.

A amigos queridos do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia (LAPH/UEFS) **Dulcinéia Andrade**, **Ívila Cabral**, **José Neto**; e aos demais amigos/funcionários pelo imenso apoio.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO/UFBA) **Alessandro Bitencourt**, **Aloísio Bitencourt**, **Andrea Pacheco**, **Bruno Bastos**, **Eidi**, **Marcos**, **Maria Zilda**, **Natália Fontes**, **Rafaela Brinco**, **Tadeu Raynal**, **Tatiane Sales**. E aos demais integrantes do laboratório que muito me ajudaram cada um a sua maneira.

Ao **Senhor Arí** que cuidou com tanto carinho das minhas ovelhinhas, tornando possível este trabalho.

Agradeço aos amigos do LICM/UFMG, **Jerusa Quintão, Andrea Ferreira, Mariana, Mariane, Marcelo, Priscila** por todo apoio, **pela** alegria com que me receberam e todos os momentos de descontração.

Agradeço a Tia Luzia, vovó Vanilda, tio Ataíde e demais familiares por todo amor e carinho.

A **Jéssica Jesus** do PPGBiotec pelo profissionalismo e eterna paciência.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BRITO, Rafaela Carvalhais. **Análise da resposta imune humoral de ovinos imunizados com peçonha de *Crotalus* spp. (Bahia/Brasil) na produção de soro anticrotálico monovalente.** 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

## RESUMO

Acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública no mundo, sendo considerado um agravo tropical negligenciado pela Organização Mundial da Saúde, devido aos impactos provocados na população e nos sistemas de saúde. O presente estudo objetivou obter soro hiperimune anti-peçonha crotálica produzido em ovinos e avaliar a resposta imune humoral destes, ao longo do calendário de imunização. Além disso, a eficácia deste soro em neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp. em camundongos foi analisada. A imunização dos ovinos ocorreu conforme o calendário do Protocolo Operacional Padrão do Instituto Vital Brazil para produção de soro anticrotálico, observando também a ocorrência de alterações locais e sinais clínicos nestes animais. Os níveis séricos de IgG foram quantificados e avaliados quanto a especificidade de reconhecimento dos diversos constituintes da peçonha antes, durante e após o término do processo de hiperimunização, para avaliar sua cinética da produção. O protocolo utilizado, a escolha do animal soroprodutor, bem como as doses empregadas foram eficazes na obtenção de uma forte resposta imune com elevados títulos de anticorpos e alta especificidade contra a peçonha de *Crotalus* spp., capaz de inibir em 100% a atividade de letalidade por pré-incubação com a peçonha. Desta forma, o presente estudo demonstrou que a produção de soro anti-peçonha crotálica utilizando matéria prima regionalizada, é fundamental para neutralizar os principais componentes desta peçonha, mitigando a ocorrência de sequelas permanentes e óbitos causados pelas cascavéis do Estado da Bahia.

**Palavras-chave:** soro ovino anticrotálico; *Crotalus*, neutralização.

BRITO, Rafaela Carvalhais. Analysis of the humoral immune response of sheep immunized with the venom of *Crotalus* spp. (Bahia / Brazil) in production of anticrotalic antisera monoespecific. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Snakebite envenoming is considered a public health problem in the world and a neglected tropical disease by the World Health Organization due to the impacts on the population and health systems. This present study aimed to obtain hyperimmune serum anti-crotalic produced in sheep and to evaluate the humoral immune response, throughout the immunization schedule. In addition, the efficacy of this serotherapy in neutralizing the lethality activity of *Crotalus* spp., in mice was analyzed. The immunization of sheep occurred according to the schedule of the Standard Operational Protocol of the Vital Brazil Institute for the production of anticrotalic serum, also observing the occurrence of local changes and clinical signs in these animals. Serum IgG levels were quantified and evaluated for the recognition specificity of the various venom constituents before, during and after the end of the hyperimmunization process to evaluate their production kinetics. The protocol used, the seroproducer animal choicen and doses utilized were effective in obtaining a strong immune response with high antibodies levels and high specificity against the venom of *Crotalus* spp., inhibiting 100% lethality activity by preincubation with venom. Thus, the present study demonstrated that the production of anticrotalic antivenom using regionalized raw material is needed to neutralize the main components of this venom, mitigating the occurrence of permanent sequel and deaths by the rattlesnakes bite on the State of Bahia.

**Keywords:** anticrotalic sheep serum; *Crotalus*; neutralization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Avaliação da composição proteica da peçonha de <i>Crotalus</i> spp. (Bahia/Brasil).	54
Figura 02	Avaliação clínica dos efeitos locais ocorridos durante os primeiros sete dias do protocolo de imunização.	59
Figura 03	Observação clínica dos efeitos locais ocorridos nos ovinos do Grupo Experimental, inoculados com 200 µg de proteína da peçonha de <i>Crotalus</i> spp., emulsificada com ACF.	60
Figura 04	Cinética de produção de anticorpos da Classe IgG nos ovinos ao longo de 180 dias.	64
Figura 05	Cinética de produção de anticorpos séricos da Classe IgG dos ovinos do Grupo Experimental.	65
Figura 06	Cinética de produção de anticorpos séricos da Classe IgG dos Controles.	66
Figura 07	Reconhecimento das diferentes frações da peçonha de <i>Crotalus</i> spp. pelo soro anticrotálico monovalente pelo ensaio de <i>Western blotting</i> .	70
Figura 08	Avaliação da reatividade antigênica pelo ensaio de <i>Western blotting</i> do “pool” dos soros do Grupo Controle I e do Grupo Controle II.	71
Figura 09	Análise macroscópica da capacidade do soro anticrotálico monovalente na dose de 50 µl em neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de <i>Crotalus</i> spp.	78
Figura 10	Análise histológica do parênquima pulmonar de camundongos no	80

teste da capacidade do soro anticrotálico monovalente na dose de 200 µl em neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp.

Figura 11 Análise histológica do parênquima renal de camundongos no teste da capacidade do soro ovino monovalente anticrotálico do tempo T<sub>180</sub> (dose de 200 µl) de neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp. 85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Determinação da capacidade neutralizante do soro anticrotálico hiperimune dos tempos $T_{90}$ e $T_{180}$ contra a peçonha de <i>Crotalus sp</i>	73
-----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus celcius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
C3a	Fator 3a do sistema complemento
C5a	Fator 5a do sistema complemento
ECL	Eletroquimioluminescência
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% dos animais experimentados
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	Enzime Linked Immuno Sobernt Assay
HE	Coloração hematoxilina/eosina
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IVB	Instituto Vital Brazil
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Kilodalton
M	Molar
Mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio

OPG	Ovos por grama de fezes
POP	Procedimentos Operacionais Padrão
PVDF	Membrana de transferência de fluoreto de polivinilidene
SDS	Sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Sódio dodecil sulfato - gel de eletroforese de poliacrilamida
sTNFRI	Soluble TNF receptor I
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline com Tween
TFS	Tampão fosfato de sódio
TFST	Tampão fosfato de sódio adicionado de 0,05% Tween
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tris-HCl	Hidroximetil aminometanol/Ácido Clorídrico
Tween 20	Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 EO
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>22</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS.....	22
2.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS ACIDENTES CROTÁLICOS.....	24
2.3	VARIABILIDADE NA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA.....	27
2.4	SOROTERAPIA.....	29
2.5	PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE REGIONALIZADO EM OVINOS.....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	PEÇONHA (ANTÍGENO).....	38
4.2	DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	38
4.3	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	38
4.4	PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DOS OVINOS PARA PRODUÇÃO DO SORO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE.....	39
4.4.1	<b>Plantel de animais utilizados na produção do soro anticrotálico ovino monovalente.....</b>	<b>39</b>
4.4.2	<b>Protocolo de Imunização de Base do Plantel de Ovinos.....</b>	<b>39</b>

<b>4.4.3</b>	<b>Protocolo de Hiperimunização em ovinos.....</b>	<b>40</b>
4.5	OBTENÇÃO DO SORO OVINO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE	41
4.6	VERIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	41
4.7	VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE CRUZADA POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	43
4.8	VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DO SORO OVINO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE FRENTE A PEÇONHA DE <i>Crotalus spp</i> .....	43
4.9	ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS (DOS PULMÕES E RINS) .....	45
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4.11	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1	DOSE PROTEICA DA PEÇONHA (ANTÍGENO).....	48
5.2	AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE) .....	49
5.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS OVINOS SORO PRODUTORES.....	55
5.4	NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) .....	61
5.5	VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE CRUZADA POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	67
5.6	ANÁLISE DA CAPACIDADE DOS “POOLS” DE SORO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE DOS TEMPOS T <sub>90</sub> E T <sub>180</sub> (50 µL E	72

200  $\mu$ L) EM NEUTRALIZAR A ATIVIDADE DE LETALIDADE DA  
PEÇONHA DE *Crotalus* spp. (3 DL<sub>50</sub>) .....

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>

# Introdução



## 1 INTRODUÇÃO

Os agravos causados por animais peçonhentos representam um problema de saúde pública mundial, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, de várias regiões da África, Ásia e América Latina. Estes acidentes ocorrem principalmente nas áreas rurais, onde o acesso ao atendimento médico é difícil, gerando dados epidemiológicos escassos que subestimam a verdadeira situação do ofidismo em todo o mundo (CHIPPAUX, 1998; GUTIÉRREZ, THEAKSTON, WARRELL, 2006; KASTURIRATNE *et al.*, 2008, WHO, 2010).

A epidemiologia dos acidentes causados por animais peçonhentos, principalmente aqueles causados por serpentes e escorpiões, tem sido grandemente negligenciada, impossibilitando obter informações precisas sobre a morbidade e mortalidade causadas por este grupo de animais em todo o mundo (THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003). Estimativas apontam que ocorrem anualmente entre 1,2 a 5,5 milhões de acidentes por serpentes em todo o mundo, dos quais 94 mil casos evoluem para o óbito. Contudo, este número pode ser quatro vezes maior devido a subnotificação (KASTURIRATNE *et al.*, 2008), fato que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluir os acidentes por serpentes na lista das doenças negligenciadas (WHO, 2010).

No Brasil, os agravos por serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis) representam cerca de 7,7% dos acidentes por serpentes registrados no País, cuja letalidade é de 1,87% (FUNASA, 2001). No Estado da Bahia, pacientes vítimas de acidentes graves permaneceram com insuficiência renal crônica (IRC) como seqüela, além de desencadear efeitos sistêmicos completamente destoante do que está preconizado na literatura para os acidentes crotálicos, como distúrbios respiratórios graves, hipotensão e insuficiência renal aguda, ou seja, (BIONDI, 1994).

No Brasil, os acidentes crotálicos que apresentam elevada taxa de letalidade, mesmo com toda a tradição na área de ofidismo iniciada com Vital Brazil;

diferentemente do que é observado nos acidentes por cascavéis na América do Norte, onde o número de casos fatais é baixo devido a implementação de tratamento adequado (CHIPPAUX, 1998). Assim, para compreender esta problemática no âmbito do Estado da Bahia, o Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia (LAPH) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), desde 1987, vêm estudando a epidemiologia dos acidentes causados por animais peçonhentos em humanos e sua fisiopatologia em animais experimentais, aliando pesquisas sobre a biogeografia, o perfil das peçonhas por populações de cascavéis do Estado e sobre sua neutralização pela soroterapia atualmente disponível. Os dados demonstraram que o soro distribuído pelo Ministério da Saúde para atender os acidentes por cascavéis no Estado da Bahia neutralizam parcialmente estes acidentes (CABRAL 2013; BIONDI, 2009).

Assim sendo, fazem-se necessários novos estudos na busca de melhorias na produção de antivenenos eficazes e seguros, que visem o aumento da capacidade de produção de imunógenos específicos nos países de baixa renda. Dentre estas melhorias, sinaliza-se a viabilidade da produção de um novo soro anticrotálico utilizando ovinos, uma vez que estudos recentes tem demonstrado a excelente capacidade de resposta imune humoral destes animais, os quais apresentam maiores concentrações séricas de anticorpos específicos e mais eficazes que os de origem equina (SJOSTROM *et al.*, 1994; CLARK *et al.*, 1997; FERREIRA JUNIOR, 2005; NETTO *et al.*, 2002). Ovinos são animais de fácil adaptação às condições climáticas de diversos países, com baixo custo de aquisição e manutenção, facilidade de manuseio, imunização e sangria (LANDON & SMITH, 2003), além de tolerarem os adjuvantes comercialmente utilizados na produção de soroterapia (SJOSTROM *et al.*, 1994). Evidenciando, assim, uma excelente opção como animais soroprodutores de imunoglobulinas anti-peçonha crotálica.

É mister ressaltar que para a fabricação de soros contra os acidentes por animais peçonhentos a Organização Mundial de Saúde recomenda que seja levado em consideração a região geográfica as quais pertencem as espécies de animais causadoras de acidentes, para produzir imunoglobulinas específicas às peçonhas da região de ocorrência dos acidentes devido a importância da variabilidade em sua

composição (WHO, 1981; CHIPPAUX, WILLIAMS, WHITE, 1991). Contudo, até o momento, os Institutos responsáveis por sua produção não levam em consideração esta recomendação, como resultado tem-se um maior índice de morbidade e mortalidade e a ocorrência de importantes alterações patológicas causadas pela peçonha, como perda de tecidos e/ou disfunções que acarretam consequências físicas, sociais e econômicas. Além disso, as sequelas permanentes oriundas dos agravos causados por animais peçonhentos trazem implicações como: gastos com hemodiálise, transplantes e medicamentos para pacientes que se tornaram renais crônicos, prótese para a recomposição de membros amputados, antecipação de aposentadoria por invalidez, afastamentos temporários e/ou permanentes por acidentes de trabalho, e pensão a terceiros por morte em acidente de trabalho.

Considerando a produção de soros na linha das doenças negligenciadas como alvo estratégico, ressalta-se a necessidade da produção de um novo soro regionalizado para os acidentes por *Crotalus* spp. no Estado da Bahia, alicerçado na Política de Desenvolvimento da Biotecnologia que tem por objetivo o estabelecimento de ambiente favorável ao desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores voltados à saúde, em vista de atrair tecnologias que resultem numa produção regional de produtos estratégicos para doenças negligenciadas, que posicionem à bioindústria baiana no cenário biotecnológico nacional e internacional, uma vez que soros são o melhor tratamento para os agravos causados por animais peçonhentos e não possuem produtos substitutos.

Destarte, pautado na confirmação da ineficácia da maioria dos soros atualmente fabricados, devido a falta de critérios relacionados às diferenças intra e inter específicas da composição das peçonhas (BIONDI, 2010), este projeto avaliou a resposta imunológica humoral de ovinos hiperimunizados com a peçonha de *Crotalus* spp. (Bahia/Brasil) ao longo do processo de imunização obtendo um novo soro anticrotálico de alta especificidade contra a peçonha de *Crotalus* spp., capaz de reconhecer e neutralizar os principais componentes deste antígeno.

# Referencial Teórico



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DOS ACIDENTES OFÍDICOS

Os agravos causados por animais peçonhentos são considerados um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, tais como na África, Ásia e América Latina, devido aos elevados índices de morbidade e mortalidade principalmente, em áreas rurais de difícil acesso, gerando dados epidemiológicos escassos que subestimam a verdadeira situação deste problema no Mundo (CHIPPAUX, 1998; KASTURIRATNE *et al.*, 2008). Estima-se que ocorram anualmente em todo o mundo de 5,4 milhões de acidentes por serpentes, dos quais 250 mil ficam com sequelas permanentes e 100 mil vão a óbito. Apesar dos impactos econômicos e seus reflexos sobre as populações, tais acidentes não têm recebido a devida atenção por parte das autoridades saúde (KASTURIRATNE *et al.*, 2008). Tal problemática levou a Organização Mundial de Saúde a incluir os acidentes por serpentes na lista das doenças negligenciadas (WHO, 2010).

Na América Latina, estimativas apontam que ocorrem cerca de 300 mil acidentes causados por serpentes, com 12 mil sequelados e 4 mil óbitos (CHIPPAUX *et al.*, 2010). No Brasil, foram notificados 280 699 acidentes por serpentes durante o período de 2000 a 2010. A região Nordeste neste mesmo período apresentou uma incidência de acidentes igual a 48,3/100 mil habitantes causados por animais peçonhentos, ocupando o terceiro lugar em ocorrência com 71 055 acidentes por serpentes. No Estado da Bahia (2000-2010) a incidência destes acidentes foi de 65,9/100 mil habitantes, tendo sido registrados 62 509 acidentes por escorpião, 29 921 acidentes por serpentes, 2 046 acidentes por aranhas, 1 822 acidentes por abelhas, com registro de 381 óbitos, sendo 194 por escorpião, 166 por serpente, 06 por aranha e 15 por abelha. Assim, o Estado da Bahia ocupa o primeiro lugar do Nordeste em casos de acidentes por serpentes com incidência de 19,7/100 mil habitantes (SINAN, 2011).

Entretanto, as estimativas do número de acidentes, morbidade e mortalidade estão aquém dos reais valores devido às falhas no sistema de notificação e da não sistematização dos dados nas unidades hospitalares. Alguns autores apontam que a não notificação ou subnotificação dos acidentes está associada a área de ocorrência dos acidentes que, no caso específico das serpentes, são mais frequentes em áreas rurais onde o atendimento médico é de difícil acesso e o soro antipeçonhento, único tratamento, é escasso (ALBUQUERQUE, COSTA, CAVALCANTI, 2004; KASTURIRATNE *et al.*, 2008). Assim, as características epidemiológicas dos empeçonhamentos por picada de serpente nas diferentes regiões permanecem largamente desconhecidas (KASTURIRATNE *et al.*, 2008).

A epidemiologia dos acidentes provocados por serpentes na região Nordeste do país aponta que dados sobre a prevalência, incidência, diagnóstico, prognóstico além da fisiopatologia decorrente do acidente são escassos, o que tem se refletido em dificuldades no atendimento aos acidentados. No Estado do Ceará, entre os anos de 1992 a 1995, foram registrados 688 casos de acidentes ofídicos causados pelo gênero *Crotalus*, com coeficiente de incidência variando entre 0,9% e 5,8% por 100.000 habitantes. Em Pernambuco os acidentes crotálicos representam 55,6% (178) dos acidentes ofídicos ocorridos entre os anos de 2003-2005 (SIQUIERA *et al.*, 2005).

No estado de Bahia, as notificações dos acidentes por serpentes vêm sendo documentadas desde a implantação do Centro de Informação Anti-Veneno (CIAVE), onde o primeiro estudo epidemiológico realizado por Rodrigues *et al.* (1987), registrou 1.358 acidentes ofídicos notificados, sendo o gênero *Bothrops* responsável por 94% dos acidentes, seguido por *Crotalus* com 5,5%, *Lachesis* com 1,1% e *Micrurus* com 1,0% dos casos registrados. No período de 1990-1993 foram notificados no Estado 245 acidentes graves, com 09 óbitos (3,6%) e 15 (6,0%) pacientes permaneceram com seqüela (BIONDI, 1994). Dados atuais (2007-2014) do SINAN apontam a notificação de 17 874 acidentes causados por serpentes, dos quais 1 179 foram causados por *Crotalus*, sendo 593 casos graves ou moderados, causando 12 óbitos. Do universo de 1 179 agravos notificados, 252 (21%) não tiveram a evolução do caso divulgada, demonstrando o descaso com que os

agravos causados por animais peçonhentos são tratados, contribuindo para o agravamento da subnotificação dos casos (SINAN, 2014).

## 2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS ACIDENTES CROTÁLICOS

As peçonhas são constituídas por uma mistura complexa de elementos capazes de desencadear diversos efeitos fisiopatológicos que vão desde a potencialização da ação da bradicinina à ação proteolítica, e representam uma excelente estratégia de defesa para o animal (STOCKER, 1990; CHIPPAUX, WILLIAMS, WHITE, 1991). Os acidentes provocados por *Crotalus durissus* no Brasil são geralmente graves e frequentemente fatais na ausência de um tratamento adequado, onde o diagnóstico clínico baseia-se principalmente nas manifestações locais e sistêmicas (BARRAVIEIRA *et al.*, 1989; BRASIL, 1990; 1997; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1991; AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003).

A peçonha de *C. d. terrificus* é caracterizada por não induzir reação local mas apenas um discreto edema e pouca dor, e causar graves manifestações sistêmicas decorrentes das atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante da peçonha (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003). Geralmente os efeitos sistêmicos se tornam evidentes nas primeiras seis horas, quando se inicia a ação neurotóxica, tanto no sistema nervoso central como periférico, inibindo a liberação de acetilcolina. Estas manifestações são denominadas de fácies miastênica ou “Fácies neurotóxicas de Rosenfeld” evidenciada por ptose palpebral uni ou bilateral, flacidez da musculatura da face, alteração do diâmetro da pupila (midríase bilateral), incapacidade de movimentar o globo ocular (oftalmoplegia), visão turva dupla, indicando que existe comprometimento do III, IV e VI pares cranianos (BARRAVIEIRA, 1990).

Paralisia da musculatura respiratória é uma complicação temida, e um dos principais mecanismos que podem levar o paciente ao óbito (BRAZIL, 1987; FUNASA, 1998; 2001). No entanto, esta manifestação é pouco frequente nos

acidentes por cascavéis, sendo atribuída à crotoxina (ROSENFELD, 1971; AZEVEDO-MARQUES; CUPO; AMARAL, 1990; FUNASA, 1991; JORGE & RIBEIRO, 1992).

Outra ação fisiopatológica relevante é a miotoxicidade, que se manifesta clinicamente por dores musculares generalizadas (mialgia), aparecendo precocemente e de forma intensa nos casos graves, podendo ser acompanhada de um discreto edema muscular. O efeito miotóxico em sítios distantes do local da picada é uma observação comum em pacientes acidentados por *C. d. terrificus* (CUPO *et al.*, 1988). Este efeito é também demonstrado pela presença de mioglobínúria e por um drástico aumento no nível sérico de creatinina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985). O escurecimento da urina (mioglobínúria) demonstra a gravidade do acidente, e conseqüentemente a existência de necrose da fibra muscular (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003).

A insuficiência renal aguda (IRA) é outra complicação apresentada pelos pacientes acidentados por *Crotalus durissus* (RIBEIRO *et al.*, 1998), sendo considerada como uma das mais graves complicações dos acidentes crotálicos que leva ao óbito (NANCY *et al.*, 1991; MARTINS *et al.*, 1998), podendo ser instalado pela atuação isolada ou combinada de diversos mecanismos potencialmente nefrotóxicos relacionados às atividades biológicas das peçonhas (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985; MS, 1991). Pode ser extremamente precoce, surgindo poucas horas após o acidente, sendo frequentemente oligúrico, hipercatabólico, dependente de tratamento dialítico, durando em média 3 a 4 semanas. Entretanto na maioria dos casos torna-se reversível, (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985; AMARAL *et al.*, 1986; JORGE & RIBEIRO, 1990; MARTINS *et al.*, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1991; 2001).

Apesar de ainda permanecerem dúvidas sobre a gênese da lesão renal atribuída aos acidentados por *Crotalus*, estudos experimentais sugerem que esta fisiopatologia pode estar relacionada à vasoconstrição e/ou vasodilatadores renais, a nefrotoxicidade direta ou indireta pela liberação de mediadores provenientes de células endoteliais, e/ou pela obstrução tubular por cilindros formados pelo pigmento

de mioglobina (VIDAL, YU; BURDMANN, 1997; MARTINS *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 2001; BIONDI, 2009).

Distúrbios da coagulação também são apresentados em 40% dos pacientes acidentados. A ação coagulante foi atribuída à presença de componente tipo trombina, que pode causar hipofibrinogenemia ou ao completo consumo do fibrinogênio, resultando em completa ou parcial incoagulabilidade do sangue dos pacientes acidentados (SANO-MARTINS *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas apresentadas pelo paciente resultam da ação tóxica dos diversos componentes das peçonhas ofídicas e de sua interação com mastócitos, plaquetas, polimorfonucleares, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos. Após o acidente, dois efeitos simultâneos ocorrem no organismo: danos fisiopatológicos causados pelas toxinas componentes da peçonha e o estímulo para o desencadeamento de resposta imune inata e adaptativa com vistas a neutralizar e eliminar o antígeno (LÉON *et al.*, 2011). A peçonha induz uma resposta inflamatória sistêmica em grande parte mediada por citocinas pró (IFN- $\gamma$ , IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) que regulam mutuamente a resposta imune contra a peçonha, onde a redução de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  é acompanhada pelo aumento da liberação de IL-4 e IL-10 (HOWARD *et al.*, 1993; BARRAVIERA *et al.*, 1995; CRUZ *et al.*, 2008).

Pacientes acidentados por *C. d. terrificus* apresentam aumento dos níveis séricos de IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-8 (CARDOSO *et al.*, 2009), ativando neutrófilos e contribuindo para a formação de infiltrado celular nos pulmões (NONAKA *et al.*, 2008). Camundongos inoculados com peçonha de *C. d. terrificus* apresentam alteração nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6, cujas concentrações correlacionam-se com a gravidade do acidente, dado que uma resposta inflamatória, seja ela excessiva ou fraca, pode ocasionar complicações no quadro clínico (CRUZ *et al.*, 2008).

### 2.3 VARIABILIDADE NA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA

O complexo *Crotalus durissus* compreende espécies de amplo espectro e um número mal definido de subespécie (CALVETE *et al.*, 2010), não havendo consenso a respeito de sua taxonomia (WUSTER *et al.*, 2005) e impactando diretamente nas questões que envolvem a soroterapia. Aliado a isso, diversos fatores como variações na quantidade e na qualidade da peçonha dos inúmeros gêneros, espécies e subespécies de serpentes utilizada; a grande diversidade de efeitos fisiopatológicos e bioquímicos causados pelas peçonhas; e a baixa imunogenicidade destas, dificultam estabelecer uma terapia que responda adequadamente ao empeçonhamento. (SCHENBERG, 1950; SCHENBERG, 1959; SANTOS *et al.*, 1986; AMARAL *et al.*, 1988; FERREIRA *et al.*, 1992; DALTRY *et al.*, 1996; FRANCISCHETTI *et al.*, 1997, 1998; GIBBS *et al.*, 1997; CARDOSO & MOTA 1997).

Ao longo da história do ofidismo, diversos autores se dedicaram ao estudo da neutralização sem levar em consideração alguns critérios importantes como: (a) o conhecimento seguro da posição filogenética destes agentes etiológicos em estudo; e (b) as barreiras geográficas que podem impedir a troca de material genético entre populações próximas, haja vista que, todos estes pontos estão inter-relacionados à variabilidade das peçonhas (BOLDRINI-FRANÇA, 2010). Esta variação está correlacionada a fatores como a mudança sazonal, a ontogenia intrapopulacional, a origem geográfica da espécie, a dieta alimentar, idade e sexo do animal (STOCKER, 1990; GIBBS *et al.*, 1997).

Por praticamente quatro décadas os trabalhos com as peçonhas de *Crotalus durissus* no Brasil ficaram restritos às quatro proteínas consideradas como básicas (crotamina, crotoxina, convulxina e giroxina). Atualmente, novos estudos vêm sendo realizados, principalmente com a técnica de espectrometria de massa (Maldi-Tof), demonstrando a existência de um número bem maior de proteínas não antes detectadas, tais como serinoproteases, metaloproteases, fatores de crescimento e grupos de outros compostos não tóxicos nestas peçonhas (TAVARES *et al.*, 2008; BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009; 2010).

Análises sobre a variabilidade dos componentes das peçonhas das subespécies de *Crotalus* no Brasil são poucas, contudo podemos destacar os estudos com a peçonha de *C. d. terrificus*, que habitam várias regiões do Brasil, quanto à presença ou ausência da crotamina (MOURA-GONÇALVES & VIEIRA, 1950). Estes autores demonstraram que esta toxina é encontrada em algumas peçonhas de espécimes de *C. d. terrificus*, estando ausentes em outras.

Estudos comparativos da composição das peçonhas de subespécies de *C. durissus* realizado por Dos Santos *et al.*, (1993) demonstraram que a peçonha que apresenta a coloração branca também apresenta similaridade de atividade neurotóxica, mesmo em subespécies diferentes a exemplo de *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus*. Em contraposição, as peçonhas de *C. d. ruruima* que apresentam coloração amarela com distribuição geográfica mais ao norte do Brasil e Venezuela, exercem atividade hemorrágica e dermonecrótica, adicionada às neurotoxicidade, aos distúrbios da coagulação e aos efeitos miotóxicos.

Santoro *et al.* (1999), comparam as peçonhas de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella*, demonstrando a presença de proteínas homólogas com estrutura e atividades biológicas similares, exceção feita para a peçonha de *C. d. cascavella* que demonstrou maior atividade edematogênica. Peçonhas com estas variações na composição têm provocado importantes implicações nos acidentes humanos, devido à dificuldade em realizar uma correlação segura entre o agente etiológico e as manifestações clínicas, dificultando assim, o estabelecimento de uma terapia que responda adequadamente às manifestações clínicas desenvolvidas pelo acidentado (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; DALTRY *et al.*, 1996; CARDOSO & MOTA, 1997).

A similaridade observada entre as peçonhas de *Crotalus* spp. e *C. d. cumanensis*, *Crotalus vegrandis* da Venezuela (AGUILAR, GIRON, RODRIGUEZ-ACOSTA, 2001) e *Crotalus durissus* da Costa Rica e Guatemala (SARAVIA *et al.*, 2002), tanto pela composição bioquímica quanto pela fisiopatologia causada pelo empeçonhamento, corrobora com a tese de que as cascavéis que habitam o Estado da Bahia não são *C. d. terrificus*. A variabilidade antigênica dos componentes das peçonhas reflete na eficácia do soro antiofídico (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014). Portanto,

faz-se necessário o desenvolvimento de soroterapia regionalizada para a região Nordeste.

Desta forma, para compreender a dinâmica da neutralização é necessário: evitar estudos reducionistas com base apenas no isolamento e caracterização de determinados componentes da peçonha e, em paralelo, implantar estudos para conhecer e determinar quais os possíveis efeitos das peçonhas de uma determinada população dentro de um ecossistema específico, e quais suas implicações fisiopatológicas geradas no sistema imunológico do paciente acidentado (BIONDI, 2009; ANDRADE, 2009).

## 2.4 SOROTERAPIA

O soro antiofídico é o único tratamento considerado eficiente e específico para vítimas de agravos causados por serpentes (CHIPPAUX & GOYFFON, 1991; CAPITĂNESCU *et al.*, 2008; WHO, 2010). Sua origem teve início no século XIX, através da busca por um método para fabricação de soro contra a picada de serpentes, a partir de estudos que se transformaram em clássicas contribuições sobre este assunto no Brasil e em outros países, como de Otto Wucherer (1867) sobre o ofidismo no Estado da Bahia, e dos franceses Sewall (1887) e Kauffmann (1889). Contudo, foi o francês Albert Calmette (1894) quem anunciou a descoberta do método universal para a neutralização dos acidentes por serpentes, descrevendo que *“qualquer antissoro, fabricado por qualquer tipo de serpente, neutralizava qualquer acidente”*.

Naquele mesmo período, outro pioneiro brasileiro, o cientista Vital Brazil, que se dedicava ao estudo da biologia, da peçonha e dos acidentes provocados pelas serpentes brasileiras, testou o método preconizado por Calmette, e descreve em 1898 que *“As peçonhas apresentavam variações na sua composição e este evento deveria ser levado em consideração no momento da fabricação dos soros e que o soro fabricado para um tipo de serpente não neutralizava a ação da peçonha de outra serpente”*. Assim nasceu a teoria da variabilidade das peçonhas e esta

descoberta lhe deu em 1917, a Patente de Invenção de nº 9.596 para um novo processo de fabricação dos soros antipeçonhentos.

Foi baseado nestes estudos sobre a fabricação da soroterapia contra os acidentes por animais peçonhentos que a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1981, recomendou que seja levada em consideração a região geográfica das espécies de animais causadoras dos acidentes, para que a composição destes soros antipeçonhentos possa conter anticorpos específicos, por considerar a importância da variabilidade da composição das peçonhas (WHO, 1981; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991, CALVETE *et al.*, 2009).

Desde então, inúmeros estudos sobre o ofidismo foram realizados no Brasil, e a fabricação dos soros antiofídicos e de outros soros contra picadas por animais peçonhentos ficou sob a responsabilidade da empresa estrangeira sediada no Brasil, a SINTEX, com a permissão de vender estes soros no varejo em farmácias. Somente a partir do desabastecimento de soros nas Unidades de Saúde na década de 1980, que a responsabilidade da fabricação do soro passou a ser do Ministério da Saúde (MS). Assim, foi instituído em 1986 o Programa Nacional de Ofidismo que tornou obrigatória a notificação de acidentes causados por animais peçonhentos e passou a se chamar Programa Nacional de Controle dos Acidentes por Animais Peçonhentos, tendo como diretrizes o uso adequado da soroterapia e redução de acidentes e óbitos através da educação em saúde.

Este tratamento consiste na administração de quantidades variadas de anticorpos específicos que possam neutralizar cerca de 20% dos principais componentes das peçonhas. Por outro lado, apesar de demonstrar eficiência na redução da mortalidade, o soro pode ser considerado um fator complicador no que se refere às reações alérgicas tardias, provocadas principalmente pela quantidade de anticorpos heterólogos nele contidos (RIVIÈRE *et al.*, 1997).

## 2.5 PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE REGIONALIZADO EM OVINOS

Em 2011 foram comemorados os 100 anos de ofidismo, porém muito pouco foi modificado no método de fabricação desde que descrito por Calmett em 1894, cuja metodologia de hiperimunização fica na dependência do uso de equinos para a obtenção de anticorpos, como verificado na maioria dos Laboratórios industriais que fabricam soros antipeçonhentos. Isto se deve a facilidade de resposta ao estímulo da peçonha e por favorecer a obtenção de grandes volumes de sangue rico em anticorpos (FAN & FRANÇA, 1992), embora alguns produtores utilizem ovelhas e, em menor frequência, outras espécies animais, tais como: burros, cabras, coelhos e galinhas (GUTIÉRREZ & LÉON, 2009).

Estudos como o de Sjostrom *et al.* (1994), verificou que os anticorpos de ovinos foram mais eficazes que dos equinos nos testes de letalidade ( $DL_{50}$ ) em camundongos e apresentaram maior concentração de anticorpos específicos. Dentre as vantagens do uso de ovelhas para produção de soro antipeçonhento, Landon & Smith (2003) destacam: (a) sua facilidade de adaptação às condições climáticas de diversos países, (b) baixo custo de aquisição e manutenção, (c) facilidade de manuseio, imunização e sangria e, principalmente, (d) sua excelente capacidade de resposta imune humoral.

Clark *et al.* (1997) relatam a eficácia de um novo soro polivalente de origem ovina produzido a partir das peçonhas dos espécimes de *Crotalus atrox*, *C. adamanteus*, *C. scutulatus scutulatus* e *Agkistrodon piscivorus*, que posteriormente foi testado para neutralizar os acidentes causados *C. Scutulatus scutulatus*, *C. horridus horridus* e *C. atrox*. Esta nova soroterapia é dez vezes mais potente no tratamento do bloqueio da atividade neurotóxica causada pelas peçonhas das cascavéis norte-americanas, do que o soro antiofídico convencionalmente utilizado, que é produzido a partir da peçonha de *C. atrox*, *C. adamanteus*, *Bothrops lanceolatus* e *C. durissus terrificus*.

Peres *et al.*, (2006) inocularam 1  $DL_{50}$  da peçonha de *Bothrops jararaca* em camundongos Swiss, e após 15 minutos utilizou o soro antibotrópico produzido em ovinos como tratamento demonstrando a redução significativa dos níveis séricos da

peçonha botrópica presente em amostras de sangue e esplenócitos do baço de camundongos.

No caso específico dos acidentes causados por picada de cascavéis que habitam vários ecossistemas no Estado da Bahia, Biondi (2009) avaliou a capacidade de neutralização do soro anticrotálico monovalente comercialmente produzidos pelo Instituto Butantã, comprovando a ineficácia do mesmo quanto a dose mínima de letalidade. Posteriormente, Cabral (2011), com esta mesma peçonha testou o soro anticrotálico fabricado pelo Instituto Vital Brazil, demonstrando a capacidade apenas para neutralizar os efeitos miotóxicos provocados no músculo esquelético.

Estes dados reforçam a urgência em cumprir as orientações da OMS no item fabricação de um soro regionalizado a partir das peçonhas de serpentes oriundas do local onde ocorrem os acidentes. Contudo, até o presente momento, os Institutos responsáveis pela produção dos soros anti-peçonhentos não levam em consideração as recomendações da Organização Mundial de Saúde (1981), pra que seja levada em consideração a região geográfica das espécies de animais causadoras dos acidentes, cujo objetivo é que os soros possam conter anticorpos específicos frente a variabilidade da composição das peçonhas (WHO, 1981; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991, CALVETE *et al.*, 2009), uma vez que é considerado o mais eficiente tratamento contra picada de serpentes (CAPITĂNESCU *et al.*, 2008; WHO, 2010). Paralelo a este fato, os dados epidemiológicos demonstram a ocorrência de um alto índice de morbidade e mortalidade, além das graves alterações fisiopatológicas desencadeadas por estas peçonhas que frequentemente provocam perda de tecidos e/ou disfunções, que acarretam consequências permanentes com sequelas, tais como a insuficiência renal crônica (SINAN, 2011).

Para compreender o progressivo aumento do número de óbitos e sequelas observados nos acidentes por animais peçonhentos no Estado da Bahia, o Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia (LAPH) da Universidade Estadual de Feira de Santana instituiu o “Programa Institucional Animais Peçonhentos” em 1990, para estudar as diversas fases que envolve os acidentes por animais peçonhentos. No caso específico de acidentes por cascavéis, os estudos demonstraram que no recorte temporal de 1990 a 1993, ocorreram 245 acidentes

graves com 09 óbitos (3,6%) e 15 (6,0%) sequelados com insuficiência renal crônica (IRC) no Estado da Bahia (BIONDI, 1994).

Estudos bioquímicos comparando as peçonhas de duas populações de *Crotalus* dos ecossistemas de Caatinga e Mata estacional demonstraram serem duas peçonhas totalmente diferentes (BIONDI *et al.*, 2004). Biondi (2009), ampliando os estudos sobre a fisiopatologia dos acidentes crotálicos apontou como efeitos sistêmicos os distúrbios respiratórios graves, hipotensão e insuficiência renal aguda irreversível, demonstrando assim um quadro clínico do empeçonhamento crotálico diferenciado do quadro clínico preconizado pela literatura, e que o soro distribuído pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia para tratar as vítimas de acidentes crotálicos neutraliza parcialmente os efeitos tóxicos da peçonha de *Crotalus spp.*

É importante ressaltar, que a problemática da não neutralização interfere em aspectos econômicos e sociais que devem ser considerados. No Brasil, além dos gastos para a produção de soro que não atende as particularidades regionais, há de serem considerados outros fatores que terminam onerando o Sistema Único de Saúde (SUS), como o custo do número de ampolas de soros e da permanência de pacientes na internação hospitalar (dias/meses). Devem-se considerar também os gastos permanentes com os pacientes sequelados: (a) seja através de tratamento por hemodiálise; (b) transplantes e medicamentos para pacientes que se tornaram renais crônicos; (c) prótese para a recomposição de membros amputados; (d) antecipação de aposentadoria por invalidez; (e) afastamentos temporários e/ou permanentes por acidentes de trabalho, e (f) em muitos casos, pensão a terceiros por morte em acidente de trabalho.

Desta forma, apesar do conhecimento de que os soros contra acidentes por animais peçonhentos não possuem produtos substitutos que possam atuar na neutralização destes acidentes, as populações acidentadas continuam em 70% desassistidas pelas autoridades saúde. Isso se deve ao fato de que, acreditando que houve uma estabilidade na ocorrência de acidentes e na produção e abastecimento destes soros nas unidades de saúde, o MS determinou a não compulsoriedade da notificação dos acidentes por animais peçonhentos, sem levar em consideração um estudo sobre a real situação no país e as subnotificações.

Nos últimos anos, o Brasil vem ampliando iniciativas na medida em que são articuladas diversas áreas através de políticas e programas que envolvem pesquisa e inovação voltadas para a saúde. Dentre as ações desenvolvidas está a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia que tem por objetivo o estabelecimento de ambiente favorável ao desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores. Estas iniciativas apresentam como prioridades a fabricação de novas biomoléculas e fármacos para doenças virais e negligenciadas. Desta forma, pontuamos a necessidade da produção de soros regionalizados para equacionar vários pontos desta problemática.

Diante disso, produção de soros antipeçonhentos regionalizados defendidos pela OMS deve ser considerado como alvo estratégico na linha das doenças negligenciadas. Neste trabalho produzimos um soro ovino monovalente anticrotálico para avaliar a resposta imune humoral dos ovinos e sua capacidade de neutralizar as atividades tóxicas causadas pela peçonha crotálica; considerando que o sucesso na produção de soro hiperimune depende da capacidade das diversas frações da peçonha em induzir uma resposta imune (CLISSA, 1997), e a elevada toxicidade da peçonha crotálica.

# Objetivos



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a resposta imune humoral dos ovinos imunizados com peçonha crotálica (*Crotalus* spp. - Bahia/Brasil), como uma nova alternativa sorológica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção sérica de anticorpos da classe IgG específicos contra a peçonha de *Crotalus* spp. (Bahia/Brasil) em ovinos soro produtores ao longo do processo de imunização;
- Verificar a reatividade antigênica do novo soro anticrotálico monovalente utilizando ensaios de *Western blotting*;
- Avaliar a eficácia do soro anticrotálico monovalente em neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp. em camundongo;
- Analisar histopatologicamente os pulmões e rins de camundongos inoculados com a dose desafio da peçonha de *Crotalus* spp. pré-incubada o soro anticrotálico monovalente.

# Materiais e Métodos



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PEÇONHA (ANTÍGENO)

O *Pool* de peçonha dos espécimes de *Crotalus* spp. representativas do Estado da Bahia, foi obtido de animais mantidos no cativeiro no Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (LAPH-UEFS). Este *pool* de peçonha foi extraído, liofilizado e armazenadas a -20°C.

### 4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO ANTÍGENO

A concentração de proteínas do antígeno foi determinada pelos métodos colorimétricos de Bradford (1976) e Lowry *et al.* (1951) utilizando como padrão soro albumina bovina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

### 4.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A peçonha crotálica foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida com 15% de resolução, na presença de SDS, seguindo o método descrito por Laemmli (1970). Foram utilizadas 0,1 µg, 1,0 µg, 10 µg e 30 µg de proteína da peçonha de *Crotalus* spp. As amostras foram diluídas em 15 µl de água Milli-Q, 4 µl de Tampão de Amostra 5x [ ] (0,313M Tris-HCl, 10% de SDS, 50% de Glicerol, 0,05% Azul de Bromo-fenol, 0,1M DTT, pH 6.8 a 25°C), 1 µl de ditioneitol (DTT) 20x [ ] e aquecidas durante 5 minutos a 95°C. Em seguida foram aplicadas no gel sob uma corrente constante de 90V, por 90 minutos. Os géis foram corados com solução 0,5% de Coomassie Blue G-250 sob agitação e descorado, inicialmente, com solução de 30%

metanol, 10% de ácido acético e, posteriormente, com solução de 5% metanol, 7,5% ácido acético.

Os padrões de massa molecular utilizados foram de 10 KDa a 250 KDa, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards #161-0375 (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

#### 4.4 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO DOS OVINOS PARA PRODUÇÃO DO SORO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE

##### **4.4.1 Plantel de animais utilizados na produção do soro anticrotálico ovino monovalente**

Para a obtenção de soro anticrotálico monovalente, foram utilizados dez ovinos com idade de quatro a cinco meses, sem raça definida. Estes animais foram mantidos em regime de confinamento na Unidade Experimental de Salinas da Margarida da Universidade Federal da Bahia – UFBA, alimentados com ração e feno duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Os ovinos foram avaliados clinicamente pelo médico veterinário responsável, o qual realizou exames parasitológicos seguindo a técnica de Gordon & Whitlock (1939), modificada por Whitlock (1948), cuja unidade é o OPG (ovos por grama de fezes). Os animais foram vermifugados duas vezes antes de iniciar o protocolo de imunização do experimento com Doramectina 1 ml/50 Kg, não ocorrendo novas vermifugações ao longo do experimento.

##### **4.4.2 Protocolo de Imunização de Base do Plantel de Ovinos**

O protocolo para a produção do soro anticrotático monovalente seguiu os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) para a fabricação do soro anticrotático monovalente produzido em equinos do Instituto Vital Brazil (IVB), readequando a dose de peçonha (antígeno) para ovinos. Dez ovinos foram separados em três grupos e submetidos a oito inoculações por via subcutânea em dois pontos da tábua do pescoço do animal após a limpeza da região, com intervalo semanal entre as inoculações, a saber: no dia zero (1ª inoculação), seguido da segunda inoculação no 07º, e das demais nos dias 14º, 21º, 28º, 35º, 42º e 49º, contados a partir da primeira inoculação.

O Grupo Controle I: dois animais foram inoculados de 1 ml/animal de Solução Salina 0,85%. O Grupo Controle II: dois animais foram inoculados com 1 ml/animal de 500 µl de Solução Salina 0,85% emulsificada com 500 µl de Adjuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na 1ª inoculação; 500 µl de Solução Salina 0,85% emulsificada com 500 µl de Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na 2ª inoculação; e 1 ml de Solução Salina 0,85% nas demais inoculações. O Grupo Experimental: seis animais foram inoculados com 200 µg/animal de proteínas do antígeno diluído em 500 µl de Solução Salina 0,85%, emulsificada em 500 µl de ACF na 1ª inoculação; na 2ª inoculação estes animais receberam 200 µg/animal de proteínas do antígeno diluído em 500 µl de Solução Salina 0,85% emulsificada em 500 µl de AIF; e nas demais inoculações os animais receberam 100 µg/animal de antígeno diluído em 1 ml de Solução Salina 0,85%.

#### **4.4.3 Protocolo de Hiperimunização do Plantel de Ovinos**

Ao término do Protocolo de Imunização de Base que teve a duração de 49 dias, o plantel permaneceu em descanso por dois meses antes do início do Protocolo de Hiperimunização. A primeira inoculação deste protocolo ocorreu no 105º dia, quando os animais foram inoculados por via subcutânea em dois pontos da tábua do pescoço do animal.

O Grupo Controle I foi inoculado com solução salina 0,85%, na dosagem de 1ml/animal no 105º dia e com 1,2 ml/animal nos dias 112º, 114º e 116º. O Grupo Controle II foi inoculado com 1 ml/animal de 500 µl de solução salina 0,85% emulsificada com 500µl Adjuvante Incompleto de Freund no 105º dia, nos dias 112º, 114º e 116º este grupo recebeu inoculações de 1,2 ml/animal de solução salina 0,85%. O Grupo Experimental foi inoculado no 105º dia com 1 ml/animal de 400 µg/animal de proteína do antígeno em 500 µl de Solução Salina 0,85% emulsificada em 500 µl de Adjuvante Incompleto de Freund. No 112º, 114º e 116º dia, este grupo recebeu 200 µg de proteínas do antígeno em 1,2 mL de Solução Salina 0,85%.

#### 4.5 OBTENÇÃO DO SORO OVINO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE

A obtenção do soro hiperimune dos animais do grupo experimental ocorreu com a coleta de sangue foi realizada por punção da veia jugular com agulha 25x0,8mm (BD Vacutainer®, New Jercey, EUA) em tubo de coleta a vácuo de 4 ml (BD Vacutainer®, New Jercey, EUA) sem anticoagulante sempre antes das inoculações (imunização de base e hiperimunização) para o acompanhamento da cinética da produção de anticorpos séricos da classe IgG nos ovinos. O sangue coletado foi centrifugado para obtenção dos soros, identificado e armazenado à -20°C.

#### 4.6 VERIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A presença de anticorpos de classe IgG no soro ovino anticrotálico monovalente específicos à peçonha de *Crotalus* spp. foi avaliada seguindo o método utilizado por Theakston, Jane Lloyd-Jones, Reid (1977). Amostras de sangue foram coletadas nos diferentes intervalos de tempo, a saber: tempo zero (minutos antes da

primeira inoculação) e no 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup>, 28<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup>, 60<sup>o</sup>, 90<sup>o</sup>, 120<sup>o</sup>, 150<sup>o</sup> e 180<sup>o</sup> dia após imunização.

Para padronização do ELISA foram utilizadas duas diluições de anticorpo anti-IgG de ovino produzido em coelho marcado com peroxidase (1:10.000 e 1:20.000), bem como seis diluições do soro anticrotálico monovalente (1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000) e do antígeno com fator de diluição 2 (1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg e 0,125 µg). Soros de ovinos não imunizados com o antígeno foram utilizados como controle negativo.

Após a padronização, placas de poliestireno para microtitulação, 96 poços, fundo chato, estéril (PerkinElmer, Califórnia, EUA) foram sensibilizadas com 0,250 µg de proteína do antígeno diluído em 100 µl de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6. As placas foram incubadas durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após duas lavagens consecutivas com Tampão Fosfato Salina (TFS) contendo 0,05% de Tween 20 (TFS-T), as placas foram bloqueadas com 200 µl/poço de solução de TFS-T contendo 5% de leite desnatado Molico<sup>®</sup> (Nestlé, Brasil), por 2 horas em câmara úmida a 37°C. Após novo ciclo de lavagens das placas, foram adicionados 50 µl/poço de soro a ser testado (1:500), de modo a haver apenas um soro/poço diluído em TFS-T contendo 1% de leite desnatado, aplicado em duplicata, e novamente incubado por 1 hora em câmara úmida a 37°C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e incubadas por 45 minutos em câmara úmida a 37°C com 50 µl/poço de soro de anticorpo anti-IgG de ovelha produzido em coelho marcado com peroxidase (1:20.000) (SouthernBiotech, Alabama, EUA), diluído em TFS-T contendo 1% de leite desnatado. Após ciclo de cinco lavagens, a reação foi revelada pela adição de 50 µl/poço de substrato cromogênico (peróxido de hidrogênio) e 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB), deixando reagindo à temperatura ambiente por 15 min. A reação interrompida com a aplicação de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 µl/poço.

Os valores da densidade óptica (DO) foram determinados em comprimento de onda, usando filtros de 450 nm e 655 nm em leitor automático de microplacas (iMark Microplate Reader S/N 10978, Bio-Rad, California, USA). Os resultados obtidos foram expressos com base nas médias para cada amostra.

#### 4.7 VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E REATIVIDADE CRUZADA POR WESTERN BLOTTING

Para verificação da especificidade e reatividade do soro anticrotálico monovalente, 30 µg de proteína da peçonha de *Crotalus* spp. foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida com 15% de resolução, na presença de SDS, seguindo o método descrito por Laemmli (1970) como descrito acima. Posteriormente, foi transferida sob corrente constante de 15 V durante 110 minutos para a membrana de PVDF, poro 0,22 µm (Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting, control BR 05536100, Bio-Rad, Califórnia, EUA) em sistema semi-seco Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Califórnia, EUA), de acordo com a técnica descrita por Towbin *et al.* (1979). As proteínas presentes nas membranas de PVDF foram submetidas à caracterização enzimática, com a incubação por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante em solução TBS-T (20 mM de Trisbase, 150 mM de NaCl, 0,005% de Tween 20, pH 8.0), contendo 5% de leite desnatado (Itambé, Minas Gerais, Brasil). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C sob agitação constante com o soro anticrotálico monovalente na diluição 1:2.500 em tampão de incubação TSF-T contendo 5% de leite desnatado. Após um ciclo com três lavagens de dez minutos com TBS-T sob agitação constante, as membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo anti-IgG de ovino produzido em coelho e marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), diluído 1:5.000 em tampão de incubação, sob agitação constante. Após novo ciclo de lavagens, os componentes antigênicos foram revelados pela adição do kit quimioluminescente ECL (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) com tempo de exposição de 1,5 e 3 minutos.

#### 4.8 VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DO SORO OVINO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE FRENTE À DOSE DESAFIO (3 DL<sub>50</sub>) DA PEÇONHA DE *Crotalus* spp.

Nos estudos sobre a efetividade (dose efetiva - ED<sub>50</sub>) de um antiveneno em neutralizar as principais atividades tóxicas de uma peçonha, se utiliza com padrão quatro ou cinco doses de letalidade média (DL<sub>50</sub>) (OPS 1977; WHO, 1981; 2010). A dose utilizada da peçonha de *Crotalus* spp. foi estabelecida tendo como base a DL<sub>50</sub> para camundongos padronizada por Biondi (2009).

Para avaliar a ED<sub>50</sub> do soro ovino anticrotálico monovalente foram utilizados *pools* de soros obtidos após 40 dias o término da imunização de base (T<sub>90</sub>) e 60 dias após a hiperimunização (T<sub>180</sub>).

A dose de 3 µg/animal (3 DL<sub>50</sub>) da peçonha de *Crotalus* spp. foi incubada com 50 µl e 200 µl do soro anticrotálico monovalente, em um volume final de 500 µl de Tampão Fosfato Salina (TFS) por 30 minutos a 37°C. Após este período, as soluções foram centrifugadas por 5 minutos a 500 g a 4°C, para retirada de imunocomplexos e obtenção do sobrenadante o qual foi utilizado nos ensaios de neutralização (LOPES-FERREIRA *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2000; BIONDI, 2009).

Utilizamos 36 camundongos *Swiss* machos, pesando entre 18 g e 22 g, separados aleatoriamente em grupos contendo seis animais cada, mantidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana sob condições controladas de temperatura (22°C ± 2), umidade e iluminação (ciclos claro/escuro de 12 horas), com água e ração *ad libitum*, a saber:

**Grupo Experimental I:** animais inoculados com 3 µg/animal de peçonha pré-incubada com a dose de 50 µl soro anticrotálico monovalente obtido após 40 dias o término da imunização de base;

**Grupo Experimental II:** animais inoculados com 3 µg/animal de peçonha pré-incubada com 200 µl de soro anticrotálico monovalente obtidos após 40 dias o término da imunização de base;

**Grupo Experimental III:** animais inoculados com 3 µg/animal de peçonha pré-incubada com as doses de 50 µl soro anticrotálico monovalente obtido após 60 o término da hiperimunização;

**Grupo Experimental IV:** animais inoculados com 3 µg/animal de peçonha pré-incubada com as doses de 200 µl soro anticrotálico monovalente obtido após 60 o término da hiperimunização;

**Grupo Controle Positivo:** animais inoculados com 3 µg/animal de peçonha diluída em TFS com um volume final de 500 µl;

**Grupo Controle Negativo:** animais inoculados com 500 µl de TFS.

Todos os animais foram inoculados por via peritoneal, ficando em observação por 96 horas, período em que as manifestações locais e sistêmicas foram avaliadas em todos os grupos em intervalos de tempo de: 30 minutos, 2h, 4h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h após inoculação da dose desafio (BIONDI, 2009).

#### 4.9 ANÁLISE MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS (DOS PULMÕES E RINS)

Após o período de observação, os animais foram sacrificados com pentobarbital sódico (Hypnol® Cristália; 50 mg/Kg injetado via intraperitoneal) para a análise macroscópica dos órgãos, exceto os animais do grupo controle positivo que tiverem morte espontânea. Tecidos dos pulmões e rins dos animais de todos os grupos foram imediatamente fixados em formol tamponado a 10%, durante 48 horas e armazenadas em álcool etílico a 70%. Após a fixação, os fragmentos dos tecidos foram clivados, descalcificados, processados, incluídos em parafina, seccionados em cortes de 5 µm de espessura, submetidos à coloração pela hematoxilina (H) e pela eosina (E) e selados com Bálsamo do Canadá em lâminas de 1,0 mm de espessura e dimensões de 25,4 x 76,2 mm. As lâminas foram escaneadas no 3D Histech Scanner de Lâminas do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CAPI/ICB/UFMG), as imagens obtidas foram trabalhadas no programa Pannoramic Viewer 1.15.4 3D Histech.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos testes bioquímicos e ensaio de soroneutralização foram analisados descritivamente. Para construção de gráficos, tabelas e análise estatística dos níveis de anticorpos foi utilizado o software Microsoft Office Excel 2007, com análise de variância para amostras com distribuição normal e dados pareados. Os níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos utilizando o teste de Tukey. As diferenças apresentando valores de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes.

#### 4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Toda a atividade experimental envolvendo animais respeitou os princípios éticos conforme da Resolução 879/2008 e em conformidade com os parâmetros estabelecidos pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal da Bahia  
CEUA/UFBA.

# Resultados e Discussão



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DOSE PROTEICA DA PEÇONHA (ANTÍGENO)

Utilizamos o método de Bradford (1976) e de Lowry *et al.* (1951) para determinar a concentração proteica do “pool” de peçonha de *Crotalus* spp., que foi utilizado neste trabalho. Ambos os métodos apresentaram resultados similares: 2,0 mg/ml pelo método Bradford e 2,1 mg/ml por Lowry. Assim, optamos por este último método para ser utilizado como padrão ao longo dos demais experimentos realizados neste trabalho.

Estes métodos têm sido amplamente utilizados por diversos autores para determinar a concentração proteica do leite (PEREIRA *et al.*, 2013), e peçonhas de serpentes (MÁLAGA *et al.*, 2000; NISHIJIMA *et al.*, 2006; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2009), de escorpiões (FERREIRA, 2013), de peixes (SOSA-ROSALES *et al.*, 2005; JUNQUEIRA, 2006), e de toxinas presentes em óvulos de aranha viúva-negra, *L. tredecimguttatus* (YAN *et al.*, 2014), dentre outros.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético da peçonha de *Crotalus* spp., revelou a presença de bandas de massa molecular de 10 kDa a acima de 250 kDa, nas diversas concentrações proteicas da peçonha avaliadas (Figura 01), demonstrando que quanto maior a concentração de proteína aplicada maior número de bandas identificadas. Na concentração com 0,1 µg de peçonha, foi identificada uma fraca banda com 15 kDa. Utilizando 1,0 µg/peçonha está nítida a presença de duas bandas bastante próximas, uma com 15 kDa e outra um pouco acima de 15 kDa.

Nas concentrações de 10 µg e 30 µg de peçonha, foram identificadas dez bandas, a saber: uma banda fraca acima de 150 kDa, uma forte abaixo de 75 kDa; uma banda fraca abaixo de 50 kDa e outra fraca com 37 kDa; uma banda forte e uma fraca entre 37-25 kDa; uma banda fraca com 25 kDa; uma banda forte acima de 15 kDa, e outra com 15 kDa e uma fraca com 10 kDa. Exceção para a concentração de 30 µg/peçonha que apresentou duas bandas fracas uma acima de 250 kDa e outra com 100 kDa (Figura 01).

Este perfil eletroforético da peçonha de *Crotalus* spp., com banda acima de 15 kDa, com 15 kDa e com 10 kDa é compatível com os descritos por (OLIVEIRA, 2014) para a peçonha de *C. d. ruruima*, que habitam a Floresta Amazônica, para as cardiotoxinas para *Crotalus scutulatus*, cascavéis da América do Norte e Central (BIEBER *et al.*, 1975). Biondi (2009) também identificou a presença de bancas proteicas com massa molecular acima de 250 kDa para esta mesma espécie (*Crotalus* spp) que habita o Estado da Bahia. Além disso, descreve novas toxinas com massas moleculares entre 116-66 kDa, 66-45 kDa, 45-35 kDa e entre 35-25 kDa, presentes apenas nas peçonhas da espécie *Crotalus* spp.

Estas massas moleculares estão enquadradas no grupo das serinoproteinases e metaloproteinases, sendo importantes na fisiopatologia do empeçonhamento por apresentarem atividades fibrinolítica, procoagulante (Biondi 2009), mionecrótica e hemorrágica (OWNBY, 1990; BJARNASON & FOX, 1994). Tais toxinas também estão presentes na peçonha de populações de *Crotalus* spp., a

qual apresenta grande similaridade com *C. d. cumanensis* e *Crotalus vegrandis* da Venezuela com alta atividade hemorrágica (AGUILAR, GIRON, RODRIGUEZ-ACOSTA, 2001), como também com as peçonhas das *Crotalus durissus* da Costa Rica e Guatemala (SARAVIA *et al.*, 2002) e as *Crotalus* da América Central e do Norte (OWNBY, 1990).

Toxinas como metaloproteinases PIII 97 kDa (4,8%), serinoproteases 29-56 kDa (8,2%), PLA<sub>2</sub> 14,1 kDa e 16,5 kDa (59,5%), lectina tipo C 14-16 kDa (1,7%), crotapotina 9 kDa e crotamina 4-5 kDa (19%) também estão presentes nas peçonhas crotálicas da Americana do Sul, de *Crotalus* spp. na Bahia (BIONDI, 2009) e na peçonha de *C. d. cumanensis* (BOLDRINI-FRANCA, 2010). Uma nova serinoprotease com massa molecular de 28 kDa, apresentando similaridade com outras enzimas “trombina-like” foi descrita por Fonseca (2006), para a peçonha de *Crotalus durissus cascavella* do estado no Ceará. Esses dados estão em consonância com Biondi (2009) e com os achados deste trabalho.

Estas faixas de massa molecular até o momento não foram descritas para as peçonhas de *Crotalus durissus terrificus*, que é utilizada para a produção de soro anticrotálico no Brasil. A caracterização do proteoma da peçonha de *C. d. terrificus* demonstrou que 59,5% desta peçonha é composta por crotóxina, toxina que confere a característica neurotoxicidade do acidente causado por esta subespécie (CALVETE *et al.*, 2010). Assim, a ampliação da neurotoxicidade na peçonha de *C. durissus* é resultado do aumento na concentração da crotóxina e da crotamina, uma característica positivamente selecionada ao longo da invasão, dispersão e diversificação das cascavéis na América do Sul (CALVETE *et al.*, 2010).

Diante disso, verifica-se a ocorrência de dois fenótipos distintos entre as peçonhas crotálicas da Americana do Sul, uma vez que *C. d. cumanensis* apresenta altos níveis de metaloproteinases e baixa potência letal, enquanto que as subespécies *C. d. terrificus*, *C. d. ruruima* e *C. d. durissus* têm baixos níveis de metaloproteinases e alta neurotoxicidade (CALVETE *et al.*, 2010). Esta variação intra e interespecífica dos componentes da peçonha de serpentes pode resultar em diferentes efeitos clínicos (JANES; BUSH; KOLLURU, 2010), impactando diretamente na efetividade da soroterapia e conseqüentemente no Sistema Único de Saúde (SUS).

No presente trabalho a peçonha utilizada foi extraída de espécimes mantidos em cativeiro permitindo o controle de fatores extrínsecos. Assim, as diferenças observadas na peçonha de *Crotalus* spp. frente as demais peçonhas crotálicas descritas na literatura são resultados de fatores intrínsecos, ontogenéticos e não por variações individuais (LOMONTE *et al.*, 1983; FURTADO, SANTOS, KAMIGUTI, 2003). Lomonte *et al.* (1983) descrevem variações intraespecíficas entre espécimes adultos e recém-nascidos de *Crotalus durissus durissus*, onde as características fisiopatológicas do empeçonhamento em ratos diferem radicalmente. Tal observação corrobora com Willemse (1978), cujo estudo reportou variações intra e interespecífica em serpentes da África do Sul (*Bitis arietans*, *Causus rhombeatus*, *Naja nivea*, *Naja haje*, *Naja nigricollis* e *Hemachatus haemachatus*), referentes tanto ao número de proteínas presentes nas peçonhas quanto em suas concentrações. Segundo o autor, essas variações estão relacionadas a fatores intrínsecos e não a fatores extrínsecos, como a origem geográfica, estação, sexo, idade ou dieta.

As variações bioquímicas e farmacológicas da peçonha crotálica influenciam diretamente em suas atividades biológicas (LOMONTE *et al.*, 1983; BIONDI, 2009), devido as múltiplas funções de seus componentes, incluindo imobilização, morte e digestão das presas (CALVETE *et al.*, 2013). A variabilidade da composição da peçonha desde o gênero até níveis individuais permite sua adaptação a diferentes nichos ecológico (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014). A composição da peçonha de uma população de serpente é resultado da seleção natural frente ação necessária para obtenção e digestão de sua presa (CHIPPAUX, WILLIAMS, WHITE, 1991), uma vez que a capacidade de induzir a morte rápida de sua presa é uma estratégia de captura importante na evolução da espécie (FURTADO, SANTOS, KAMIGUTI, 2003).

Sabe-se que as peçonhas de serpentes são misturas complexas contendo proteínas e polipeptídeos que induzem vários sintomas farmacológicos na vítima de agravos causados por este agente etiológico (KINI & EVANS, 1990). Dentre as toxinas presentes na peçonha crotálica, a crotoxina é considerada a principal, apresentando a atividade biológica mais proeminente e característica destes agravos, a neurotoxicidade. É composta por duas subunidades, uma ácida

denominada crotapotina e uma básica, a PLA<sub>2</sub>. Sua presença representa 70-80% das proteínas totais da peçonha (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010).

Algumas destas proteínas interferem na coagulação sanguínea e na agregação plaquetária, apresentando atividade seletiva podendo interferindo na ativação plaquetária, coagulação e a fibrinólise da cascata de hemostasia por vários mecanismos. Algumas são enzimas (PLA<sub>2</sub>, metaloproteinases, serinoproteinases, nucleotidase), porém outras não apresentam atividade enzimática (desintegrinas e lectinas de tipo C) (BRAUD; BON; WISNER, 2000; KINI & EVANS, 1990).

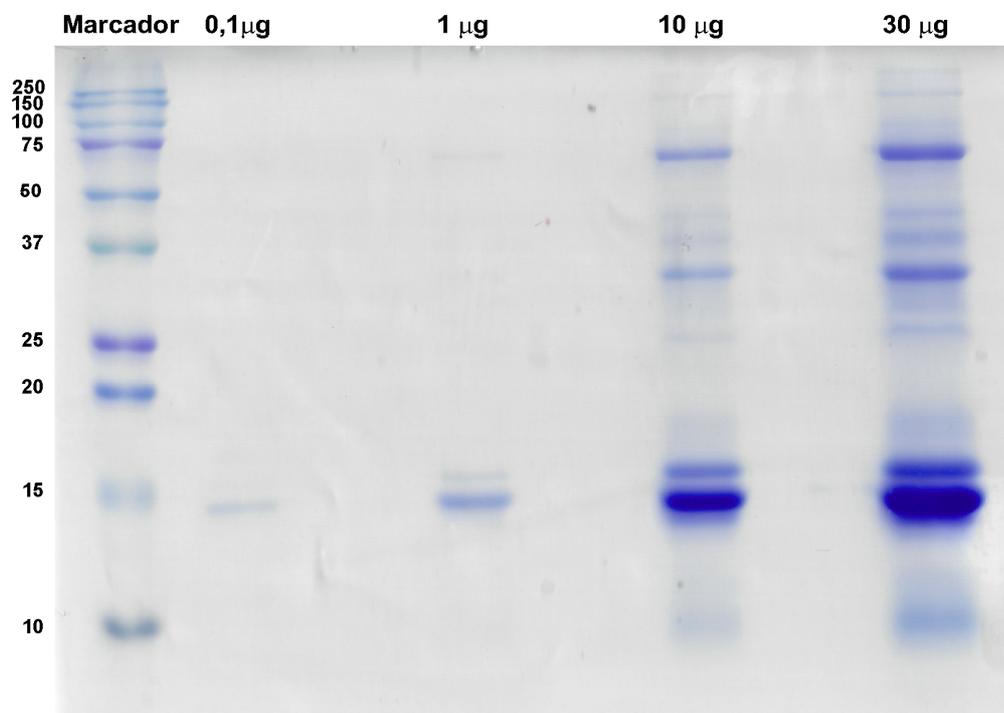
As nucleotidase são potentes inibidores da agregação plaquetária, atuando através da remoção de ADP que é libertada pelos indutores de agregação e o acúmulo de adenosina. As PLA<sub>2</sub>s podem interferir em várias funções fisiológicas, agindo como anticoagulantes ou induzir a agregação plaquetária através da libertação direta do ácido aracdônico pela sua atividade enzimática ou indiretamente pela ativação dos fatores de agregação plaquetária endógenos (BRAUD; BON; WISNER, 2000; KINI & EVANS, 1990; OUYANG & TENG, 1979; BOFFA & BOFFA, 1976). Podem ainda exibir efeitos bifásicos ao iniciar a agregação quando se encontram em baixa concentração ou curto tempo de incubação, e posteriormente inibir a agregação quando sua concentração for elevada ou o tempo de incubação for maior (KINI & EVANS, 1990; OUYANG & TENG, 1979).

A serinoproteases, em sua maioria, tem como alvo principal as plaquetas, a coagulação plasmática ou o sistema fibrinolítico (BRAUD *et al.*, 2000), atuando sob a cascata de coagulação como potente fator de agregação plaquetária (FATIMA & FATAH, 2014). Quando isolada não apresenta ação letal, contudo, quando associada com outras proteínas da peçonha ela contribui para o efeito tóxico (BRAUD; BON; WISNER, 2000). As metaloproteinases, também conhecidas como hemorraginas, causam sangramento local e sistêmico, afetando vários órgãos como: coração, fígado, pulmões, intestinos e cérebro, além de causar inchaço, bolhas e necrose (FATIMA & FATAH, 2014), e são compostas de um domínio catalítico associado ou não a um domínio de desintegrina e/ou um domínio de lectina do tipo C, e um ou vários domínios não catalíticos (BRAUD; BON; WISNER, 2000). As desintegrinas são proteínas não catalíticas das peçonhas que inibem a agregação plaquetária por competir com integrinas endógenas. Já as lectinas tipo C se ligam seletivamente a

proteínas da membrana plaquetária ou fatores de coagulação do sangue (BRAUD; BON; WISNER, 2000; KINI & EVANS, 1990).

Vítimas de agravos causados por serpentes da família Crotalidae podem apresentar coagulopatia, trombocitopenia, hipofibrinogenemia ou ambos. Através da desagregação e destruição das plaquetas devido ao sequestro de plaquetas em tecido danificado nos locais de picadas ou sensibilização resultante de danos endoteliais vasculares, encurtamento meias-vidas e armazenamento de medula esgotado ou prejudicado (SEIFERT *et al.*, 1997).

**Figura 01.** Avaliação da composição proteica da peçonha de *Crotalus* spp. (Bahia/Brasil). A peçonha foi diluída em tampão de lise contendo 2% de proteases e 2% de inibidor de fosfatases I e II, fracionada em condições redutoras na presença de SDS em gel de eletroforese de poliacrilamida 15% e corado com Coomassie Blue. A primeira coluna apresenta o marcador de massa molecular em kDa cujas massas estão indicadas ao lado esquerdo do gel; nas demais colunas, alíquotas contendo diferentes concentrações proteicas da peçonha: 0,1  $\mu$ g, 1,0  $\mu$ g, 10,0  $\mu$ g e 30,0  $\mu$ g, respectivamente.



### 5.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS OVINOS SORO PRODUTORES AO LONGO DO PROCESSO DE IMUNIZAÇÃO DE BASE E HIPERIMUNIZAÇÃO

Os ovinos soro produtores tiveram sua avaliação clínica diária iniciada na primeira imunização, e perduraram em observação durante 180 dias para acompanhar a cinética da resposta imune humoral dos ovinos após a hiperimunização, devido a elevada toxicidade da peçonha de *Crotalus* spp., que após inoculação subcutânea no animal soro produtor, é drenada pela linfa podendo estimular células dendríticas, macrófagos e linfócitos B localizados nos linfonodos retrofaríngeos, submandibulares, pré-escapulares, subescapulares ou pré-femorais a depender do local anatômico de inoculação (LÉON *et al.*, 2011).

Por utilizar o protocolo de produção de soro anticrotálico monovalente do Instituto Vital Brazil para imunização de equinos, o mesmo foi adaptado para ser aplicado neste estudo com ovinos. Exames de hemograma e parasitológicos realizados no início e ao término do processo de imunização confirmaram as boas condições de saúde dos ovinos.

O exame físico dos ovinos mostrou que os animais do Grupo Controle I, inoculados com solução salina, não apresentaram alterações locais ou sistêmicas (Figura 02 A e B). Os ovinos do Grupo Controle II, inoculados com solução salina e Adjuvante Completo de Freund (ACF) no T<sub>0</sub> e com Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) no T<sub>7</sub>, apresentaram a formação de abscessos no local de inoculação que se instalou nos primeiros sete dias de inoculação, permanecendo sem rompimento até o final do experimento (180 dias) (Figura 02 C e D). Os ovinos do Grupo Experimental, imunizados com o antígeno (peçonha) e ACF, apresentaram a formação de abscesso com alopecia nos locais de inoculação que se instalou nos primeiros sete dias (Figura 02 E e F; Figura 03 A). No décimo quinto dia após a inoculação do antígeno emulsificado com o ACF, houve o rompimento do abscesso, extravasando material purulento de consistência pastosa e coloração amarela esverdeada sem odor (Figura 03 B e C). Este local foi lavado (Figura 03 D) e tratado com álcool iodado até sua completa cicatrização que ocorreu em sete dias. Os locais de inoculação com AIF nos animais do Grupo Experimental também apresentaram a

formação de abscessos, porém estes perduraram até o término do tempo amostral de 180 dias, como observado para o Grupo Controle II.

Alterações semelhantes às encontradas neste trabalho, como aumento do diâmetro, alopecia, abscesso supurativo e áreas ulceradas com exsudato purulento verificadas no Grupo Experimental nos locais da inoculação, foram observadas em ovinos inoculados com peçonhas de *C. d. terrificus* (FERREIRA-JÚNIOR, 2005; ANDERLINE, 2009), apesar desta peçonha não apresentar efeito local. Deste modo, os autores atribuíram a ocorrência de alterações locais ao adjuvante de Freund. De modo contrário a estas observações, neste trabalho só ocorreu o rompimento do abscesso com extravasamento de material purulento quando foi inoculado o adjuvante emulsificado com a peçonha de *Crotalus* spp., que segundo Biondi (2009) esta peçonha causa inflamação local, recrutamento leucocitário e destruição de colágeno e fibras.

As coleções purulentas (abscessos), formadas pela presença de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* mortos e liofilizados na composição do ACF, se abrem espontaneamente devido a ação dos fermentos proteolíticos libertados pelos leucócitos mortos, destruindo os tecidos circunvizinhos liberando pus, o qual apresenta uma consistência granulosa e coloração esverdeada. O local de rompimento do abscesso cicatriza rapidamente após a drenagem do pus, devido a ação de um tecido de granulação que reconstitui os tecidos (SIQUEIRA, 1940).

Diante disso, possivelmente as alterações locais observadas no Grupo Experimental e Grupo Controle II, são resultantes da resposta inflamatória estimulada pelos adjuvantes empregados no processo de imunização, como observado por Ferreira (2013) com a peçonha de *Tityus serrulatus*, que detectou a formação de abscessos no local de inoculação do adjuvante de Freund independentemente do grupo estudado, não detectando alterações locais nas inoculações reforços sem adjuvantes. Os abscessos rígidos formados no local de inoculação do AIF permaneceram até o final do período experimental. Ferreira Júnior (2009), observou estruturas semelhantes em ovinos inoculados com o mesmo adjuvante, formando estes abscessos fibróticos.

Assim, a formação dos abscessos pode ser atribuída à ação inflamatória promovida pelos adjuvantes. Além disso, devido a baixa capacidade imunogênica e

elevada toxicidade da peçonha crotálica (STOCKER *et al.*, 1990; SILVA, 2009), e com vistas empregar protocolos de baixas doses de antígeno e baixos volumes aplicados, utiliza-se adjuvantes para potencializar a resposta imune de memória persistente, (BRUNI, 2008; WAGHMARE *et al.*, 2009). Desta forma, neste trabalho, a utilização dos adjuvantes permitiu intensificar e prolongar a resposta imune ao antígeno, pois os adjuvantes de Freund induzem uma resposta imune do tipo MHC de classe II causando reação inflamatória local, ocorrendo a ativação dos mecanismos de imunidade específica ao estabelecer um processo inflamatório durante a imunização (RESENDE *et al.*, 2004), levando a picos de neutrófilos quando empregado (FERREIRA, 2013).

Neste trabalho, não foram observadas alterações sistêmicas nos ovinos do imunizados com o antígeno (peçonha de *Crotalus* spp.). Esses dados corroboram com achados de Ferreira-Júnio *et al.* (2006), nos quais ovinos hiperimunizados com a peçonha de *C. d. terrificus* não apresentaram alterações sistêmicas, debilidade ou deficiência nutricional provocada pela peçonha. Todavia, segundo Ferreira (2013), os ovinos hiperimunizados com a peçonha de *Tityus serrulatus* para a produção de soro antiescorpiônico (FERREIRA, 2013) apresentaram alterações clínicas como taquicardia, taquipneia, elevação da temperatura corporal, hipomotilidade ruminal e aumento de secreção traqueal verificadas em alguns momentos, sugerindo que estas seriam provocadas pela peçonha.

Bovinos e bubalinos experimentalmente envenenados com a peçonha de *C. d. terrificus* apresentaram alterações sistêmicas como: arrastar pinças no solo, apatia (cabeça baixa), letargia, edemaciação no local da inoculação, dispneia, diminuição do tônus da língua (facilitando sua exteriorização ou dificultando seu recolhimento), sialorreia (escoamento de saliva para fora da boca causada por paralisia facial), movimentos de pedalagem, protusão do esfíncter anal, acentuada paralisia dos músculos da face e ptose palpebral (LAGO *et al.*, 2000; GRAÇA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2011).

Empeçonhamentos experimentais em ovinos com doses letais das peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni* e *Bothropoides neuwiedi*, provocaram sinais clínicos como: pelos arrepiados, dor, aumento de volume no local de inoculação se estendendo até a porção ventral do pescoço causado por hemorragia, apatia,

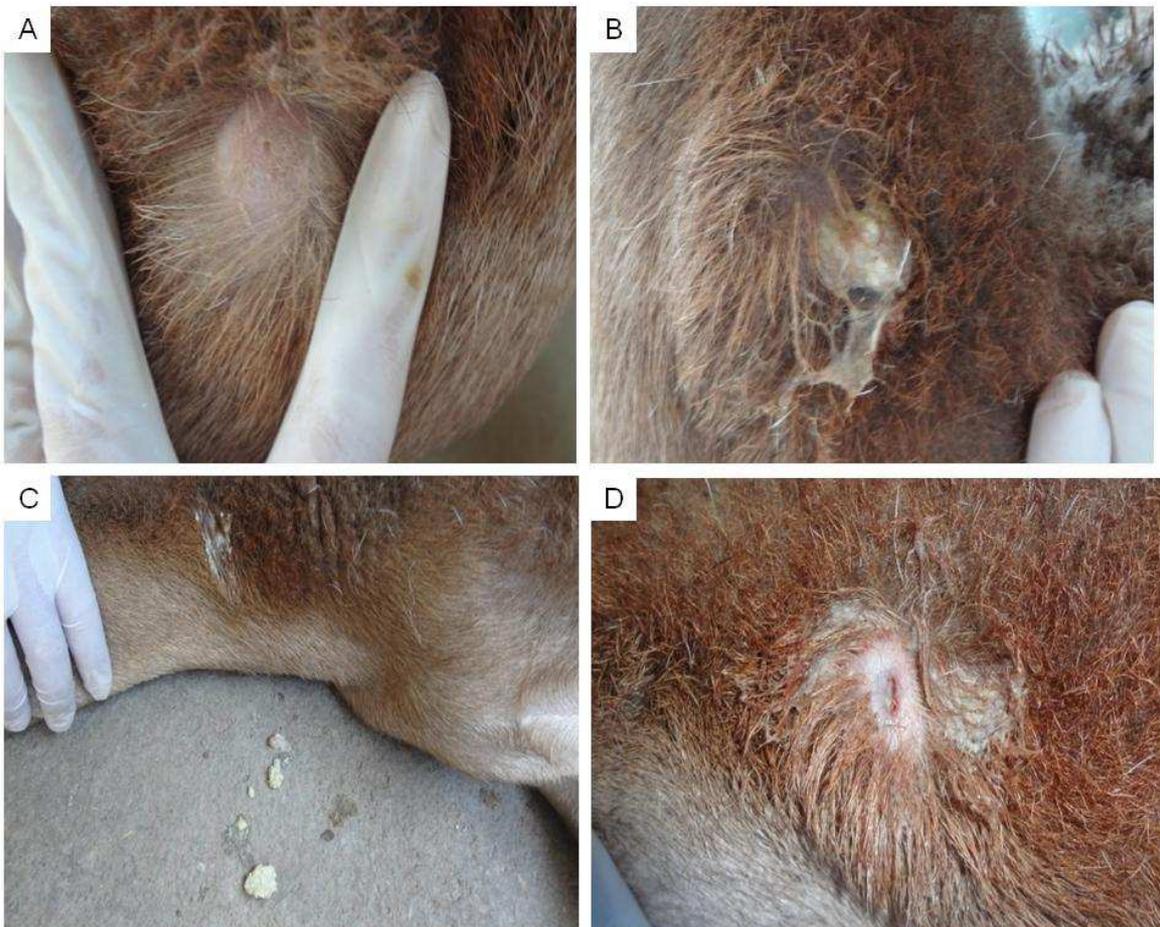
sonolência, falta de apetite, agitação, contrações abdominais, salivação moderada, mucosas pálidas e aumento da frequência cardíaca, fezes com sangue, discretos tremores musculares nos membros posteriores, fraqueza, desequilíbrio, queda e morte. Contudo, nenhum destes sinais foram observados no presente trabalho. (TOKARNIA *et al.*, 2008; DIEFENBACH *et al.*, 2012).

Estes fatos demonstram que a peçonha de *Crotalus* spp. nas doses empregadas foram adequadas para a hiperimunização dos ovinos sem ao mesmo tempo causar qualquer efeito tóxico nos animais soro produtores.

**Figura 02.** Avaliação clínica dos efeitos locais ocorridos durante os primeiros sete dias do protocolo de imunização. O Grupo Controle I (A e B), inoculado com Solução Salina 0,85% não apresentaram alterações no local da Inoculação. Grupo Controle I (C e D), inoculado com Adjuvante Completo de Freund e com Solução Salina 0,85%, apresentaram formação de abscessos; Grupo Experimental (E e F), inoculado com 200 µg de proteína da peçonha de *Crotalus* spp. diluída com Adjuvante Completo de Freund e Solução Salina 0,85%, demonstra o início da formação do abscessos como alopecia.



**Figura 03.** Observação clínica dos efeitos locais ocorridos nos ovinos do Grupo Experimental inoculado com 200 µg de proteína da peçonha de *Crotalus* spp. diluída em Solução Salina 0,85% e emulsificada com Adjuvante Completo de Freund. Formação de abscessos como alopecia sete dias após a primeira inoculação (A). Quinze dias após a inoculação, houve o rompimento natural dos abscessos com o extravasamento de material purulento de consistência pastosa e coloração amarela esverdeada (B e C); Detalhe da lesão após rompimento do abscesso e remoção do material resultante do processo inflamatório (D).



#### 5.4 VERIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG ESPECÍFICOS A PEÇONHA DE *CROTALUS* SPP. POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

O protocolo de imunização depende da toxicidade e da imunogenicidade da peçonha, do modelo animal utilizado e da qualidade da resposta imune do animal (CHIPPAUX & GOYFFON, 1991). Ao utilizar doses de antígeno (200 µg de proteína) para a imunização dos ovinos no presente trabalho, foram obtidos elevados títulos de IgG específico a peçonha de *Crotalus* spp. (Figuras 04 e 05).

A curva da cinética da produção de anticorpos de classe IgG do Grupo Experimental demonstrando que houve um aumento acentuado do título de anticorpos na resposta primária, a qual foi muito baixa. Logo após a primeira dose reforço (T<sub>7</sub>) verificou-se elevados títulos de anticorpos específicos à peçonha de *Crotalus* spp., a partir do 14º dia, denominado de Tempo T<sub>14</sub> cuja D.O. média é superior a 0,700. Esta resposta secundária foi mantida pelas demais doses reforço, havendo um aumento progressivo dos títulos de IgG no intervalo entre o 14º e o 90º dia, atingindo a titulação máxima no Tempo amostral T<sub>120</sub>, cuja DO média foi de 1,120, evidenciando o aumento da especificidade à peçonha de *Crotalus* spp. ao longo do processo de hiperimunização. Após o T<sub>120</sub>, a cinética da produção destes anticorpos passa a ter uma linearidade descendente até o 180º dia. Em contraposição, e como já esperado, nos Grupo Controle I e Grupo Controle II os títulos de IgG permaneceram baixos, sem diferença significativa (Figura 04 e 06).

A cinética da produção de anticorpos de classe IgG específica a peçonha de *Crotalus* spp., foi parcialmente semelhante entre os ovinos do Grupo Experimental devido a variações nas respostas individuais, com destaque para os animais de nº 278 que apresentou maior título de IgG na Hiperimunização (D.O. 1,212), e o de nº 277 apresentou os maiores títulos de IgG na Imunização de Base (D.O. 1,203). Em contraposição o animal de nº 273 apresentou uma cinética oscilante do restante do grupo (Figura 05).

As análises de variância mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos empregados ( $p = 0,00000000105$ ), utilizando o teste *t* para comparar os níveis de anticorpos entre os grupos estudados, estes foram

considerados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). Entre o Grupo Experimental e o Grupo Controle I ( $p = 0,0000559$ ), entre o Grupo Experimental e o Grupo Controle II ( $p = 0,0000543$ ) e entre o Grupo Controle I e o Grupo Controle II ( $p = 0,711169734$ ). Essas diferenças observadas provavelmente ocorreram em função do tratamento empregado para imunização dos ovinos.

A cinética da produção inicial de anticorpos IgG específicos a peçonha crotálica foi semelhante ao verificado por Dos Santos *et al.* (1988), na qual camundongos imunizados com PLA<sub>2</sub> e a peçonha bruta de *C. d. terrificus* apresentaram elevados títulos de anticorpos a partir do décimo quinto dia da imunização, permanecendo semelhante até o término de período experimental. Elevados títulos de IgG também foram obtidos por Beghini *et al.* (2008) em antissoro produzido em coelhos imunizados contra a crotapotina, a subunidade ácida do complexo crototoxina que é a toxina em maior quantidade e maior toxicidade da peçonha de *C. d. cascavella*.

Dos Santos *et al.* (1988) demonstraram que a resposta imune contra a PLA<sub>2</sub> da peçonha de *C. d. terrificus* é consideravelmente maior quando o antígeno é combinado a um adjuvante na mistura antigênica, seja emulsificado com o Adjuvante Completo de Freund ou misturado a suspensão de Hidróxido de Alumínio. Ovinos hiperimunizados com a peçonha de *Tityus serrulatus* utilizando os mesmos adjuvantes empregados neste trabalho também apresentaram elevados títulos de anticorpos (FERREIRA, 2013), possivelmente devido a resposta imune de memória desencadeada pela reação inflamatória local promovida pelo adjuvante de Freund (RESENDE *et al.*, 2004), o qual é capaz de modular positivamente a produção de anticorpos, havendo um significativo aumento no título de anticorpos após a segunda e terceira inoculação (CRIBBS *et al.*, 2003), devido a resposta imunológica secundária estimulada pelas demais imunizações, a qual é mais rápida e mais vigorosa que a resposta primária ao antígeno e os anticorpos sintetizados se ligam ao antígeno com uma afinidade muito maior, podendo ser retido por mais de 2 anos após a primeira inoculação (STEINER & EISEN, 1966).

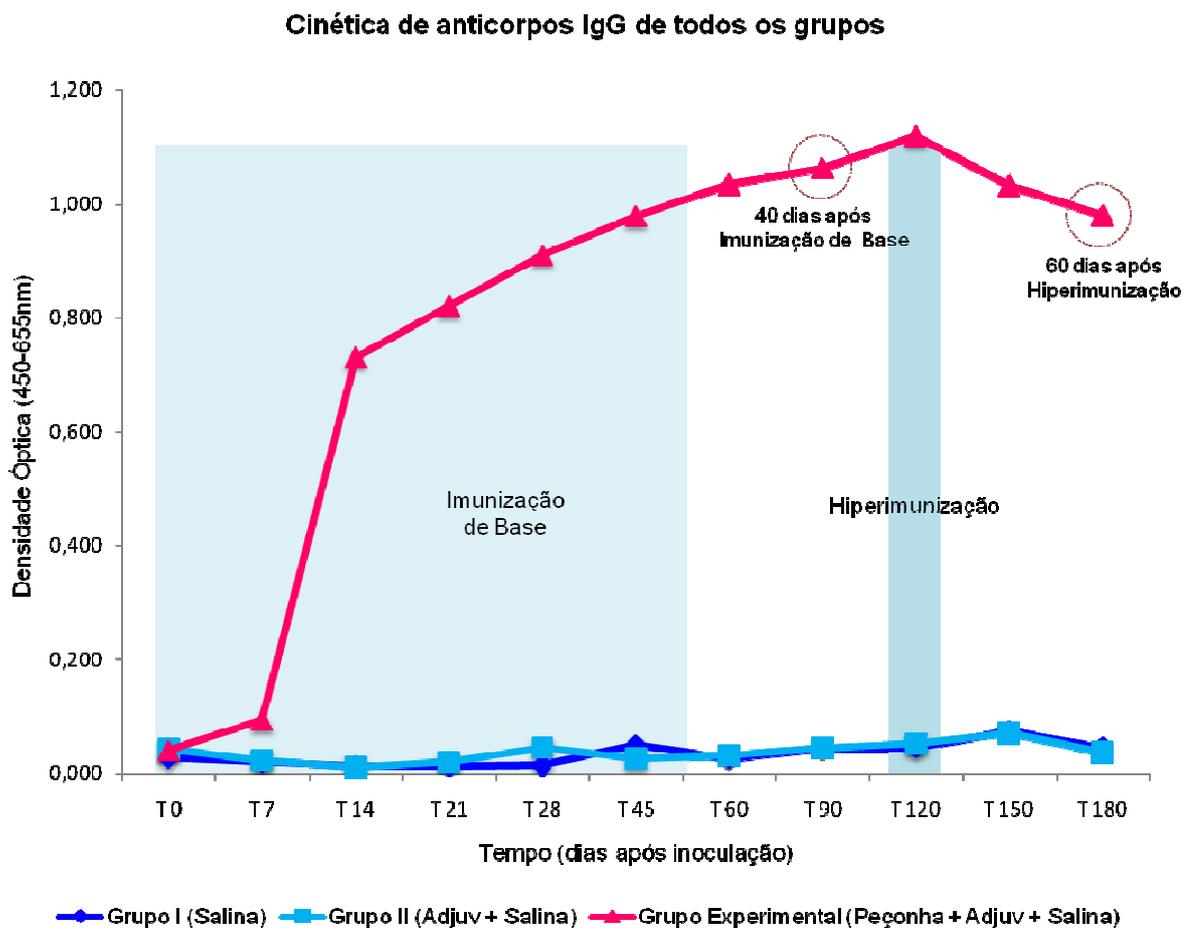
Ferreira (2013), também verificou a ocorrência de diferenças individuais na produção de anticorpos durante a produção de soro antiescorpiônico em ovinos hiperimunizados com a peçonha de *Tityus serrulatus*, onde alguns indivíduos

respondem de maneira mais satisfatória do que outros. Variações individuais na produção de anticorpos anti-*Bothrops asper* também foram constatadas na resposta imune humoral de cavalos soro produtores, os quais apresentaram similaridades entre eles nos dois primeiros terços do calendário de imunização (GUTIERREZ *et al.*, 1988), diferente do observado no presente trabalho no qual os achados demonstram respostas similares nos dois últimos terços.

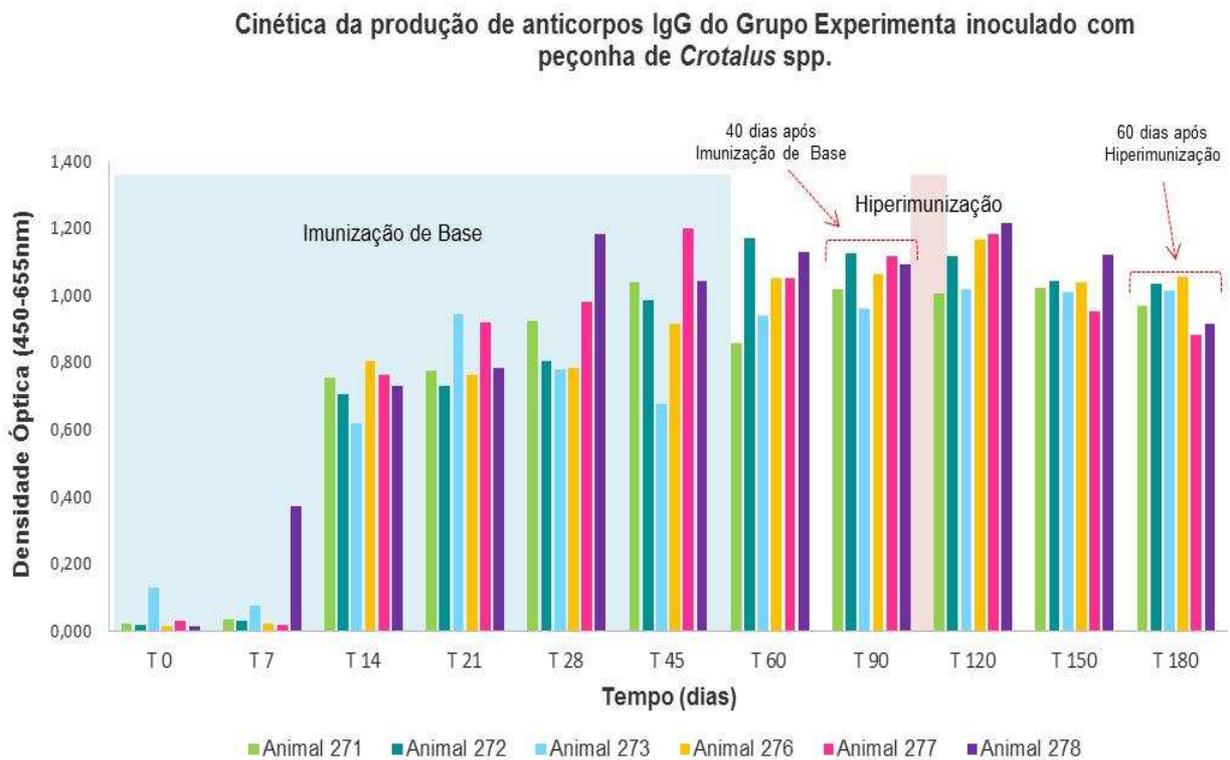
Ovinos imunizados com peçonha de *C. d. terrificus* com doses crescentes que variaram de 500 µg a 2 mg em um único grupo de animais, sem padronização da Imunização de Base e Hiperimunização, apresentaram D.O. média máxima inferior a 0,180 (FERREIRA JÚNIOR, 2005). Em contraposição, o presente trabalho demonstra que para obter uma boa produção de IgG é desnecessário a aplicação de elevadas doses de antígeno (peçonha). Isto se deve a alta toxicidade da peçonha crotálica que em quantidade inadequada resulta em uma estimulação ineficiente do sistema imunológico (DOS SANTOS *et al.*, 1988). O emprego de altas doses de antígeno para imunização atrasa a alteração na afinidade dos anticorpos secretados podendo cessar a produção de anticorpos até que os níveis de antígeno diminuam, pois mesmo as células de baixa afinidade que normalmente são estimuladas no período inicial após a imunização que é quando os níveis de antígeno são elevados, deixam de responder (STEINER & EISEN, 1966).

Desta forma, o protocolo empregado no presente trabalho foi extremamente importante para a obtenção de um soro hiperimune com elevados níveis de anticorpos IgG específicos à peçonha de *Crotalus* spp. Assim, verifica-se que o cronograma de imunização combinado aos adjuvantes utilizados, as baixas doses de antígeno empregadas, bem como a escolha do animal soro produtor, favoreceram a uma maior eficiência no processo de hiperimunização, uma vez que o efeito da estimulação antigênica repetida foi maximizado pela abundante síntese de anticorpos específicos de alta afinidade na resposta secundária.

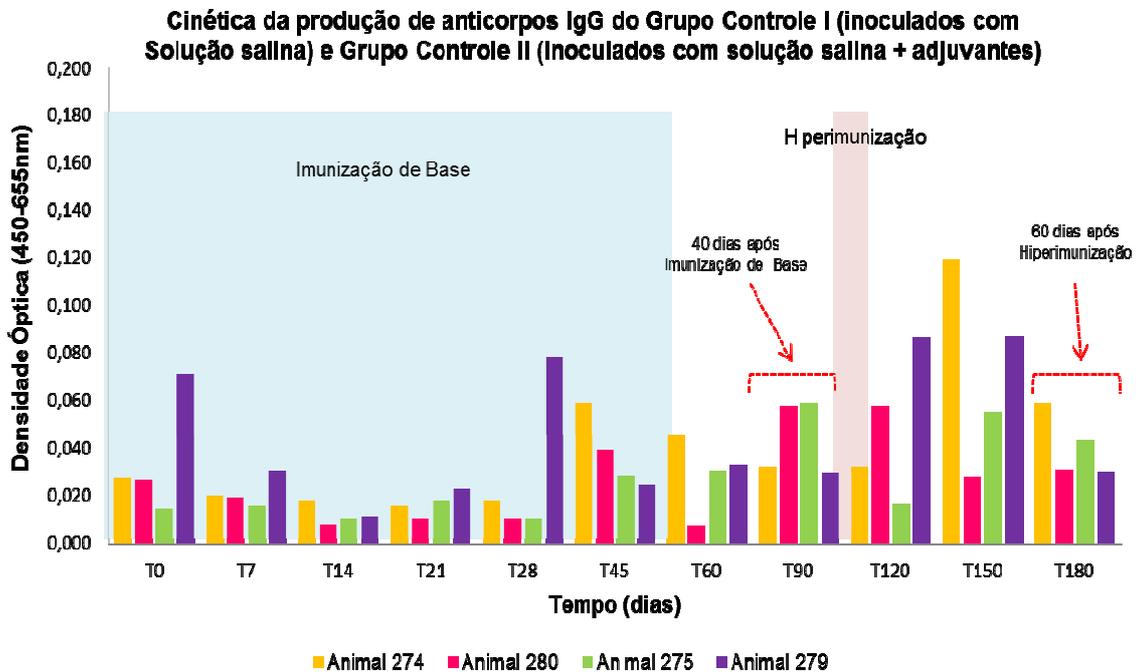
**Figura 04.** Cinética de produção de anticorpos da Classe IgG nos ovinos ao longo de 180 dias. Grupo Experimental (n = 6) inoculado com peçonha de *Crotalus* spp. e adjuvantes; Grupo Controle I (n = 2) inoculado com adjuvantes e solução salina e Grupo Controle II (n = 2) inoculado com solução salina. Ensaio padronizado utilizando 0,25 µg de proteína, soro (1:500) e anticorpo de coelho anti-IgG de ovino marcado com peroxidase (1:20.000), densidade óptica (D.O.) 450-655 nm.



**Figura 05.** Cinética de produção de anticorpos séricos da Classe IgG dos ovinos do Grupo Experimental. Os animais foram imunizados com 200 µg de proteína da peçonha de *Crotalus* spp. na Imunização de Base (T<sub>0</sub> a T<sub>60</sub>) e com 400 µg (105º dia) e 200 µg (112º, 114º e 116º dia) de proteína na Hiperimunização. Ensaio padronizado utilizando 0,25 µg de proteína, soro (1:500) e anticorpo anti-IgG de ovinos marcado com peroxidase (1:20.000), densidade óptica (D.O.) 450-655 nm.



**Figura 06.** Cinética de produção de anticorpos séricos da Classe IgG dos Controles. Controle I – animais 274 e 280 inoculados com 1 ml de solução salina 0,85%. Controle II – animais 275 e 279 inoculados com 500 µl de solução salina 0,85% emulsificada com 500 µl de ACF no T<sub>0</sub>, AIF no T<sub>7</sub> e na primeira inoculação do protocolo de Hiperimunização (105º dia), e com 1 ml de solução salina 0,85% nas demais datas conforme o Protocolo de Imunização para produção do soro anti-peçonha de *Crotalus* spp. Ensaio padronizado utilizando 0,25 µg de proteína, soro (1:500) e anticorpo anti-IgG de ovinos marcado com peroxidase (1:20.000), densidade óptica (D.O.) 450-655 nm.



## 5.5 VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO SORO MONOVALENTE ANTIPEÇONHA DE *CROTALUS* SPP. POR WESTERN BLOTTING

Desenvolver uma resposta de anticorpos efetivos para reconhecer e neutralizar as proteínas tóxicas da peçonha é fundamental na produção de soros antipeçonhentos (LÉON *et al.*, 2011). A análise por *Western blotting* demonstrou que os anticorpos presentes no soro monovalente antipeçonha de *Crotalus* spp. foi capaz de reconhecer e se ligar a todos os componentes da peçonha, com maior ou menor intensidade, a partir do 14º dia (Figura 07). Como esperado, após a hiperimunização (T<sub>120</sub>) houve uma abundante síntese de anticorpo na resposta secundária, porém ainda com elevados títulos de anticorpos, observada nos tempos T<sub>150</sub> e T<sub>180</sub>. Contudo, o soro hiperimune coletado um mês após a hiperimunização (T<sub>150</sub>) apresentou reatividade superior a todos os tempos de coleta (Figura 07). O Controle I e Controle II não reconheceram nenhum componente da peçonha (Figura 08 A e B).

Anticorpos sintetizados após a resposta primária ao antígeno já apresenta elevada afinidade de ligação ao antígeno, a qual aumenta gradualmente após as imunizações, aproximando-se de um platô muitas semanas após a imunização, de modo que não existe mais uma discrepância entre a afinidade dos anticorpos secretados e do soro (STEINER & EISEN, 1966). Neste sentido, os anticorpos secretados após a segunda inoculação, presentes nos soros coletados a partir do T<sub>14</sub>, já apresentavam elevada afinidade relativa de ligação ao antígeno. Além disso, a estimulação antigênica repetida empregada tanto na Imunização de Base foi maximizada pela Hiperimunização, induzindo a síntese de anticorpos de alta afinidade na ligação antígeno/anticorpo, como pode ser observado na Figura 07, com destaque para o tempo T<sub>150</sub>.

É mister destacar que a capacidade do anticorpo para reagir com os determinantes antigênicos é reflexo tanto de sua concentração quanto de sua afinidade de ligação, uma vez que alterações em pelo menos um destes dois fatores desempenha um papel importante na amplificação da atividade total do anticorpo no momento em que os níveis de anticorpos podem estar diminuindo (STEINER &

EISEN, 1966). Isto explica a superioridade de reação observada no soro do T<sub>150</sub>, quando a síntese de anticorpos apresentava tendência decrescente, em detrimento dos outros tempos amostrais. Além disso, a tendência para formar agregados estáveis de antígeno e anticorpo (STEINER & EISEN, 1966), demonstrou que possivelmente os anticorpos do T<sub>150</sub> são os que apresentaram maior avidéz.

Estudos afirmam que o soro fabricado pelo Instituto Butantan reconhece as proteínas das peçonhas das subespécies de *Crotalus* brasileiras, a saber: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavela* e *C. d. marajoensis*, além das frações purificadas de crotoxina e da PLA<sub>2</sub> (GUIDOLIN *et al.*, 2013). Entretanto, Biondi (2009), demonstrou que o soro do Instituto Butantan reconhece fracamente poucos componentes da peçonha de *Crotalus* spp. de diversas localidades do Estado da Bahia, apontando a capacidade deste soro em neutralizar parcialmente a peçonha crotálica desta região como a principal causa do elevado número de óbitos e de sequelas permanentes observados nos acidentes crotálicos no Estado. Assim, ao utilizar a peçonha de espécimes de *Crotalus* spp. do Estado da Bahia, com rastreabilidade conforme orientações da OMS, permitiu a produção de soro contendo altos níveis de anticorpos e elevada especificidade ao antígeno.

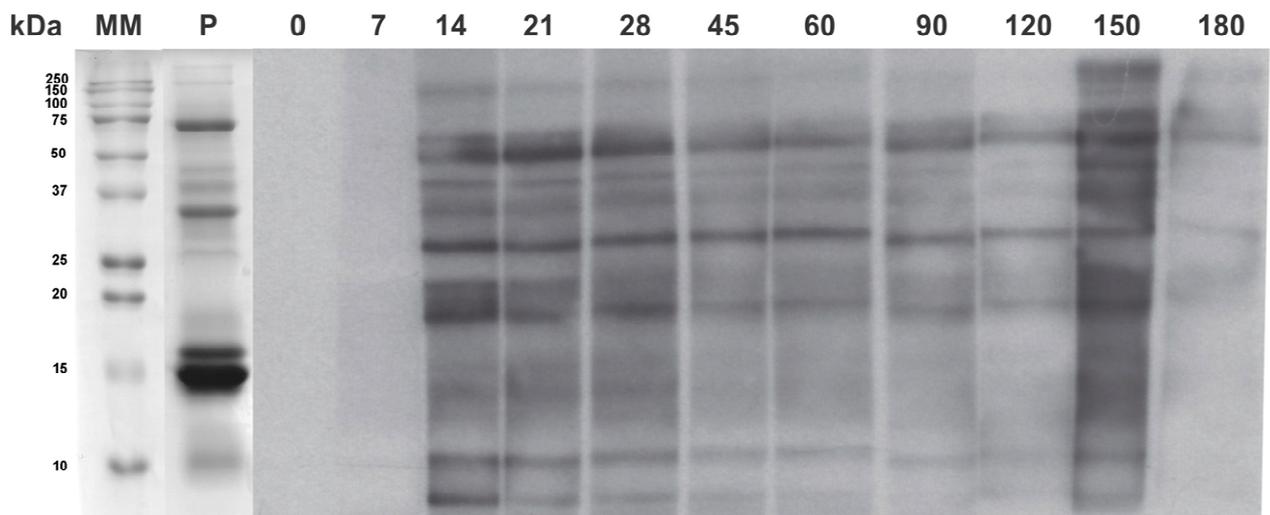
Boldrini-França *et al.*, (2010) apontaram a presença de proteínas com massas moleculares acima de 14 kDa e estruturas similares nas peçonhas de *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus* e *C. d. cascavella*, correspondendo a subunidade básica da crotoxina, a fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>), um importante componente tóxico da peçonha crotálica. Aparentemente houve um fraco imunorreconhecimento da PLA<sub>2</sub> pelos anticorpos contidos no soro anti-peçonha de *Crotalus* spp, possivelmente devido a forma de interação das moléculas de anticorpo aos determinantes antigênicos da toxina (STEINER & EISEN, 1966), uma vez que ao avaliar a capacidade neutralizante do soro, o mesmo neutralizou totalmente a atividade de letalidade da peçonha. A neutralização da PLA<sub>2</sub> resulta da ligação dos anticorpos à sua subunidade catalítica impedindo a ligação do cálcio, resultando numa perda da atividade da fosfolipase e conseqüentemente a inibição da catálise enzimática, porém não ocorre a formação de um imunoprecipitado através do bloqueio da ligação da PLA<sub>2</sub> a micelas ou membranas biológicas (FATIMA & FATAH, 2014; CHOUMET *et al.*, 1989).

Alguns componentes das peçonhas costumam ser imunodepletadas eficazmente pelos antissoros, tais como as metaloproteinases, as L-aminoácidos oxidases e as proteínas semelhantes à lectina tipo C. Contudo, as desintegrinas, PLA<sub>2</sub>s, serinoprotease, dentre outras, apresentam um grau variável de imunorreatividade (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014). A fraca imunorreatividade é oriunda da forma de apresentação da toxina ao sistema imunológico (LÉON *et al.*, 2011) e/ou da sua baixa imunogenicidade quando comparada a componentes maiores da peçonha, apresentando um padrão de imunorreconhecimento parcial (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com Gutiérrez *et al.* (2014), que demonstraram que o soro antiofídico polivalente manufaturado pelo Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica, apresenta uma fraca afinidade aos peptídeos vasoativos, crotamina, crotolina, inibidor do tipo Kazal e PI-SVMP da peçonha de *B. atrox* devido ou à ausência de algumas destas toxinas na mistura antigênica de imunização e a não imunogenicidade de alguns componentes devido a sua baixa massa molecular. Além disso, os autores destacam que a ocorrência de variação intraespecífica da peçonha entre metapopulações reflete na imunorreatividade de componentes de peçonhas que sofrem alterações ontogenéticas significativas. Este fato traz à luz a necessidade de desenvolvimento de uma nova soroterapia regionalizada para o Estado da Bahia, uma vez que, como demonstrado por Biondi (2009), os soros atualmente distribuídos pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia para neutralizar os agravos causados por *Crotalus* spp. apresentam baixa imunorreatividade contra os componentes desta peçonha.

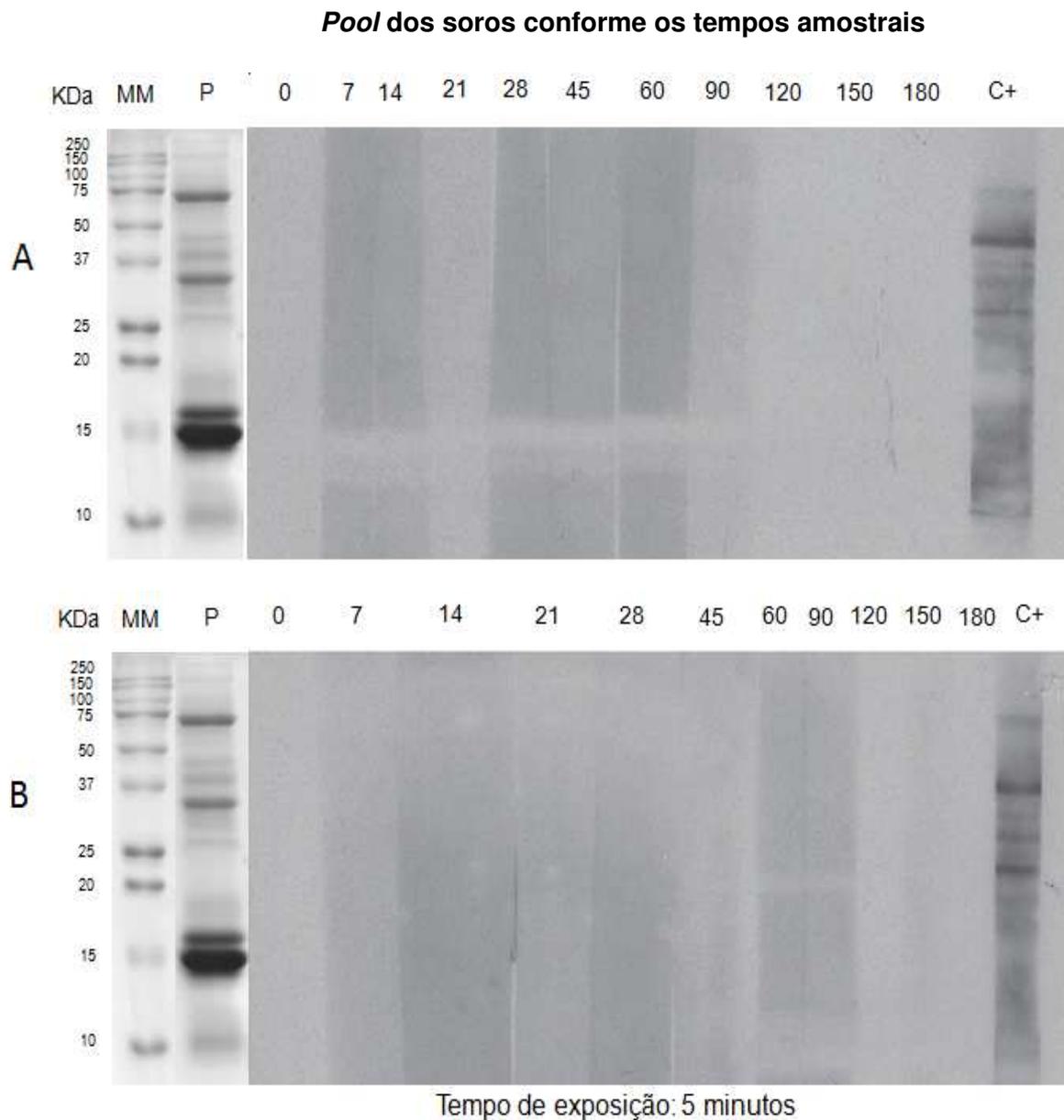
**Figura 07.** Reconhecimento das diferentes frações da peçonha de *Crotalus* spp. pelo soro monovalente anti-peçonha de *Crotalus* spp. Ensaio de *Western blotting* aplicando 30  $\mu$ g de proteína da peçonha em condições redutoras em cada coluna. *Pool* do soro nos tempos T<sub>0</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>14</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>28</sub>, T<sub>45</sub>, T<sub>60</sub>, T<sub>90</sub>, T<sub>120</sub>, T<sub>150</sub> e T<sub>180</sub> (1:2.500), e como anticorpo secundário IgG de coelho anti-IgG de ovino conjugado com peroxidase (1:5.000). Tempo de exposição: 3 minutos. (P) perfil proteico da peçonha de *Crotalus* spp. em gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie Blue. (MM) marcador de massa molecular: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa.

**Pool do soro anti-peçonha de *Crotalus* spp. conforme os tempos amostrais**



Tempo de exposição: 3 minutos

**Figura 08.** Avaliação da reatividade antigênica pelo ensaio de *Western blotting* do *pool* dos soros do Controle I (A) e do Controle II (B) nos tempos  $T_0$ ,  $T_7$ ,  $T_{14}$ ,  $T_{21}$ ,  $T_{28}$ ,  $T_{45}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{120}$ ,  $T_{150}$  e  $T_{180}$  na diluição de 1/2.500; utilizando como anticorpo secundário IgG de coelho anti-IgG de ovino conjugado com peroxidase (1/5.000); e 30 $\mu$ g de proteína de *Crotalus* spp. em cada coluna. Tempo de exposição: 5 minutos. (C+) *pool* de soro monovalente anti-peçonha de *Crotalus* spp. do  $T_{45}$  utilizado como controle. (P) perfil proteico da peçonha de *Crotalus* spp. em gel de eletroforese de poliácridamida com SDS 15% corado com Coomassie Blue. (MM) marcador de massa molecular: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa.



## 5.6 ANÁLISE DA CAPACIDADE DOS POOLS DE SORO ANTICROTÁLICO MONOVALENTE DOS TEMPOS $T_{90}$ E $T_{180}$ (50 $\mu$ L E 200 $\mu$ L) EM NEUTRALIZAR A ATIVIDADE DE LETALIDADE DA PEÇONHA DE *Crotalus* spp. (3 $DL_{50}$ )

Nos experimentos com *pools* de soro anticrotálico monovalente dos tempos de 90 dias ( $T_{90}$ ) e de 180 dias ( $T_{180}$ ), todos os procedimentos foram realizados no mesmo dia com vistas a utilização dos mesmos grupos controles, e conseqüentemente, o uso do menor número possível de camundongos, haja vista o sofrimento provocado pelos efeitos fisiopatológicos causados por estas toxinas (BIONDI, 2009). A dose de letalidade média ( $DL_{50}$ ) da peçonha de *Crotalus* spp., previamente determinada foi igual a 50  $\mu$ g/kg pela via intraperitoneal.

Não houve registro de óbitos nos Grupos Experimentais demonstrando que o soro monovalente anticrotálico, em ambas as doses utilizadas (50  $\mu$ L e 200  $\mu$ L), neutralizou em 100% a atividade de letalidade da peçonha (Tabela 01), bem como qualquer sintoma aparente de empeçonhamento. Semelhantemente a esses grupos, os animais do Controle Negativo, como esperado, mantiveram-se sadios durante todo o período experimental. Em contrapartida, os animais do Controle Positivo, inoculados com 3  $DL_{50}$  (3  $\mu$ g), exibiram os primeiros sinais de empeçonhamento cinco minutos após a inoculação. Inicialmente os animais permaneceram agregados em um único local na caixa e seus pelos arrepiados, em seguida desenvolveram sintomas de prostração, dificuldade respiratória devido ao comprometimento da função respiratória causado pela ação tóxica da peçonha crotálica, agitação, e por fim, tremores semelhantes a ataque epilético evoluindo instantaneamente para o óbito, conforme observado por Biondi (2009). Todos os óbitos ocorreram em um intervalo de quatro a nove horas após a inoculação da dose desafio, demonstrando uma letalidade acima de 65% do plantel (Tabela 01). Estes dados corroboram com Cruz *et al.* (2008), que demonstram através de estudos experimentais com a peçonha de *C. d. terrificus* que a maioria dos óbitos ocorrem nas primeiras seis horas após a inoculação.

**Tabela 01.** Determinação da capacidade neutralizante do soro anticrotálico hiperimune dos tempos  $T_{90}$  e  $T_{180}$  contra a peçonha de *Crotalus sp.* Camundongos Swiss (18-22 g) foram inoculados pela via intraperitoneal com 500  $\mu$ l de solução contendo doses variáveis de 50  $\mu$ l ou 200  $\mu$ l de soro - tempo  $T_{90}$  (Experimental I e II) e do tempo  $T_{180}$  (Experimental III e IV) - previamente incubado com 3  $DL_{50}$  da peçonha de *Crotalus spp.*, a 37°C durante 30 minutos.

Grupo	Soro ( $\mu$ l)	Morte		Sobrevivência	
		N.	%	N.	%
Controle Positivo	0	4	66,7	2	33,3
Experimental I ( $T_{90}$ )	50	0	0	6	100
Experimental II ( $T_{90}$ )	200	0	0	6	100
Experimental III ( $T_{180}$ )	50	0	0	6	100
Experimental IV ( $T_{180}$ )	200	0	0	6	100
Controle Negativo	0	0	0	6	100

A inibição da atividade de letalidade da peçonha crotálica está intimamente relacionada com a neutralização da PLA<sub>2</sub>, pois essa toxina desempenha um papel fundamental na indução da letalidade da peçonha (CHOUMET *et al.*, 1989; DOS SANTOS *et al.*, 1988). Esta subunidade da crotoxina foi eficientemente neutralizada tanto pelo soro anticrotálico quanto pelo soro antifosfolipase A<sub>2</sub> preparado com a peçonha bruta e com a PLA<sub>2</sub> purificada de *C. d. terrificus*, respectivamente (DOS SANTOS *et al.*, 1989; DA SILVA & BIER, 1982). Possivelmente a PLA<sub>2</sub> presente na peçonha de *Crotalus* spp. foi satisfatoriamente neutralizada pelo soro anti-peçonha de *Crotalus* spp., através da ligação dos anticorpos à subunidade catalítica desta toxina no teste *in vivo* (CHOUMET *et al.*, 1989).

Não foram observadas alterações no local de inoculação pela via intraperitoneal. Quando inoculada pela via intraplantar, a peçonha de *Crotalus* spp. causa edema local (BIONDI, 2009). Em cães os acidentes crotálicos apresentam discreto edema local nas primeiras horas, o qual desaparece após seis horas da inoculação da peçonha (DOS SANTOS *et al.*, 2013). Em humanos, os acidentes crotálicos não apresentam alterações aparentes no local da picada (AMARAL, MAGALHÃES, REZENDE, 1991; MS, 2001), este é um dos aspectos divergentes entre a patologia dos acidentes crotálicos no Brasil e na América do Norte (TOKARNIA *et al.*, 2014). Verifica-se então a ocorrência de semelhanças entre a peçonha de *Crotalus* spp. e a peçonha das cascavéis da América do Norte e da América Central.

A ausência de qualquer sintoma aparente de comprometimento respiratório nos camundongos dos Grupos Experimentais inoculados com diferentes doses de soro anticrotálico monovalente (50 µl e 200 µl), colhido após a imunização de base (*pool* de 90 dias) e após a hiperimunização (*pool* de 180 dias), pré-incubado com 3 DL<sub>50</sub>, permite afirmar que o soro anticrotálico monovalente neutralizou esta fração neurotóxica da peçonha. Por outro lado, o Controle Positivo apresentou intensa dificuldade respiratória resultante do comprometimento da função respiratória causado pela ação tóxica da peçonha crotálica, e reportada na literatura como uma complicação raramente observada nos acidentes por cascavéis (AMARAL, MAGALHÃES, REZENDE, 1991; BROOKS *et al.*, 2002). Entretanto, para a peçonha

de *Crotalus* spp., este é um dos primeiros sinais de gravidade do empeçonhamento em condições experimentais (BIONDI, 2009).

O comprometimento da função respiratória é uma patologia associada à neurotoxicidade promovida pela crotoxina (CALVETE *et al.*, 2010), fração da peçonha crotálica que causa paralisia dos músculos respiratórios (Vital Brazil *et al.*, 1973; AMARAL, MAGALHÃES, REZENDE, 1991; RODRIGUEZ-ACOSTA *et al.*, 1995) por sua ação pré-sináptica, atuando nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina, sendo responsável pelo bloqueio neuromuscular do qual decorrem as paralisias motoras e a insuficiência respiratória aguda apresentada pelos pacientes picados pela cascavel sul-americana (AMARAL, MAGALHÃES, REZENDE, 1991; AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERING, 2003), uma das principais causas de morte nos acidentes crotálicos (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006). Desta forma, o Controle Positivo foi acometido da complicação respiratória resultante da ação da crotoxina presente na peçonha de *Crotalus* spp.

Outras complicações como taquipnéia, movimentos respiratórios superficiais, uso da musculatura acessória da respiração, batimento das aletas nasais, dificuldade respiratória intensa, apneia e parada respiratória, podem levar à insuficiência respiratória aguda (IRA) e ao óbito (AMARAL, MAGALHÃES, REZENDE, 1991; RODRIGUEZ-ACOSTA *et al.*, 1998).

Pacientes vítimas de empeçonhamento por viperídeos apresentam elevadas concentrações plasmáticas de C3a, C4a, C5a e outros mediadores inflamatórios, evidenciando ativação do sistema complemento (STONE *et al.*, 2013; FRANK & FRIES, 1991). Proteases das peçonhas de serpentes da família Crotalidae também exercem influência sobre o sistema de complemento. Da peçonha de *Crotalus atrox*, foram isoladas proteases capazes de gerar anafilatoxinas C3a e C5a a partir de C3 e C5, respectivamente (MAN & MINTA, 1977), e também proteína C3-like que depleta a via alternativa. Estudos com a peçonha da serpente *Trimeresurus flavovirides*, demonstraram sua alta capacidade para ativar a via alternativa do complemento (YAMAMOTO *et al.*, 2002). Posteriormente ficou caracterizado que se tratava de uma serinoprotease, a “flavoxobin” que cliva a molécula de C3 em dois fragmentos, levando a ativação da cascata do complemento.

As proteínas do complemento opsonizam ou lisam as células, e a liberação de anafilotoxinas contribui para a inflamação (CARROLL & SIM, 2011). Há de se considerar que muitos dos efeitos precedentes de anafilotoxina C3a são consistentes com o empeçonhamento por Viperídeos; assim é razoável hipotetizar que alguns dos peptídeos encontrados na peçonha de *Crotalus* spp. imitam ou provoquem a ação de anafilotoxinas C3a (HIGUCHI *et al.*, 2006; BIONDI, 2009).

Além da ativação do sistema de complemento, peçonhas levam a ativação e degranulação de mastócitos e indução da liberação de mediadores inflamatórios (STONE *et al.*, 2013, como carboxipeptidase A e possivelmente outras proteases capazes de degradar os componentes da peçonha. Desta forma, a resposta imune inata contribui significativamente para minimizar a patologia desencadeada pelas toxinas presentes na peçonha (METZ *et al.*, 2006).

Diante disso, a degranulação de mastócitos exerce um efeito protetor contra a peçonha crotálica, aumentando a resistência inata do hospedeiro à sua toxicidade, através da ação de proteases presentes em seus grânulos citoplasmáticos capazes de reduzir a quantidade de toxinas na cavidade intraperitoneal, reduzindo acentuadamente a patologia local, a toxicidade sistêmica e sua letalidade (METZ *et al.*, 2006). Este fato pode explicar a sobrevivência de alguns animais do Grupo Controle Positivo, que não foram a óbito mesmo após apresentar claros sinais de grave empeçonhamento.

Neste sentido, a perspectiva de estudar o envolvimento do sistema complemento no empeçonhamento por *Crotalus* spp., pode ser uma das linhas possíveis para se chegar ao entendimento do processo inflamatório desencadeado e ao desenvolvimento de uma estratégia terapêutica mais efetiva. Além disso, as possíveis toxinas presentes na peçonha com ação sobre o sistema complemento, depois de isoladas e caracterizadas, poderão ser importantes ferramentas para o estudo do sistema de complemento e de processos patológicos no qual o mesmo esteja envolvido.

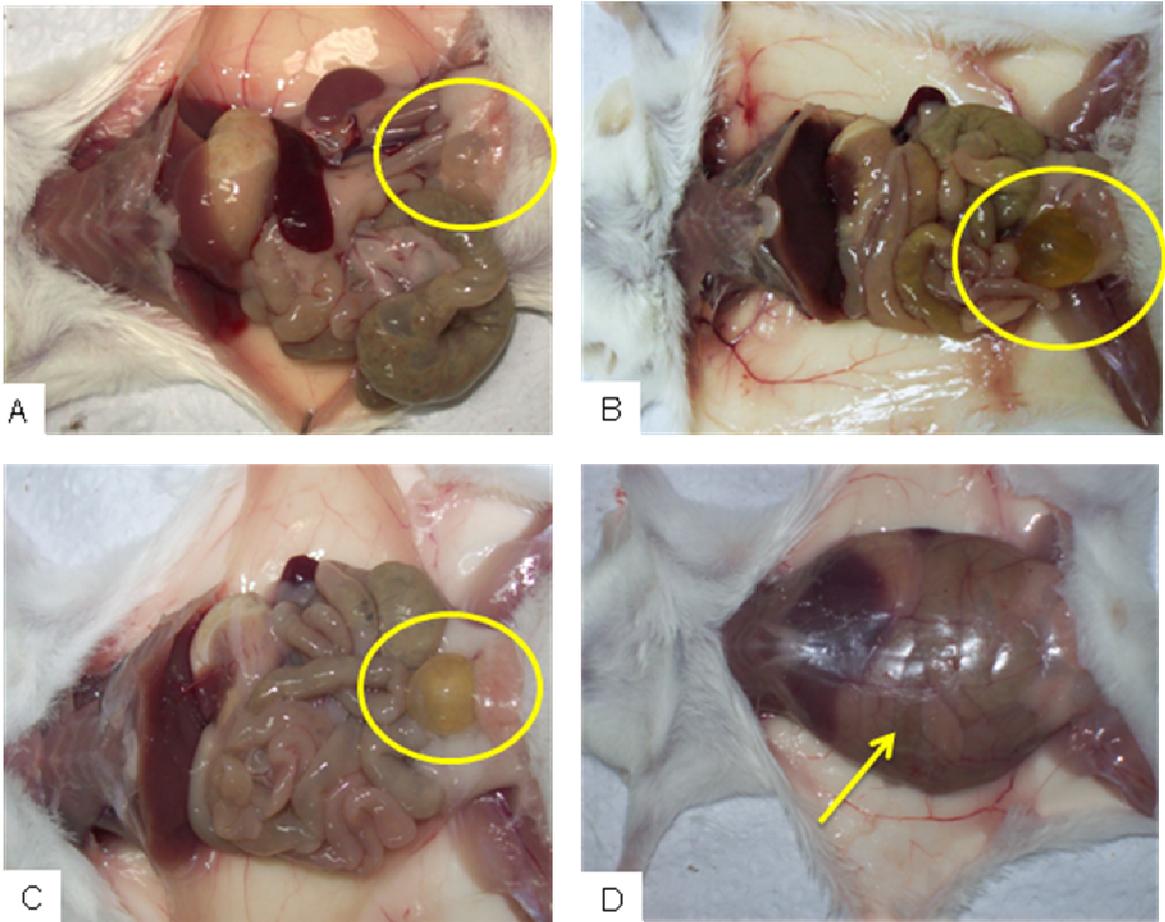
Outro dado que diverge a fisiopatologia preconizada na literatura para os acidentes crotálicos e a causada pela peçonha de *Crotalus* spp no Estado da Bahia, é a ausência de sinais de rabdomiólise no Controle Positivo, tanto os que foram a óbito quanto os que permaneceram em observação por 96 horas, e nos Grupos

Experimentais, pois a coloração da urina permaneceu inalterada (Figura 09), semelhante ao Grupo Controle Negativo. Resultados semelhantes também demonstrado por Biondi (2009). Não foi verificada a atividade miotóxica responsável pelo lesionamento das fibras musculares esqueléticas que levam à liberação de enzimas e mioglobina no sangue (rabdomiólise) e sua posterior excreção na urina, que passa a apresentar uma tonalidade avermelhada ou marrom (mioglobinúria) (AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERING, 2003).

A análise macroscópica dos animais dos Grupos Experimentais inoculados com o soro anticrotálico monovalente em ambas as doses empregadas, demonstrou que o soro não bloqueou o sequestro parcial do líquido peritoneal (Figura 09 D) e a retenção urinária causada pela peçonha (Figuras 09 B e C). Estes dados concordam com Biondi (2009), que observou efeitos semelhantes ao avaliar a capacidade neutralizante do soro monovalente anticrotálico fabricado pelo Instituto Butantan frente a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp., utilizando as mesmas doses aqui empregadas.

É importante ressaltar que no Brasil, a ocorrência de rabdomiólise é atribuída aos acidentes crotálicos como um dos primeiros sintomas apresentados (MAGALHAES *et al.*, 1986; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1990; GABOW *et al.*, 1982), porém raramente causa insuficiência renal (MH, 2014). Este fato sugere que deve haver outra via de falência renal provocada pelos acidentes crotálicos no Estado da Bahia. Nos acidentes ofídicos na Austrália, os danos renais geralmente são secundários à hemólise ou microangiopatia trombótica (MH, 2014).

**Figura 09.** Análise macroscópica da capacidade do soro ovino monovalente anticrotálico na dose de 50  $\mu$ l em neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp. Grupo Controle Negativo (A), bexiga com volume normal e urina com coloração inalterada; Grupo Experimental I - soro do tempo T<sub>90</sub> dias (B) e Grupo Experimental III - soro do tempo T<sub>180</sub> dias (C) - ausência de sinal de rabdomiólise e retenção urinária com manutenção da coloração da urina inalterada. Controle Positivo (D) intumescimento do peritônio pelo sequestro do líquido peritoneal.

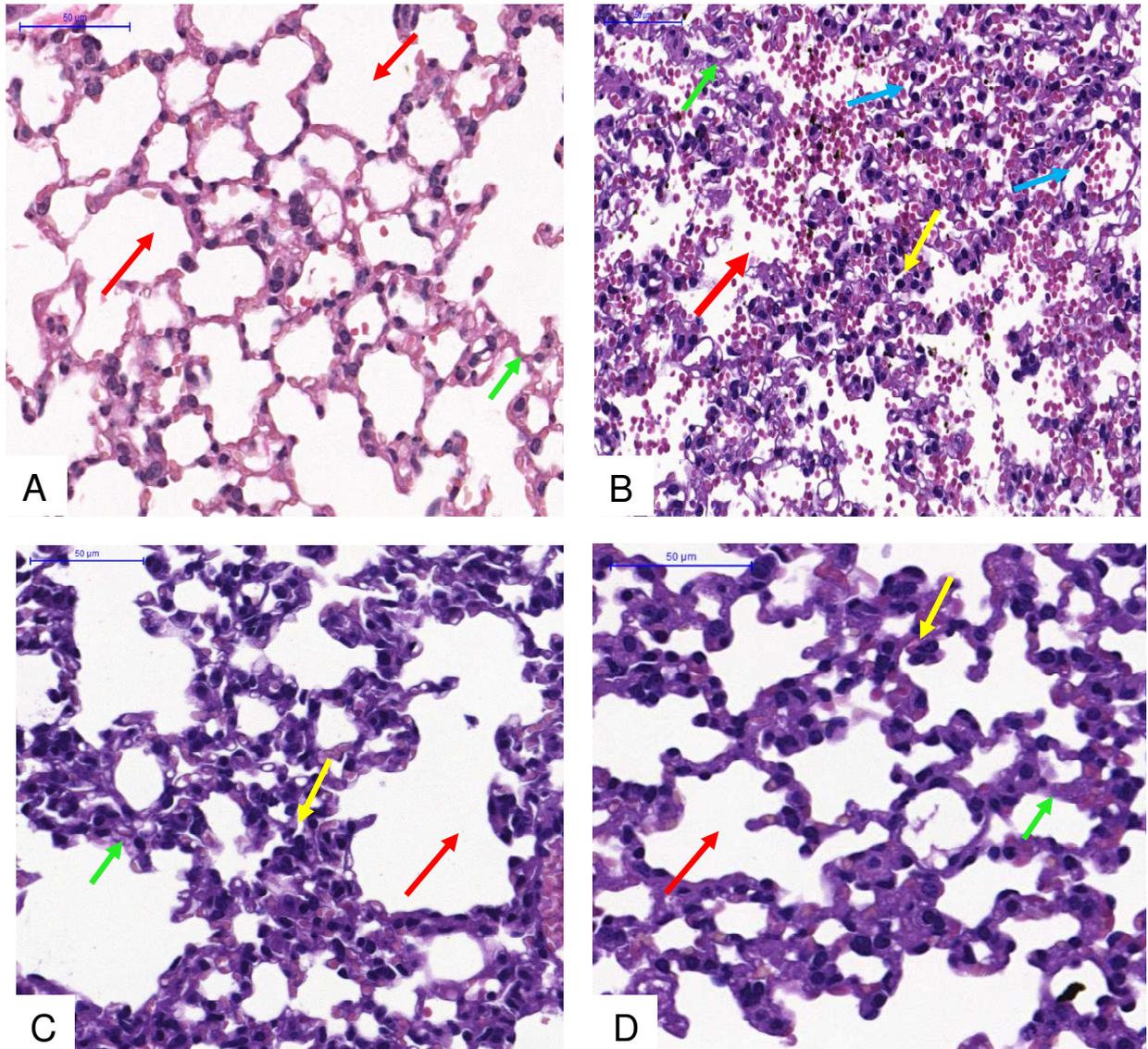


A análise histopatológica do parênquima pulmonar dos camundongos dos Grupos Experimentais demonstrou que ambas as doses do soro monovalente anticrotálico (50  $\mu$ l e 200  $\mu$ l) não bloquearam o infiltrado inflamatório e o espessamento dos septos alveolares (Figura 10). Estas alterações também foram verificadas no Controle Positivo, porém de forma mais agressiva e com pontos de hemorragia (BIONDI, 2009).

Dentre as alterações histológicas induzidas pela peçonha de *C. d. terrificus* no tecido pulmonar, está o aumento de células polimorfonucleares e de hemorragia difusa no parênquima pulmonar por ação da PLA<sub>2</sub>, além de edema perivascular, células mononucleares e polimorfonucleares nos compartimentos peribronquial e no parênquima alveolar, retornando às funções normais 24 horas após a inoculação (NONAKA *et al.*, 2008). A regressão à normalidade das funções pulmonares observada por estes autores pode explicar a sobrevivência dos animais do Grupo Controle Positivo, os quais apresentaram severa dificuldade respiratória nas primeiras horas após a inoculação da dose desafio.

O infiltrado inflamatório pulmonar induzido pela peçonha de peixes *Scorpaena plumieri*, foi eficientemente neutralizado pelo soro poliespecífico experimentalmente produzido com as peçonhas dos principais peixes peçonhentos do Brasil (*Thalassophryne nattereri*, *Scorpaena plumieri*, *Cathorops spixii* e *Potamotrygon gr. orbygni*), impedindo que injúrias teciduais fossem provocadas pelas células inflamatórias. Além disso, efeitos nas fibras musculares e na microcirculação como aumento do recrutamento leucocitário, formação de trombo e estase venular induzidos pela peçonha de *T. nattereri*, *C. Spixii* e *P. gr. orbygni* também foram neutralizados de forma dose dependente ou completamente pelo soro poliespecífico (BRUNI, 2008).

**Figura 10.** Análise histológica do parênquima pulmonar de camundongos no teste da capacidade do soro anticrotálico ovino monovalente na dose de 200  $\mu$ l de neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp. Grupo Controle Negativo (A), Grupo Controle Positivo (B), Grupo Experimental II - soro do tempo T<sub>90</sub> (C) e Grupo Experimental IV - soro do tempo T<sub>180</sub>. Imagens com aumento de 40x. Luz alveolar (seta vermelha), infiltrado inflamatório (seta amarela), hemorragia (seta azul), septos alveolares (seta verde).



Indivíduos picados por *B. jararaca* e *C. d. terrificus* apresentam leucocitose com neutrofilia, linfopenia, aneosinofilia, aumento de mucoproteínas e do tempo de coagulação e diminuição das proteínas totais, da taxa de sedimentação de eritrócitos e albumina e elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1b, IL-6 e IL-8, sugerindo que os acidentes ofídicos compartilham muitas características de traumas agudos (BARRAVIERA *et al.*, 1995). O aumento nos níveis séricos de IL-6 e principalmente de IL-8 em pacientes picados por cascavel ao longo de cinco dias, sugere que pode haver uma importante influência desta citocina na patologia pulmonar aqui verificada em camundongos inoculados com a peçonha de *Crotalus* spp.

Luna (2010) verificou que quanto maior a dose de peçonha menor a produção de IL-10 e maior liberação de NO, mostrando a ação imunossupressora da peçonha crotálica. A peçonha de *C. d. terrificus* induz a elevação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  em diferentes tempos, indicando que IFN- $\gamma$  desempenha uma notável função na resposta inicial contra a peçonha crotálica e o TNF- $\alpha$  exerce um importante papel na regulação da resposta inflamatória (CRUZ *et al.*, 2008).

Estudos indicam que a insuficiência respiratória aguda observada em pacientes picados por *C. d. terrificus* pode estar relacionada ao aumento na concentração de IL-8 nestes pacientes (BARRAVIERA *et al.*, 1995). Esta citocina atua como um fator quimiotático e ativador de neutrófilos em regiões inflamatórias, estimulando a formação de exsudato inflamatório rico em neutrófilos (MATSUSHIMA *et al.*, 1988; TERKELTAUB *et al.*, 1991; BICKEL, 1993).

A IL-8 é produzida por macrófagos alveolares, monócitos, células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais e hepatócitos (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989), e expressa em resposta a IL-1, TNF- $\alpha$ , C5a, dentre outros, contudo não é gerada em resposta a IL-6, IL-2 e IFN tipo I ou II (MATSUSHIMA *et al.*, 1988). Sua presença é associada ao recrutamento maciço e seletivo de neutrófilos no espaço alveolar causando um importante evento patogênico no pulmão, pois pode levar à lesão das células do parênquima pulmonar e à desagregação das estruturas intersticiais. (MATSUSHIMA *et al.*, 1988; BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989). Desta forma, o infiltrado inflamatório verificado nas análises histopatológicas dos camundongos inoculados com o soro anticrotálico monovalente pré-incubado com a peçonha de

*Crotalus* spp., pode ser resultante da ação pró-inflamatória da IL-8, a qual foi liberada em resposta ao estímulo inicial.

Citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que recrutam células do sistema imunológico estimulando sua proliferação e mobilização para produzir mais citocinas, criando uma cascata inflamatória, são os principais responsáveis por iniciar uma defesa potente contra patógenos exógenos (CRUZ *et al.*, 2008). A presença da IL-6 produzida por macrófagos ativados (NIJSTEN *et al.*, 1987) fundamenta a diminuição na quantidade de linfócitos (linfopenia) e o aumento do número de leucócitos (leucocitose) no sangue uma vez que esta citocina é capaz de estimular o aumento da secreção de hormônios glicocorticóides pelas glândulas adrenais e adrenocorticotrópicos pela pituitária (LUNA, DA SILVA, PEREIRA, 2011), cujo efeito antiinflamatório e imunossupressor exercem um importante papel regulatório no sistema imunológico, causando a redução da resposta celular, da migração de neutrófilos e macrófagos ao lugar da inflamação (PARIANTE & MILLER, 2001). Este fato pode explicar a ausência de efeitos locais reportados na literatura para os acidentes crotálicos.

Vítimas de acidentes ofídicos causados por *Daboia russeli* apresentaram aumento nas concentrações de triptases liberadas por mastócitos, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , sTNFR1 (*soluble TNF receptor 1*) e anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a), que contribuem para os sintomas de empeçonhamento. Após o tratamento com o soro polivalente estes pacientes tiveram rápido e significativo aumento das concentrações de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e sTNFR1 (*soluble TNF receptor 1*) mesmo quando não apresentaram reações de hipersensibilidade. Possivelmente, a ativação de mastócitos e a indução da produção de citocinas e anafilatoxinas pela peçonha também impele as células a reagirem ao soro. Assim, as reações anafiláticas ocorrem tanto em resposta aos efeitos secundários da peçonha, quanto pode estar relacionada a qualidade das preparações de soro anti-peçonhentos disponíveis (STONE *et al.*, 2013), exercida pela ação depurativa do sistema complemento com vista a manutenção da homeostasia do organismo (CARROL & SIM, 2011).

Apesar de observar hemorragias nas análises histológicas do pulmão no presente trabalho, hemorragias nos órgãos internos são raramente descritas para os acidentes crotálicos no Brasil, e quando presentes ocorrem com maior frequência no

sistema nervoso central (TOKARNIA & PEIXOTO, 2006). Entretanto, a peçonha das subespécies *C. simus*, *C. d. cumanensis* e *C. d. ruruima* (amarelo) apresentam atividade hemorrágica a qual não é neutralizada pelo soro anticrotálico produzido no Instituto Butantan (SARAIVA *et al.*, 2002), pois alguns componentes toxicologicamente relevantes estão presentes em baixas concentrações, dificultando o estímulo à uma resposta imune neutralizante adequada (LÉON *et al.*, 2011).

A análise histopatológica dos rins também apresentou células inflamatórias e discreto edema medular e em alguns néfrons (danos não mostrados) (Figura 11). Martins *et al.* (1998) demonstraram que a peçonha de *C. d. cascavella* em ratos provocou alterações renais como o aumento da pressão de perfusão e do fluxo urinário, redução da filtração glomerular, do percentual de transporte tubular de sódio e do percentual do transporte de sódio túbulo proximal renal, local mais afetado pelo efeito tóxico da peçonha crotálica.

Alterações como microaneurismas capilares, presença de proteína na luz tubular e infiltrado inflamatório foram observadas em rins de ratos expostos a peçonha de *B. jararacussu* (SMAAL, 2010). Em ovinos, a peçonha de *Bothrops moojeni* e *Bothropoides neuwiedi* provocou necrose de coagulação de células epiteliais de túbulos contorcidos proximais e distais da cortical renal, e cilindro hialino na luz de um túbulo urinífero (DIEFENBACH *et al.*, 2012).

As patologias renais observadas nos acidentes crotálicos e a partir de dados experimentais, possivelmente estão correlacionadas ao efeito tóxico da peçonha sobre os macrófagos (MARTINS *et al.*, 2003). A insuficiência renal aguda decorrente de agravos causados por *Crotalus* spp. provavelmente apresenta múltiplos fatores, seja pela ação direta da peçonha ou indiretamente pela liberação de mediadores pelas células endoteliais (MARTINS *et al.*, 1998) e por macrófagos (MARTINS *et al.*, 2003). Além disso, a permanência de componentes da peçonha no organismo de pacientes picados durante semanas, mesmo após a neutralização do acidente com a soroterapia, possibilita a ocorrência de efeitos prolongados ou recorrentes que reaparecem durante as primeiras 24 horas, fazendo necessária a dosagem periódica até as 36 horas seguintes ao acidente com vistas o controle completo dos sintomas persistentes (SEIFERT *et al.*, 1997).

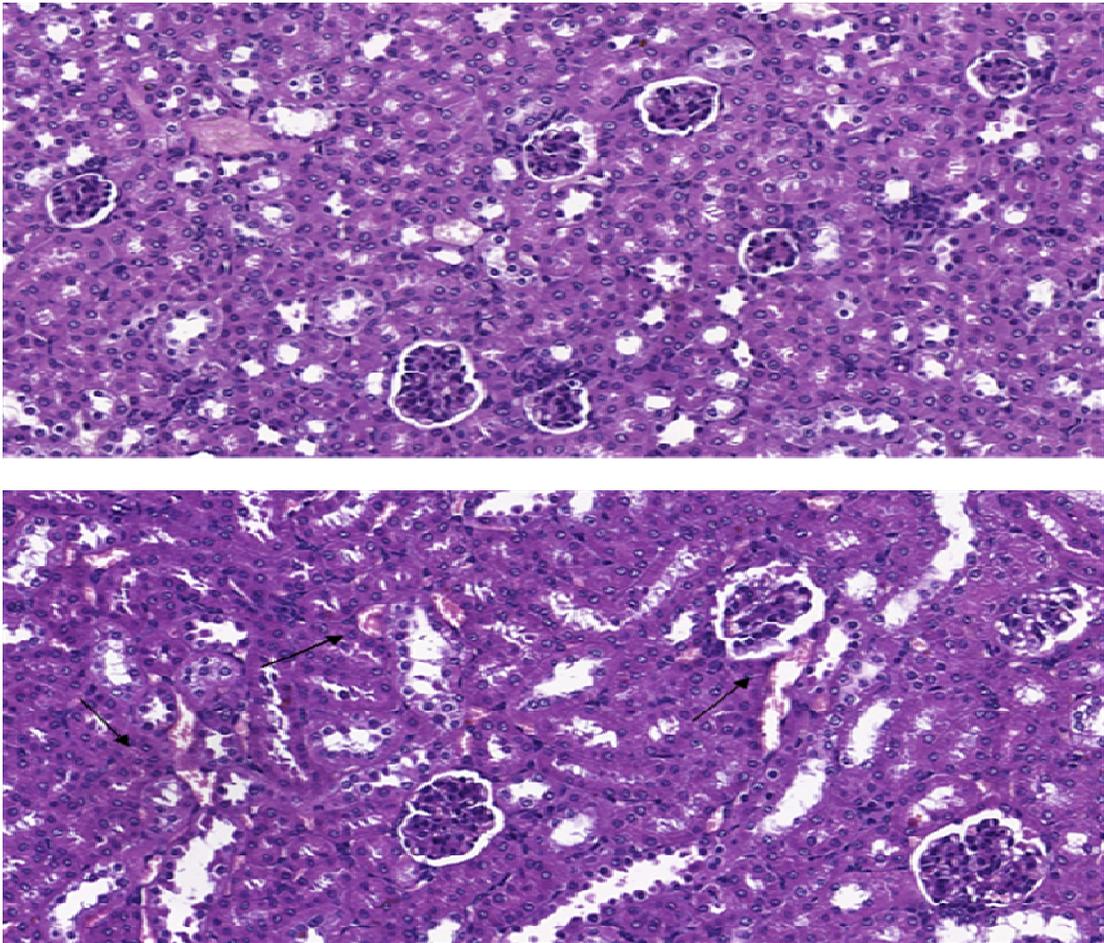
Estes fatos evidenciam a necessidade de reavaliação das soroterapias utilizadas para tratar estes agravos (WARRELL, 2010), tendo em vista que, mesmo em posse de um amplo conhecimento a respeito da variabilidade das peçonhas e dos efeitos fisiopatológicos divergentes observados pelos pacientes acidentados, os soros distribuídos pelo Ministério da Saúde não foram revisados, tão pouco regionalizados como determina a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981, WHO, 2010).

Efeitos adversos reportados a antissoros como as reações de hipersensibilidade, são atribuídos a presença de contaminantes: proteínas do soro, Fc e outros fragmentos ou agregados (MALASIT *et al.*, 1986; BLEEKER *et al.*, 2000), decorrendo em 30% das vezes pelo uso de IgG em detrimento de fragmentos F(ab) ou F(ab)<sub>2</sub> (THEAKSTON *et al.*, 2003). Reações anafiláticas podem ser desencadeadas pela ligação de alérgenos não específicos a IgE na superfície de mastócitos e basófilos, levando a ativação e degranulação destas células (CARROL & SIM, 2011).

Por fim, acredita-se que a ocorrência do infiltrado inflamatório nos pulmões e rins no Controle Positivo e nos Grupos Experimentais, possivelmente se deve a natureza do soro ovino, o qual foi utilizado em sua forma bruta contendo IgG intacta, bem como da provável presença de algum contaminante, apesar de submetido a remoção de elementos celulares. Quanto a especificidade das imunoglobulinas produzidas em resposta aos estímulos com a peçonha de *Crotalus* spp. em ovinos, os dados de neutralização *in vivo* e *in vitro* mostram que o soro ovino monovalente anticrotálico neutralizou os efeitos tóxicos da peçonha.

Os dados apresentados no presente trabalho permitem inferir que, o uso da peçonha de *Crotalus* spp. como antígeno na produção de soroterapia regionalizada resultará no desenvolvimento de um soro anticrotálico regionalizado para o Estado da Bahia, eficiente e seguro para tratar as vítimas de acidentes por cascavéis, reduzindo assim, o número de óbitos e sequelas permanentes causados por este agravo.

**Figura 11.** Análise histológica do parênquima renal de camundongos no teste da capacidade do soro ovino monovalente anticrotálico do tempo T<sub>180</sub> (dose de 200 µl) de neutralizar a atividade de letalidade da peçonha de *Crotalus* spp. Controle Negativo (A) apresentando células em estado normal; Grupo Experimental - soro do tempo T<sub>180</sub> (B), indicando a presença de congestão (seta preta).



# Conclusão



## 6 CONCLUSÃO

- Ao avaliar a resposta imune de ovinos contra a peçonha de *Crotalus* spp., foi possível verificar que o uso destes animais para produção de soro anticrotálico é uma alternativa viável, uma vez que mostraram uma eficiente resposta imune humoral contra a mistura antigênica empregada;
- A formação de abscesso nos locais de inoculação possivelmente foi consequência da ação imunomoduladora dos Adjuvante Completo de Freund e Adjuvante Incompleto de Freund. Apesar desta ação, os ovinos apresentaram boa tolerância a utilização destes adjuvantes;
- O protocolo de imunização empregado possibilitou a obtenção de soro monovalente anticrotálico com elevados títulos de anticorpos e alta especificidade para a peçonha de *Crotalus* spp.;
- O soro ovino monovalente anticrotálico neutralizou totalmente a atividade de letalidade e os efeitos tóxicos da peçonha de *Crotalus* spp., porém o sequestro de líquido peritoneal e a retenção urinária não foram bloqueados. Assim, são necessários estudos com vistas à melhoria do antígeno a ser empregado no processo de hiperimunização para a produção do soro anticrotálico monovalente regionalizado para o Estado da Bahia.

# Referências Bibliográficas



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, I.; GIRON, M.E.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Purification and characterization of a hemorrhagic fraction from the venom of the Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis*. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1548, p.57-65, 2001.
- ALBUQUERQUE, H. N., COSTA, T. B. G., CAVALCANTI, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no Estado da Paraíba. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2004.
- AMARAL, C. F. S. *et al.* A fibrinogenemia secundária a acidente crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, v. 30, p. 288-292, 1988.
- AMARAL, C. F. S. *et al.* Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos bothrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, v. 28, p. 220-227, 1986.
- AMARAL, C. F. S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. de; Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico *Crotalus durissus*). *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, v. 33, n. 4, p. 251-255, 1991.
- ANDERLINE, R. P. Emprego de sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante no processo de imunização de ovinos jovens com veneno de *Crotalus durissus terrificus* total e irradiado com Cobalto 60. Botucatu-SP. 2009. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2009.
- ANDRADE, D. F. Estudo do complexo *Crotalus durissus cascavella* no Estado da Bahia utilizando variabilidade na peçonha e morfometria craniana. 2009. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; AMARAL, C. F. S. Rattlesnake bites clinical features and complementary tests. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 52, p.26-30, 1990.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. *et al.* Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, v. 23, p.631-636, 1985.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. *Medicina, Ribeirão Preto. Simpósio: Urgências e emergências dermatológicas e toxicológicas, Capítulo IV*, v. 36, p. 480-489, abril/dezembro, 2003.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. C. L.; FRANÇA, S. F. O.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M.S.; HADDAD, Jr. VIDAL (Eds) Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos. SP: Sarvier. 91-98 p, 2003.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a Novel Cytokine That Activates Neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, v. 84, p. 1045-1049, outubro, 1989.

BARBOSA, J. D. *et al.* Quadro clínico-patológico do envenenamento crotálico experimental em bubalinos comparado com o de bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* V. 31, n. 11, p. 967-973, novembro, 2011.

BARRAVIERA, B *et al.* Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 01, n. 01, 1995. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-79301995000100003&lng=en&nrm=iso&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301995000100003&lng=en&nrm=iso&tIng=en)>

BARRAVIEIRA, B. Curso sobre acidentes por animais peçonhentos: acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina*, v. 64, p.14-20, 1990.

BARRAVIEIRA, B. *et al.* Retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snakes bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 22, p. 5-12, 1989.

BEGHINI, D. G. *et al.* Ability of rabbit antiserum against crotopotin to neutralize the neurotoxic, myotoxic and prosholipase A<sub>2</sub> activities of crotoxin from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 240-248, 2008.

BIEBER, A.L. *et al.* Studies of an acidic cardiotoxin isolated from the venom of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*). *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 21 n. 400, p. 178-88, 1975.

BICKEL, M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of Periodontol*, v. 64, Suppl 5, p. 456-60, may, 1993.

BIONDI, I. Caracterização Biológica e Bioquímica da Peçonha de *Crotalus durissus* no Estado da Bahia. Feira de Santana, BA. 2009. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

BIONDI, I. *et al.* A Variabilidade das Peçonhas: Um novo parâmetro para definir a biologia evolutiva. In: XI Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia (SBTx) - Toxinas Naturais: Conhecimento atual e novos desafios, 2010, Araxá -MG. XI Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2010. v. BE014. p. 189.

- BIONDI, I. *et al.* Spatial distribution of ontogenic variability in venoms of *Crotalus durissus* from of two ecosystems (Caatinga and Deciduous Forest) of the state of Bahia, Brazil. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia/ Symposium of The Pan American Section of the Internatinal Society On Toxinology, 2004. Angra dos Reis- Rio de Janeiro. Resumos/Abstracts, 2004.
- BIONDI, I. *et al.* Estudo epidemiológico dos acidentes por *Crotalus durissus cascavella*, Wagler, 1824 (Serpente; Viperidae) na Bahia. Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.27, suplemento I, p.247, 1994.
- BJARNASON, J. B. & FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacology and Therapeutics, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- BOFFA, M. C. & BOFFA, G. A. A phospholipase A2 with anticoagulant activity. II. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. Biochimica et Biophysica Acta, v. 429, p. 839-852, 1976.
- BOLAÑOS, R. & CERDAS, L. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, v. 88, p. 189-196, 1980.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. *et al.* Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. Journal of Proteomics, v. 73, p. 1758–1776, 2010.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. *et al.* *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. Biochimie, Paris, v.91, n. 5, p. 586-95, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, M. D. M. Avaliação dos efeitos renais e vasculares do veneno da *Bothrops insularis* e de frações isoladas. 2006. 239 f. Tese (Doutorado). Departamento Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. 2006.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. Biochimie, v. 82, p. 851–859, 2000.
- BRAUD, S. *et al.* The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. The Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 3, p. 1823-1828, 2000.
- BRAZIL, V. O. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. Memórias do Instituto Butantan, v. 49, n. 1, p. 7-20, 1987.
- BROOKS, D. E. *et al.* Respiratory compromise in patients with rattlesnake evenomation. The Journal of Emergency Medicine, v. 23, p. 329-332, 2002.

BRUNI, F. M. S. Avaliação da neutralização de importantes atividades tóxicas induzidas pelos principais peixes peçonhentos brasileiros por um soro poliespecífico produzido em murinos. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CABRAL, I. S. Avaliação da capacidade neutralizante do soro anticrotálico fabricado pelo Instituto Vital Brazil frente às peçonhas de *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) do Estado da Bahia. 2013. 44 f. Monografia (Graduação). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2013.

CALMETTE, A. L'Immunsation artificielle des animaux contre le venin des serpents, et la thérapeutique expérimentale des morsures venimeuses. Comptes Rendus de la Société de Biologie, v. 46, p. 120-124, fevereiro, 1894.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. Journal of Proteome Research, v. 9, p. 528-544, 2010.

CALVETE, J. J. *et al.* Venoms, venomomics, antivenomics. FEBS Letters, n. 583, p. 1736-1743, 2009.

CAPITĂNESCU, C. *et al.* Ovine antivenom for *Vipera ammodytes*. Proceedings of the Romanian Academy - Series B, v. 3, p. 155-161, 2008.

CARDOSO, D. F. & MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. Toxicon, v. 30, n. 4, p. 607-612, 1997.

CARDOSO, J. L. C. *et al.* Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo. Editora Savier, 550 p., 2009.

CARROLL, M. V. & SIM, R. B. Complement in health and disease. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 63, p. 965-975, 2011.

CHEN, T. & RAEL, E.D. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molossus* venom that attacks complement. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 29, p. 789-799, 1997.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bulletin of the World Health Organization, v. 76, n. 5, p. 515-524, 1998.

CHIPPAUX, J. P. *et al.* Methodology of clinical studies dealing with the treatment of envenomation. Toxicon, v. 55, p. 1195-1212, 2010.

CHIPPAUX, J. P. & GOYFFON, M. Production and use of snake antivenin. In: TU, A.; Handbook of Natural toxins: Reptile Venoms and Toxins. v. 5, cap. 17, p. 529-555, 1991.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V. WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CHOUMET, V. *et al.* Neutralization of lethal potency and inhibition of enzymatic activity of a phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin, by non-precipitating antibodies (Fab). *FEBS LETTERS*, v. 244, n. 1, p. 167-173, 1989.

CLARK, R. F. *et al.* Successful treatment of crotalid-induced neurotoxicity with a new polyspecific crotalid Fab antivenom. *Annals of Emergency Medicine*, v. 30, n. 1, p. 54-57, 1997.

CLISSA, P. B. Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de suas propriedades imunológicas. 1997. 71 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

CRIBBS, D. H. *et al.* Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with  $\beta$ -amyloid. *International Immunology*, v. 15, n. 4, p. 505-514, 2003.

CRUZ, A. H. *et al.* Pro-and Anti-Inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mediators of Inflammation*, v. 2008, p. 1-10, article ID 874962, 2008.

CUPO, P. *et al.* Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 924- 929, 1988.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acidente crotálico na infância: aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24, n.2, p.87-96, 1991.

DA SILVA, M. H. & BIER, O. G. Standardization of Antiaotalic Venom Serum. *Toxicon*, v. 20, n. 3, p. 563-569, 1982.

DALTRY, J. C. *et al.* Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*, v. 34, p.67-79, 1996.

DIEFENBACH, A. *et al.* Aspectos clinicopatológicos e laboratoriais do envenenamento experimental por *Bothrops moojeni* e *Bothropoides neuwiedi* em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 49-60, janeiro, 2012.

DOS SANTOS, C. M. *et al.* Caracterización de los venenos “amarillo” y “blanco” de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon*, v. 31, n.11, p.1459-1469, 1993.

DOS SANTOS, W. G. *et al.* Envenenamento crotálico em cães. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 13, n. supl., p. 5-6, 2013.

FAN, H. W. & FRANÇA, F. O. S. Soroterapia. In: SCHVARTSMAN, S. *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. São Paulo, Brasil, Editora Sarvier, p. 176-181, 1992.

FATIMA, L. D & FATAH, C. Pathophysiological and Pharmacological Effects of Snake Venom Components: Molecular Targets. *Journal of Clinical Toxicology*, v. 4, issue 2, p. 1-9, abril, 2014.

FERREIRA, L. M. *et al.* Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*, v. 30, n.12, p.1603-1608, 1992.

FERREIRA, M. G. Estudo da toxicidade do veneno bruto e detoxificado de *Tityus serrulatus* em ovinos produtores de antiveneno. 2013. 100 f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FERREIRA-JUNIOR, R. S. Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticrotálicos produzidos em ovinos jovens, avaliação clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* nativo ou irradiado com Cobalto-60. 2005. 123 f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

FERREIRA-JUNIOR, R. S. *et al.*, Immune response and neutralization capacity of antibodies produced in young sheep immunized with *Crotalus durissus terrificus* native or Cobalt-60 irradiated venom. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 46, n. 3, p. 207-214, 2009.

FERREIRA JUNIOR, R. S. *et al.* Laboratory evaluation of young ovines inoculated with natural or 60Co-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom during hyperimmunization process. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 12, n. 4, p. 620-631, 2006.

FONSECA, F. V. Isolamento e caracterização de um conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoácido oxidase do veneno de *Crotalus durissus cascavella*. 2006. 82 f. Tese de Mestrado (Mestre em Biologia Funcional e Molecular – Área de Bioquímica) - Universidade Estadual de Campina, Campinas, 2006.

FRANCISCHETTI, I. M *et al.* *Bothrops* sp. venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interface in platelet function. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 119, p. 21-29, 1998.

FRANCISCHETTI, I. M. B. *et al.* Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. *Toxicon*, v. 35, p.1217-1228, 1997.

FRANK, M. M. & FRIES, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, v. 12, n. 9, p. 322–326, 1991.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª edição. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2001, 120 p.

\_\_\_\_\_. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª edição. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1998.

\_\_\_\_\_. Relatório Anual do Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais peçonhentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1997.

\_\_\_\_\_. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Ministério da Saúde, Brasil. p. 53, 1991.

\_\_\_\_\_. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1990.

FURTADO, M. F. D.; SANTOS, M. C.; KAMIGUTI, A. S. Age-related biological activity of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 9, n. 2, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992003000200005>.

GABOW, P. A.; KAEHNY, W. D.; KELLEGER, S. P. The spectrum of rhabdomyolysis. *Medicine*. n. 61, p. 141-145, 1982.

GIBBS, H. L. *et al.* Genetic structure of populations of the threatened eastern Massassuga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology Resources*, vol. 6, p. 1123-1132, 1997.

GORDON, H. M. C. L. & WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Com. Sci. and Indst. Organizatio*, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

GRAÇA, F. A. S. *et al.* Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crotálico experimental em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 6, p. 261-270, junho, 2008.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. *Journal of Proteomics*, v. 105, p. 340-350, junho, 2014.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Production of monovalente anti-*Bothrops asper* antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability. *Revista de Biologia Tropical*, v. 36, n. 2B, p. 511-517, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M. & LEÓN, G. Snake antivenoms: Technological, clinical and public health issues. In: *Animal Toxins: state of the art. Perspectives in health and biotechnology* (DE LIMA, M. E. *et al.*,) Editora UFMG: Belo Horizonte, Brasil, p. 295-322, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. *PLoS Medicine*, v. 3, Issue 6, e150, p. 1-5, june, 2006.

HIGUCHI, S. *et al.* A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursors in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. v. 144, p. 107-121, 2006.

HOWARD, M. *et al.* Interleukin 10 Protects Mice from Lethal Endotoxemia. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 177, p. 1205-1208, abril, 1993.

JANES, D. N.; BUSH, S. P.; KOLLURU, G. R. Large Snake Size Suggests Increased Snakebite Severity in Patients Bitten by Rattlesnakes in Southern California. *Wilderness & Environmental Medicine*, v. 21, p. 120–126, 2010.

JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. Epidemiology and clinical picture of accidents with the tropical rattlesnake, (*Croatlus durissus terrificus*). *Revista Instituto Medicina Tropical*, v. 34, p. 347-354, 1992.

JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 36, p. 66-77, 1990.

JUNQUEIRA, M. E. P. Resposta Imune induzida pelas Peçonhas do Bagre *Cathorops agassizii*. 2006. 73 f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, 2006.

KASTURIRATNE, A. *et al.* The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Medicine*, v. 5, p. 1591-1604, Issue 11, november, 2008.

KINI, R. M. & EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon*, v. 28, n. 12, p. 1387-1422, 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGO, L. A. *et al.* Quadro clínico do envenenamento crotálico experimental em bovinos (*Crotalus durissus terrificus*, crotamina positivo). São Paulo. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 37, n. 4, p. 312-315, 2000.

LANDON, J. & SMITH, D. S. Merits of sheep antisera for antivenom manufacture. J. Toxicol Toxin Rev. v. 22, n. 1, p. 15-22, 2003.

LÉON, G. *et al.* Immune response towards snake venoms. Inflammation & Allergy – Drug Targets, v. 10, n. 5, p. 1-18, 2011.

LOMONTE, B. *et al.* Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. Toxirort, v. 21, n. 3, p. 379-384, 1983.

LOPES-FERREIRA, M. *et al.* Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon*, v. 38, p. 1149-1156, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington, University School of Medicine, Missouri, 1951.

LUNA, K. P. O. Avaliação da resposta imune relacionada à ação dos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella*. 233 f. 2010. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife – PE. 2010.

LUNA, K. P. O.; DA SILVA, M. B.; PEREIRA, V. R. A. Clinical and immunological aspects of envenomations by *Bothrops* snakes. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v. 17, n. 2, p. 130-141, 2011.

MAGALHÃES, R. A. *et al.* Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 228-233, 1986.

MÁLAGA, O. *et al.* Variaciones en la composición proteica, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (viperidae) en relación con la edad. Revista Peruana de Biología, v. 7, n. 2, p. 161-170, 2000.

MAN, D. P. & MINTA, J. O. Purification, characterization and analysis of mechanism of action of four anti-complementary factors of *Crotalus atrox* venom. Immunochemistry, Oxford, v. 14, p. 521-527, 1977.

MARTINS, A. M. C. *et al.* Renal Effects of Supernatant from Macrophages Activated by *Crotalus durissus cascavella* Venom: The Role of Phospholipase A2 and Cyclooxygenase. Pharmacology & Toxicology, v. 92, p. 14–20, 2003.

MARTINS, A. C. M. *et al.* Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity insolated rat kidneys. *Toxicon*, v. 40, p.1165-1171, 2002.

MARTINS, A. C. M. *et al.* Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isoleted rat kidney. *Toxicon*, v. 36, n.10, p.1441-1450, 1998.

MATSUSHIMA, K. *et al.* Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF rnRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 167, p. 1883-1893, June, 1988.

METZ, M. *et al.* Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, v. 313, p. 526-530, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Acidentes por animais peçonhentos – Notificações registradas no sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 07 de junho. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Departamento de Ciências e Tecnologia, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. Brasília, Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública*, v. 44, nº 1, p. 200-202, 2010.

MINISTRY OF HEALTH (MH). Snakebite and Spiderbite Clinical Management Guidelines 2013. Ministry of Health. Sydney, New South Wales, Australia, 3ª Edição, 42p. 2014.

MONTEIRO, A.S.H. *et al.* Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 1347-1352, 2001.

MOURA-GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 22, p.141, 1950.

NANCY, G. M. D. *et al.* Acute anuric renal failure after pygmy rattlesnake bite. *South. Med. Journal*, v. 84, p. 783-785, 1991.

NETTO, D. P. *et al.* Humoral response and neutralization capacity of sheep serum inoculated with natural and Cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom (Laurenti, 1768). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 8, n. 2, p. 297-314, 2002.

NIJSTEN *et al.* Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *The Lancet*, v. 17, p. 921, october, 1987.

- NISHIJIMA, C. M. *et al.* Anti-hemorrhagic activity of four brazilian vegetable species against *Bothrops jararacavenom*. *Molecules*, v. 14, p. 1072-1080, 2009.
- NONAKA, P. N. *et al.* Pulmonary mechanic and lung history injury induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Toxicon*, v. 51, p. 1158-1166, 2008.
- OLIVEIRA, N. K. S. Caracterização das ações das peçonhentas de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* capturadas no Estado do Amapá e habilidade de soro antibotrópico e anticrotálico brasileiros na neutralização destas atividades, 142f. 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2014.
- OUYANG, C. & TENG, C. M. The action mechanism of the purified platelet aggregation principle of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 41, n. 3, p. 475-490, maio, 1979.
- OWNBY, C. L. *et al.* Quantitation of mionecrosis induced by myotoxin from praire rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*, v. 20, p. 877-885, 1990.
- PARIANTE, C. M. & MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, v. 49, n. 5, p. 391-404, 2001.
- PEREIRA, K. B. *et al.* Composition of breast milk of lactating adolescents in function of time of lactation. *Nutrición Hospitalaria*, v. 28, n. 6, p. 1971-1976, 2013.
- PERES, C. M. *et al.* Detection and neutralization of venom by ovine antiserum in experimental envenoming by *Bothrops jararaca*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 12, n. 1, p. 124-136, 2006.
- RESENDE, F. C. B. *et al.* Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v. 27, n. 3, p. 116-124, 2004.
- RIBEIRO, L. A. *et al.* Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 44, p. 312-318, 1998.
- RIVIÉRE, G. *et al.* Effect of antivenom on venom pharmacokinetics in experimentally envenomed rabbits: toward an optimization of antivenom therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 281, p. 1-8, 1997.
- RODRIGUES, T. D. S. *et al.* Ofidismo na Bahia: Um Problema de Saúde Pública. *Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia*, Salvador, v. 1, n.1, p. 23-25, 1987.
- RODRIGUEZ-ACOSTA, A. *et al.* ¿Que Hacer Frente a un Accidente Ofidico? Caracas, Venezuela. *Venediciones*, 1995.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A. *et al.* Haemorrhagic Activity of Neotropical Rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941) Venom. *Natural Toxins*, v. 6, p. 15-18, 1998.

ROSENFELD, G. Sintomatology, pathology, and treatment of the snakes in South American. In: (BURCHEL, W., BUCKLEY, E.) *Venomous Animals and their Venoms, Venomous Vertebrates*, vol II. Academic Press, New York, p. 345-384, 1971.

SANO-MARTINS, *et al.* Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of human by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *J. Q. Med.*, v. 94, p. 551-559, 2001.

SANTORO, L. M. *et al.* Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 122, p. 61-73, 1999.

SANTOS, M. C. *et al.* Influence of *Crotalus* venom on the response to sheep red bloods cells (Abstract). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 19, p. 636, 1986.

SARAVIA, P. *et al.* Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Revista de Biologia Tropical*, v. 50, n. 1, p. 337-346, 2002.

SCHENBERG, S. Geographic pattern of crotoamine distribuion in the same rattlesnake subspecies. *Science*, v. 129, p.1361-1363, 1959.

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotoamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science*, v. 129, p. 1361-1363, 1950.

SEIFERT, S. A. *et al.* Relationship of venom effects to venom antigen and antivenom serum concentrations in a patient with *Crotalus atrox* envenomation treated with a Fab antivenom. *Annals of Emergency Medicine*, v. 30, n. 1, p. 49-53, julho, 1997.

SEWALL, H. Experiments in the preventive inoculation of rattlesnake venom. *Journal of Physiology (London)*, v. 8, p. 203-210, 1887.

SILVA, G. J. Estudo dos efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre o metabolismo e estresse oxidativo em fígado de ratos. 52 f. 2009. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

SIQUEIRA, A. Supurações. *Revista de Medicina*, p 33-46, 30 agosto, 1940.

SIQUEIRA FILHA, N. T. *et al.* Perfil dos acidentes por serpentes peçonhentas atendidos em hospital de referência de Pernambuco, 2003-2005. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 18, suplemento, outubro, 2005.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Acidentes por animais peçonhentos: serpentes. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisba.def>>. Acesso: 28/12/2014.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Acidentes por animais peçonhentos: serpentes. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1539](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539). Acesso: 19/12/2011.

SJOSTROM, L. *et al.* A comparason of ovine andequine antivenoms. *Toxicon*, v. 32, p. 427-433, 1994.

SMAAL, A. Ação cardiovascular da peçonha de *Bothrops jararacussu* e bothropstoxina em rato anestesiado. 2010. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 2010.

SOSA-ROSALES, J. I. *et al.* Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon*, v. 45, p. 155–161, 2005.

STOCKER, K. F. Medical use of snake venom proteins. Boca Raton, Florida. CRC Press, 272p. 1990.

STONE, S. F. *et al.* Immune response to snake envenoming and treatment with antivenom; complement activation, cytokine production and mast cell degranulation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 7, p. 1-9, July, 2013.

TAVARES, N. A. C. *et al.* Expression of mRNAs coding for VAP1/crotastatin-like metalloproteases in the venom gland of three South American pit vipers assessed by quantitative real-time PCR. *Toxicon*, v. 52, p. 897-907, 2008.

TERKELTAUB, R. *et al.* Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis and Rheumatism*, v. 34, n. 7, 894-903, july, 1991.

THEAKSTON, R. D. G.; JANE LLOYD-JONES, M.; REID, H. A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *The Lancet*, v. 310, p. 639-641, 1977.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon*, v. 41, p. 541–557, 2003.

TOKARNIA, C. H. *et al.* Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops* spp. em animais de produção. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 4, p. 301-312, abril, 2014.

TOKARNIA, C. H. *et al.* Acidente ofídico em ovinos causado por *Bothrops jararaca*. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 28, n. 12, p. 643-648, dezembro, 2008.

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

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VIDAL, E. C.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snake venom-induced nephrotoxicity – in vivo and in vitro studies. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, v. 8, p. 131A, 1997.

VITAL BRAZIL, O.; EUGÊNIO, A. G. B.; LASZLO, G. M. Origem da paralisia respiratória causada pela crotoxina. Ciência e Cultura, v. 25, p. 1165-1169, 1973.

WAGHMARE, A. *et al.* Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticles), ISA 206 and ISA 35 (Emulsion based) alongwith incomplete Freund's adjuvante polyvalent snake antivenom. Vaccine, v. 27, p. 1067-1072, 2009.

WARRELL, D. A. Snake bite. The Lancet, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2 January, 2010.

WHITLOCK, H. V. Some modifications of the McMaster eggs counting technique and apparatus. J. Counc. Sci. Ind. Res., v.21, p.177-180, 1948.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology, v. 6, p. 553-557, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Progress in the Characterisation of venom and standardisation of antivenoms. World Health Organization, Geneva. Offset Publication, v. 58, 1981.

WUCHERER, O. E. H. Sobre o modo de conhecer as cobras venenosas do Brasil. Gasetta Médica da Bahia, v. 1, n. 17, p. 193-196, março, 1867.

WÜSTER, W. *et al.* Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). Molecular Ecology, v. 14, p. 1095-1108, 2005.

YAMAMOTO, C. *et al.* Flaxoxobin, a serine protease from *Trymeresurus flavoviridis* (hadu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts

as a novel, heterologous C3 convertase. *Immunology, Oxford*. v. 107, n. 1, p. 111-117, 2002.

YAN, Y. *et al.* Physiological and biochemical characterization of egg extract of black widow spiders to uncover molecular basis of egg toxicity. *Biological Research*, v. 47, n. 17, p. 1-11, 2014.