

Universidade do Estado do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais

**Eficácia dos Soros Antiofídicos de uso Veterinário na
Neutralização das Atividades Biológicas dos Venenos de
Bothrops atrox (Linnaeus, 1758) e *Crotalus durissus
ruruima* (Hoge, 1965)**

MARIA DAS DORES NOGUEIRA NORONHA

MANAUS

2008

Universidade do Estado do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais

MARIA DAS DORES NOGUEIRA NORONHA

**Eficácia dos Soros Antiofídicos de uso Veterinário na
Neutralização das Atividades Biológicas dos Venenos de
Bothrops atrox (Linnaeus, 1758) e *Crotalus durissus
ruruima* (Hoge, 1965)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Ciências Biológicas.

Orientador: Profº. Drº. Jorge Luis López-Lozano

MANAUS


2008


PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, reuniram-se para realizar a argüição da dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **MARIA DAS DORES NOGUEIRA NORONHA**, sob o título “**Eficácia dos Soros Antiofídicos de Uso Veterinário na Neutralização das Atividades Biológicas dos venenos de *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) e *Crotalus durissus ruruima* (Hoge, 1965)**”, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Após análise do referido trabalho e argüição da candidata, os membros são de parecer pela **APROVAÇÃO** da dissertação.

Manaus, 30 de dezembro de 2008.


Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
(Universidade Federal do Amazonas – UFAM)


Dr^a. Helena Camarão Telles Ribeiro
(Universidade do Estado do Amazonas – UEA)


Dr. Jorge Luis López Lozano
Presidente da Banca e Orientador
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Ao meu filho Luiz Carlos de Noronha Neto
pelo seu carinho, grande amor e apoio
em todos os momentos. A você, meu
amigo e companheiro, dedico esta
Dissertação.
Filho te amo muito!

A Paulo Friedrich Bührnheim
Mestre e amigo *in memoriam*.

Aos meus pais
Luiz Carlos de Noronha e
Amazonina Nogueira Noronha

Aos meus irmãos
José, Josué, Maria D. Noronha e
Deise Hione

AGRADECIMENTOS

Prof°. Dr°. Jorge Luis López Lozano, por ter me incentivado e por ter dado todas as condições para o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e principalmente pelo aprendizado. Muito obrigada professor e amigo por essa oportunidade, pra mim, valeu muito!

À Fabiana da Rocha Oliveira, André Miasato Higa, Bruno Melo Medeiros, amigos que ganhei no Laboratório de Toxinologia Molecular. Obrigada pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos Amigos Emiro G. Muniz, Marilene Sacramento, Itamar Marques de Souza e Benedito Rocha dos Santos, que com a sua dedicação contribuem na consolidação como centro de pesquisa do Centro de Ofidismo Prof. Paulo Friedrich Bührnheim.

Aos colegas do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo Prof. Paulo Friedrich Bührnheim: André Luis, Emiro Muniz, Rebecca Tavares, Teddi Claro, Thiago Ferreira, João Paulo Catunda, pelo apoio

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Universidade do Estado do Amazonas, pela oportunidade.

Ao Centro de Ofidismo Prof. Paulo Friedrich Bührnheim, por ceder o Laboratório de Toxinologia Molecular para realização deste trabalho.

À FAPEAM, CNPq e FINEP, pelo auxílio financeiro.

É preciso ousar para dizer cientificamente que estudamos, aprendemos, ensinamos, conhecemos nosso corpo inteiro.

Com sentimento, com as emoções, com os medos, com a paixão e também com a razão crítica.

Jamais com esta apenas

É preciso ousar para jamais dicotomizar o cognitivo do emocional.

Paulo Freire

RESUMO

Acidentes ofídicos em humanos causados por espécimes de *Bothrops atrox* (na Região Amazônica) e *Crotalus durissus ruruima* (Estado de Roraima) são freqüentes e o tratamento mais eficaz é o uso de antivenenos antiofídicos específicos, antibotrópico e anticrotálico. Hoje em dia, existem disponíveis no mercado antivenenos antibotrópico-anticrotálico para uso veterinário, líquido ou liofilizado, para o tratamento de acidentes ofídicos em animais. Característica comum nos venenos de serpentes são as variações moleculares e nas atividades biológicas, inclusive nos venenos de espécimes de uma mesma espécie. Assim, é sugerida que para uso na prática clínica, a eficácia dos antivenenos seja avaliada experimentalmente contra os venenos de espécies de uma determinada região. Neste trabalho estamos apresentando, os dados experimentais da eficácia neutralizante dos antivenenos antiofídicos de uso em veterinária sobre as atividades biológicas dos venenos das serpentes *B. atrox* e *C. d. ruruima*. Também foi avaliada a eficácia neutralizante dos antivenenos antibotrópico e anticrotálico de uso humano com data de validade vencida. Análises por eletroforese bidimensional do veneno de *B. atrox*, indica que os principais constituintes são metaloproteinasas hemorrágicas com 23 e 50 kDa. No veneno de *C. d. ruruima*, comparando os perfis moleculares dos venenos “branco” e “amarelo”, sugere que exista uma expressão diferencial dos genes que produzem toxinas de 50 kDa e toxinas básicas de 14 kDa nas glândulas dos espécimes doadores dos venenos. A eficácia neutralizante do antiveneno líquido para uso veterinário, sobre as atividades hemorrágicas, fosfolipásica A_2 , coagulante e desfibrinogentante dos venenos de *B. atrox* ou *C. d. ruruima* foi melhor quando comparado com o antiveneno liofilizado. O antiveneno crotálico não neutralizou a atividade hemorrágica do veneno de *C. d. ruruima*. Quando comparados, os antivenenos antibotrópico ou anticrotálico apresentam uma maior eficácia neutralizante das atividades biológicas dos venenos estudados. Embora, usando western blotting foi detectado a interação antígeno antiveneno – anticorpo entre as toxinas dos venenos e os anticorpos dos antivenenos estudados, a potência do antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário foi mais eficaz que o antiveneno liofilizado na neutralização da letalidade do veneno de *B. atrox* que o antiveneno liofilizado, já a potência de ambos os venenos contra a atividade letal do veneno de *C. d. ruruima* foi muito baixa. Os antivenenos de uso humano apresentaram maior eficácia neutralizante da atividade letal dos venenos estudados. Dados clínicos são necessários para conhecer a real eficácia dos antivenenos de uso veterinário na neutralização das atividades tóxicas dos venenos de serpentes amazônicas.

Palavras-chave: *Bothrops*, *Crotalus*, soro antiofídico veterinário.

ABSTRACT

Human snake bite accidents by *Bothrops atrox* (in Amazonian Region) and *Crotalus durissus ruruima* (in Roraima State) are frequently and antivenom serological therapy is the better treatment. Today, exist in the market veterinary antitropic-anticrotalic, antivenenos liquid and liophylized presentation. Snakes shown molecular and biological activities variations in yours venoms, including in specimens from same specie. To clinical use, veterinary antivenoms neutralizing efficacy against venoms from regional species are necessary be tested. We are introducing in this work the neutralizing efficacy of veterinary antiophidian antivenom against biological activities from *B. atrox* and *C. d. ruruima* venoms. Also human antitropic and anticrotalic antivenins with clinical use expired date were tested. 2-D electrophoreses Molecular profile from *B. atrox* venom shown 23 and 50 kDa haemorrhagic metalloproteinases toxins as principal constituents. Molecular profiles from *C. d. ruruia* "White" and "yellow" venoms suggest that 50 kDa toxins and 14 kDa basic toxins have a differential expression of your genes in sample specimens venom glands. Veterinary liquid antivenom neutralizing efficacy os hemorrhagic PLA₂ coagulant and desfibrinogen activities from venoms studiet was better that veterinary liophylized antivenom. Anticrotalic antivenom not neutralized hemorrhagic activity from *C. d. ruruima* venom. Western blotting test showed antigen-antibody interactions with all antivenoms used, but veterinary liquid antivenom showed more neutralizing potency that veterinary liophylized antivenom against lethal activity from *B. atrox* venom. Neutralizing potency against lethal activity from *C. d. ruruima* venom was very low in both veterinary antivenoms. Human antivenoms showed high neutralizing potency against lethal activity from venoms studied. Clinical datas are necessary to known real neutralizing efficacy from veterinary antiophidian antivenoms against biological activities from Amazonian snake venoms.

Key-words: *Bothrops*, *Crotalus*, veterinary antiophidian antivenom.

FIGURAS

Figura 1	<i>Bothrops atrox</i> fêmea adulta. Foto do arquivo do Laboratório de Toxinologia Molecular Prof. Paulo Friedrich Bührnheim.....	20
Figura 2	<i>Crotalus durissus ruruima</i> adulto macho. Foto do arquivo do Laboratório de Toxinologia Molecular Prof. Paulo Friedrich Bührnheim.....	21
Figura 3	Acidente botrópico em humanos: a) síndrome compartimental, b) limitação de movimentos e c) amputação.....	23
Figura 4	Acidente crotálico em humanos: a) local da picada / leve edema, b) fácies miastêmica.....	25
Figura 5	Fluxograma da produção de soro antiofídico para uso humano.....	27
Figura 6	Estrutura e modelos moleculares de imunoglobulinas IgG.....	28
Figura 7	Animal doméstico acidentado por serpente do gênero <i>Bothrops</i>	30
Figura 8	Acidente crotálico. Quadro clínico.....	31
Figura 9	Perfil eletroforético bidimensional do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	43
Figura 10	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com o antiveneno antibotrópico.....	45
Figura 11	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelo antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário.....	45
Figura 12	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> pelo antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário	46
Figura 13	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com diferentes diluições do antiveneno antibotrópico.....	49
Figura 14	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com diferentes diluições do antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário.....	49
Figura 15	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de	

	<i>Bothrops atrox</i> com diferentes diluições do antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário.....	50
Figura 16	Perfil imunológico do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com o antiveneno antibotrópico.....	51
Figura 17	Perfil imunológico do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com o antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário.....	51
Figura 18	Perfil imunológico do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com o antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário.....	52
Figura 19	Perfil imunológico do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com o antiveneno anticrotálico.....	52
Figura 20	Perfil eletroforético bidimensional do veneno “amarelo” de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	53
Figura 21	Perfil eletroforético bidimensional do veneno “branco” de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	54
Figura 22	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> pelo antiveneno anticrotálico.....	56
Figura 23	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> pelo antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário.....	56
Figura 24	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> pelo antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário.....	57
Figura 25	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> pelo antiveneno anticrotálico.....	59
Figura 26	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> pelo antiveneno antibotrópico-anticrotálico líquido de uso veterinário.....	59
Figura 27	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> pelo antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário.....	60
Figura 28	Perfil imunológico do veneno de <i>C.rotalus durissus ruruima</i> com o antiveneno anticrotálico.....	61
Figura 29	Perfil imunológico do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	

	com o antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário.....	61
Figura 30	Perfil imunológico do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> com o antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário.....	62
Figura 31	Perfil imunológico do veneno de <i>Crotalus durissus ruruim</i> com o antiveneno antibotrópico.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Neutralização do efeito letal do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com os antivenenos.....	44
Tabela 2	Neutralização da atividade desfibrinogenante do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com os antivenenos.....	47
Tabela 3	Neutralização da atividade coagulante do fibrinogênio do veneno de <i>B. atrox</i> com os antivenenos.....	48
Tabela 4	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de <i>Bathrops atrox</i> com os antivenenos.....	50
Tabela 5	Neutralização do efeito letal do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> com os antivenenos.....	55
Tabela 6	Neutralização da atividade coagulante do fibrinogênio do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> com os antivenenos.....	58
Tabela 7	Neutralização da atividade fosfolipásica A ₂ do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> com os antivenenos.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Bothrops atrox</i> com os antivenenos.....	46
Gráfico2	Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> pelos antivenenos.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- Acetilcolina
ADP	- Adenosina Difosfato
ATP	- Adenosina Trifosfato
DE ₅₀	- Dose Efetiva 50%
DL ₅₀	- Dose Letal 50%
DMH	- Dose mínima hemorrágica
DMD	- Dose mínima desfibrinogenante
DMC-F	-Dose mínima coagulante com fibrinogênio
DTT	-Ditiotreitol
G	- Grama
H	- Hora
IgG	- Imunoglobulina G
i.v.	- Intravenosa
i.d.	-Intradermica
i.p.	Intra peritonal
mM	- Massa milimolar
mA	- Miliamperis
Min	- Minutos
mL	- Militro
Mm	- Milímetro
M	- Molaridade
pI	- Ponto Isoelétrico
PLA ₂	- Phospholipase A ₂ ou fosfolipase A ₂
RPM	- Rotação por Minuto
kDa	- KiloDalton
Ca ²⁺	- Cálcio
A	- Alfa
B	- Beta
<	- Menor
µg	- Micrograma

G	- Grama
%	- Porcentagem
° C	- Grau Celsius
Cm	- Centímetro
mA	- miliAmperis
NaCl ₂	- Cloreto de Sódio
ml	- Mililitro
Mm	- Milímetro
µl	- Microlitro
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
V	- Voltagem
Mg	- Miligrama
H ₂ O ₂	- Peróxido de Hidrogênio
±	- Mais ou Menos
>	- Maior
Kg	- Kilograma
≤	- Menor Igual

SUMÁRIO

	Página	
1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Propriedades Biológicas dos Venenos de Serpentes	21
1.1.1.	Sintomatologia dos Acidentes Botrópicos	22
1.1.2.	Sintomatologia dos Acidentes Crotálicos	24
1.1.3.	Soroterapia	26
1.2	Acidente Ofídico em Animais Domésticos	29
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1.	Venenos de serpentes	35
4.2.	Animais de Experimentação	35
4.3.	Antivenenos	35
4.4.	Caracterização Proteômica dos Venenos	36
4.4.1.	Eletroforese TRIS-TRICINA SDS-PAGE	36
4.5.	Eletroforese Bidimensional.	37
4.5.1	Focalização Isoelétrica: separação das proteínas pelo ponto isoelétrico(<i>pI</i>)	37
4.5.2	Segunda dimensão: eletroforese em gel de acrilamida SDS-PAGE	37
4.6	Avaliação da Eficácia Neutralizante dos antivenenos de uso veterinário	38
4.6.1.	Avaliação da Neutralização da Letalidade	38
4.6.2.	Neutralização da Atividade Hemorrágica	38
4.6.3.	Avaliação da Neutralização da Atividade Desfibrinogenante	39
4.6.4.	Avaliação da Neutralização da Atividade Coagulante	40
4.6.5.	Avaliação da Neutralização da Atividade Fosfolipásica A ₂	40
4.7.	Análise por Western Blotting	41
4.8.	Análises Estatísticas	43
5.	RESULTADOS	
5.1	Caracterização do Perfil Protéico do veneno de <i>Bothrops atrox</i>	

por Eletroforese Bidimensional	43
5.2 Neutralização das Atividades Biológicas do Veneno de <i>Bothrops atrox</i> .	44
5.2.1. Neutralização da Atividade Letal – Potência Neutralizante dos Antivenenos	44
5.2.2 Neutralização da Atividade Hemorrágica	45
5.2.3. Neutralização da Atividade Desfibrinogenante	47
5.2.4. Neutralização da Atividade coagulante	48
5.2.5. Neutralização da atividade Fosfolipásica A ₂	49
5.3. Análises Imunoquímica por Western Blotting	51
5.4. Caracterização do Perfil Protéico do veneno de <i>Crotalus durissus ruruima</i> por eletroforese Bidimensional	53
5.5. Neutralização das atividades Biológica do Veneno “amarelo” de <i>Crotalus durissus ruruima</i>	55
5.5.1. Neutralização da Atividade Letal – Potência Neutralizante dos Antivenenos	55
5.5.2. Neutralização da Atividade Hemorrágica	56
5.5.3. Neutralização da Atividade Coagulante	58
5.5.4. Neutralização da atividade Fosfolipásica A ₂	59
5.6. Análise Imunoquímica por Western Blotting	61
6. DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	71
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

As serpentes peçonhentas caracterizam-se pela presença de glândulas produtoras, armazenadoras e secretoras de veneno. O veneno é composto principalmente por proteínas e peptídeos, e é produzido com a finalidade de imobilizar, matar e iniciar a digestão da presa, além de ser um mecanismo de defesa (BOLAÑOS, 1984).

Os envenenamentos causados por serpentes peçonhentas em humanos constituem problema de saúde pública por sua frequência e gravidade, especialmente em países de clima tropical, onde as condições climáticas favorecem as atividades rurais o ano todo, expondo portanto, maior número de pessoas a acidentes ofídicos. Além disso, há falta ou dificuldade de acesso a recursos terapêuticos adequados e pouco conhecimento dos profissionais de saúde relacionado ao tema (BRASIL, 2001).

A preocupação com o envenenamento ofídico e seu tratamento é bastante antiga. No Brasil, já durante o período da colonização, o ofidismo era considerado responsável por um número significativo de óbitos, sendo registrado como um dos grandes problemas de saúde pública nessa época. Com relação ao tratamento, a literatura produzida na época referia-se basicamente a ervas, rituais e manipulações utilizadas pela população para neutralizar os efeitos do perigo mortal representado pelas cobras. Esse tipo de abordagem sofreu modificação substancial na transição entre os séculos XIX e XX com o desenvolvimento da Microbiologia e Imunologia (WEN, 2003).

Foi no Instituto Butantan que o cientista Vital Brazil demonstrou, pela primeira vez, que os envenenamentos causados por cascavel e jararaca apresentam manifestações clínicas distintas, dando início às experiências de imunização em cães, cabritos, bois e cavalos. Graças ao pesquisador brasileiro, foi comprovado que a especificidade dos antivenenos estava relacionada ao gênero da serpente, ao contrário do pesquisador francês Calmette, que sugeria o uso universal de um único antiveneno, acreditando que esse antiveneno produzido com o veneno de algumas

espécies protegeria o indivíduo contra o envenenamento provocado por qualquer tipo de serpente peçonhenta (CARDOSO *et al.*, 2003).

Desde então, vários estudos têm demonstrado o valor indispensável dos antivenenos na terapêutica dos acidentes por animais peçonhentos. Em 1901, Vital Brazil iniciou a produção dos antivenenos. Naquela época, estimava-se a letalidade de 25%, proporção essa que mostrava redução de mais de 50% dos casos de morte já em 1906, atribuídos ao uso dos antivenenos. Passados quatro décadas desde o início da produção dos antivenenos no Brasil, estatísticas do Instituto Vital Brazil indicavam letalidade variável de 2,6 a 4,6% em acidentes humanos (WEN, 2003).

No ano de 1945 foi fundado o Hospital Vital Brazil, devido à necessidade de disponibilizar um local preservado e de profissionais qualificados para a aplicação dos antivenenos. A partir dos anos de 1950-1960, dados sobre a sintomatologia dos acidentes ofídicos passaram a ser coletados por Rosenfeld, onde a terapêutica dos envenenamentos por animais peçonhentos discutia os aspectos referentes à eficácia, via de administração do antiveneno, doses e complicações da soroterapia. O estudo de Rosenfeld referia-se à rapidez no atendimento e à presteza na administração da soroterapia para que o veneno fosse neutralizado pelo antiveneno o quanto antes, evitando lesões nas células e tecidos (WEN, 2003).

Dados do Ministério da Saúde, para acidentes ofídicos, revelam que a administração do antiveneno deve ser a mais rápida possível após o acidente, uma vez que 60% dos acidentes crotálicos que evoluíram para óbitos receberam atendimento no período igual ou superior a 6 horas após o acidente (BRASIL, 1998).

Epidemiologia dos acidentes ofídicos em humanos no Brasil apresenta um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos cem anos. Os acidentes ofídicos ocorrem com maior frequência de janeiro a maio e novembro a dezembro (início e final do ano), em indivíduos do sexo masculino, em trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos; os membros atingidos com maior frequência são os inferiores e a maioria dos acidentes ofídicos é causada por espécimes do gênero *Bothrops* (Figura 1) (BRASIL, 1998a; BOCHNER *et al.*, 2003). Perfil epidemiológico

semelhante tem sido encontrado no Estado do Amazonas (BORGES *et al.*, 1999; SOUZA, 2001; NORONHA *et al.*, 2004).



Figura 1 - *Bothrops atrox* fêmea adulta. Foto do arquivo do Laboratório de Toxinologia Molecular Prof. Paulo Friedrich Bührnheim.

Dados do Ministério da Saúde mostram que cerca de 90% dos casos notificados no Brasil são atribuídos às serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*; 7,7% ao gênero *Crotalus*, 1,4% ao gênero *Lachesis* e 0,4% ao gênero *Micrurus*. No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993 foi notificada no Brasil uma média de 20.000 casos/ano, com letalidade em torno de 0,45%. O acidente por *Crotalus* teve a maior evolução, apresentando o maior índice de letalidade, onde de 5.072 casos, 95 foram a óbito (1,87%) possivelmente em função da frequência com que evoluiu para insuficiência renal aguda associada uma potente atividade neurotóxica do veneno (BRASIL, 1999). No decorrer dos anos, houve discreto aumento nas notificações dos gêneros *Crotalus* (9,0%), *Lachesis* (2,5%) e *Micrurus* (0,5%), permanecendo o predomínio dos acidentes por serpentes do gênero *Bothrops* (88,0%) (BRASIL, 2005).

Dados recentes sobre os acidentes ofídicos no Estado de Roraima mostram que os acidentes com as serpentes do gênero *Bothrops* ocorreram com maior frequência (63,5%), seguido por *Crotalus durissus ruruima* (23,4%) (Figura 2); mas

Lachesis mostrou um índice significativamente elevado (12,8%) e *Micrurus* foi bastante raro (0,3%). Os acidentes crotálicos são predominantes nas áreas de lavrado e serra, enquanto que os acidentes botrópicos predominam nas florestas (NASCIMENTO *et al.*, 2007).



Figura 2 - *Crotalus durissus ruruima*, macho adulto. Foto do arquivo do Laboratório de Toxinologia Molecular Prof. Paulo Friedrich Bührnheim.

1.1. Propriedades Biológicas dos Venenos de Serpentes

No Brasil, as serpentes peçonhentas de interesse médico pertencem a duas principais famílias: família Elapidae, subfamília Elapinae, com os gêneros *Micrurus* Wagler, 1824 e *Leptomicrurus* Schmidt, 1937; e a família Viperidae, subfamília Crotalinae, com cinco gêneros: *Bothrops* Wagler, 1924; *Bothrocophias* Gutberlet e Campbell, 2001; *Bothriopsis* Peters, 1861; *Crotalus* Linnaeus, 1758 e *Lachesis* Daudim, 1803 (HOGE & ROMANO-HOGE, 1978/79; CAMPBELL & LAMAR, 1989).

Os venenos das serpentes são provavelmente os mais complexos de todos, com 25 a 40% de sólidos totais. Destes, 70 a 90% são constituídos de proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas. Os restantes 10 a 30%, são constituídos por compostos orgânicos de baixa massa molecular, principalmente carboidratos, lipídios, aminoácidos livres,

aminas, nucleotídeos, além de compostos inorgânicos como Zn^{2+} , Cl^- , Mg^{2+} e Fe^{3+} (BOLAÑOS, 1984; FRANÇA & FAN, 1992; SANTORO *et al.*, 1999).

A variabilidade nas atividades biológicas dos venenos de serpentes é devida à diversidade químico/biológica de seus componentes, principalmente de proteínas e peptídeos, que apresentam com ampla variedade de ações fisiopatológicas, como: coagulantes, hemorrágicas, necrosantes, miotóxicas, hemolíticas, cardiotoxícas/citotóxicas (BOLAÑOS, 1984; ROSENFELD, 1971; TU, 1996). As atividades tóxicas são decorrentes de uma ou mais toxinas que podem ser diagnosticadas a nível local e/ou sistêmico após o envenenamento (KAMIGUTI & CARDOSO, 1989; FRANÇA & FAN, 1992; GUTIERREZ & LOMONTE, 1995).

A composição química e as atividades biológicas dos venenos de serpentes podem variar de acordo com alguns fatores, como idade, sexo, procedência geográfica, dieta (tipos de presas) entre outros. Essas variações podem ser qualitativas e/ou quantitativas, podendo ser verificadas inclusive dentro de uma mesma subespécie (CHIPPAUX *et al.*, 1991). Variações ontogenéticas na composição do veneno de espécimes de *Bothrops atrox* procedentes da região de Manaus foram descritas por LÓPEZ-LOZANO *et al.* (2002).

1.1.1. Sintomatologia dos Acidentes Botrópicos

O gênero *Bothrops* é encontrado nas Américas do Norte, Central e do Sul. No Brasil distribui-se em todo o país, tendo como principal causador em cada região as seguintes espécies: *Bothrops atrox* (Norte), *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus* (Nordeste), *Bothrops jararaca* (Sul/Sudeste) e *Bothrops moojeni* (centro-Oeste) (CARDOSO, 1990; Brasil, 1998; MELGAREJO, 2003). O envenenamento por *Bothrops atrox* no Estado do Amazonas é um problema de saúde pública (SOUZA *et al.*, 2002), sendo também responsável pela maioria dos acidentes ocorridos no Estado do Amazonas/Brasil e no Território de la Comissária del Amazonas – Colômbia (SILVA-HAAD/1989, NORONHA *et al.*, 2004).

As toxinas dos venenos de espécies do gênero *Bothrops* possuem ação proteolítica que provoca uma grande inflamação aguda, ação coagulante e

hemorrágica. Evidentemente essas atividades são extremamente complexas e podem usualmente ser atribuídas a componentes específicos. Entretanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente para induzir um efeito, e uma única toxina pode apresentar várias atividades biológicas (FRANÇA *et al.*, 2003).

O envenenamento por *Bothrops* pode apresentar alterações locais como mionecrose, edema e hemorragia, que se desenvolvem rapidamente a partir da inoculação do veneno. Essas alterações locais manifestam-se no paciente, induzindo também reação inflamatória, que surge em maior ou menor intensidade e extensão na região do corpo afetado, algumas vezes com presença de bolhas e/ou necrose (ROSENFELD, 1971; CARDOSO, 1990; BRASIL, 1999). Hemorragia, defibrinogenação, queda da pressão arterial e insuficiência renal aguda são efeitos sistêmicos que podem ser observados no acidente botrópico que dependendo da gravidade do acidente podem levar a óbito (Figura 3) (CARDOSO, 1990).

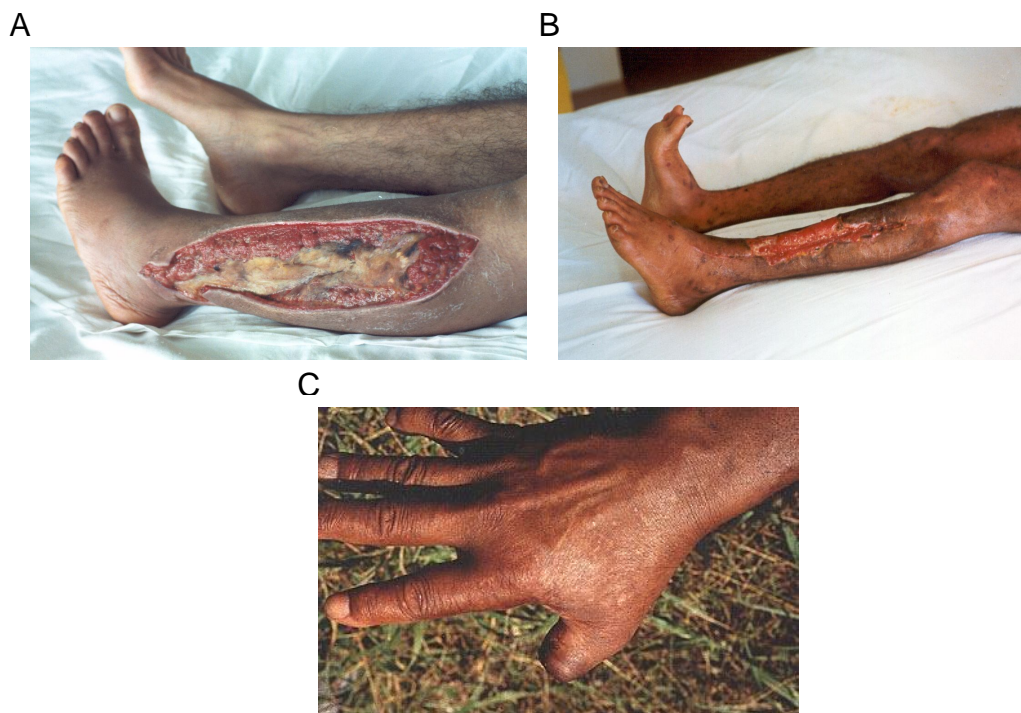


Figura 3 - Acidente botrópico em humanos: A) síndrome compartimental, B) limitação dos movimentos e C) amputação (Instituto Butantan, 2003).

1.1.2. Sintomatologia dos Acidentes Crotálicos

O gênero *Crotalus* distribui-se por todas as Américas, habitando preferencialmente regiões secas e áridas. No Brasil, a principal espécie é *Crotalus durissus*, apresentando sete subespécies: *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus dryinas*, *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus trigonicus* (HOGE & ROMANO-HOGE, 1978/1979; CAMPBELL & LAMAR, 1989).

O gênero *Crotalus* possui o veneno com ação neurotóxica que provoca paralisia progressiva, resultando em apnéia devido à inativação da musculatura respiratória pelas toxinas (PARRISH *et al.*, 1957; ALVES, 1958; BLOOD & HENDERSON, 1963; NOVAES *et al.*, 2007).

O envenenamento por *Crotalus* pode apresentar dois quadros clínicos bem diferentes. A maioria das espécies encontradas nas Américas do Norte e Central apresentam em geral manifestações locais caracterizadas por edema, hemorragia e necrose, além de efeitos sistêmicos como desfibrinogenação, hipotensão e hemorragia (MINTON & WEINSTEIN, 1986, OWNBY & GEREN, 1987, ADAME *et al.*, 1990, GUTIERREZ *et al.*, 1991). Estes sintomas são muito semelhantes com os apresentados nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* (GLENN & STRAIGHT, 1989; RAEL *et al.*, 1993; GLENN *et al.*, 1994; SOUZA, 2002).

O envenenamento causado por cascavel da América do Sul, *Crotalus durissus terrificus* apresenta em nível local, edema discreto, parestesia, e em alguns casos dor com pouca intensidade. Existem relatos sobre a presença de substâncias com propriedades analgésicas no veneno dessa espécie (GIORGE *et al.*, 1993). Em nível sistêmico observa-se principalmente efeito neurotóxico caracterizado pela fácies miastêmica ou fácies neurotóxica de Rosenfeld, evidenciada clinicamente pela ptose palpebral, flacidez da musculatura da face, oftalmoplegia e diplopia; efeito miotóxico caracterizado por mialgia e rabdomiólise com lesão das fibras musculares esqueléticas e consequente mioglobinúria, além de efeito coagulante (Figura 4) (ROSENFELD, 1971; VITAL-BRAZIL, 1972; AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985; AMARAL *et al.*, 1988, 1991). Foi verificado também efeito imunossupressor neste

veneno quando animais imunizados com albumina humana, ou com ovoalbumina, imunizados posteriormente com o veneno tiveram seus níveis de anticorpos reduzidos contra estas duas substâncias (CARDOSO & MOTA, 1997).

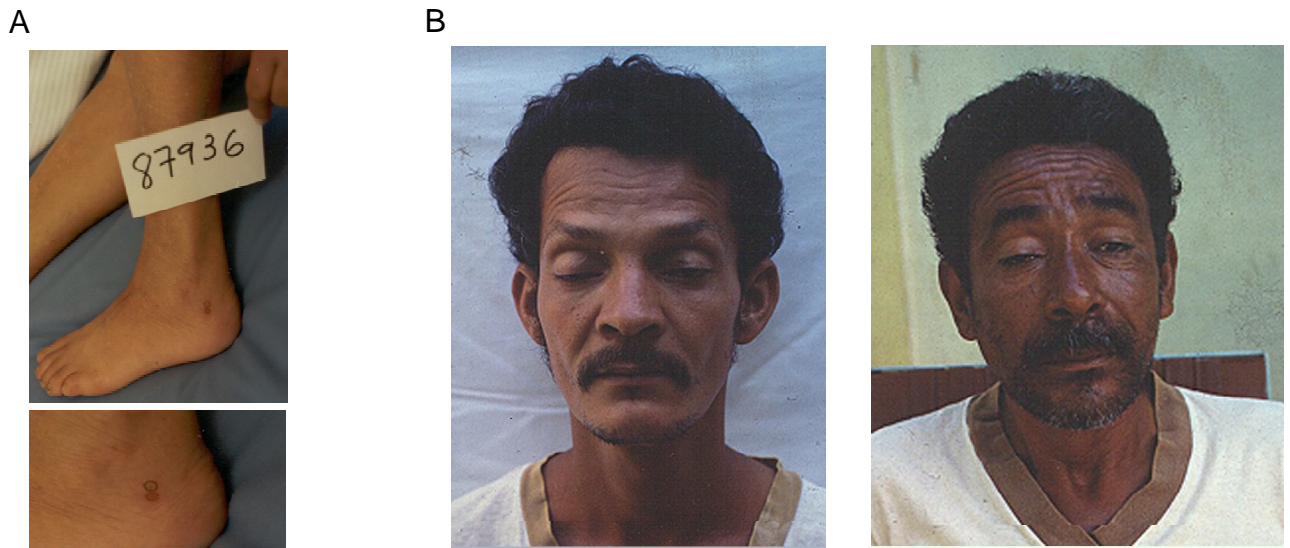


Figura 4 - Acidente crotálico em humanos: A) local da picada / leve edema, B) fácies miastêmica (Instituto Butantan, 2003).

Acidente ofídico em humanos causado por *Crotalus durissus ruruima* no Estado de Roraima demonstraram efeitos neurotóxicos, como o veneno de *Crotalus durissus terrificus* e/ou efeitos hemorrágicos semelhantes ao acidente botrópico. Assim, a caracterização bioquímica e as atividades biológicas do veneno de *Crotalus durissus ruruima* foram realizadas por DOS SANTOS *et al.* (1993). Os venenos foram separados de acordo com a coloração “amarela” ou “branca”, sendo verificado que o veneno de cor “amarela” apresentava como características diferenciais as atividades hemorrágicas e da crotamina, ambas não observadas no veneno de cor “branca”. Por outro lado, LÓPEZ-LOZANO *et al.* (1996) analisaram as variações intrasubespecíficas nas propriedades biológicas dos venenos considerando a procedência geográfica da serpente e a coloração dos mesmos. Os resultados mostraram variações nas atividades biológicas, mas não foi observada correlação entre a atividade hemorrágica e da crotamina com respeito à coloração dos venenos.

1.1.3. Soroterapia

Os antivenenos de uso em humanos utilizados na terapêutica contra os acidentes por serpentes são produzidos usando-se como antígeno um único veneno ou mistura deles (DIAS DA SILVA *et al.*, 1989). Os venenos apresentam vários componentes, alguns destes em estrutura e em função biológicas similares, podem estar presentes nos venenos de serpentes de diferentes espécies, entretanto, outros componentes podem ser espécie-específicos (SILES-VILLARROEL *et al.*, 1974; MEBS & KORNALIK, 1989).

O antiveneno eficiente na neutralização dos efeitos tóxicos dos venenos apresenta anticorpos contra os principais antígenos responsáveis pelas ações sistêmicas e locais. No processo de produção do antiveneno, vários tipos de animais, como cavalos, burros, ovelhas, cabras, cães e coelhos já foram utilizados para a produção de antivenenos. Entretanto, o animal mais utilizado comercialmente é o cavalo, principalmente pelo grande volume de sangue, que pode ser retirado periodicamente (CARDOSO *et al.*, 2003).

O antígeno botrópico é formado pela mistura de veneno de cinco espécies de serpentes do gênero *Bothrops*: *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops alternatus* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%) e *Bothrops jararacussu* (12,5%), principais espécies causadoras de acidentes ocorridos nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Figura 5). Já o antígeno crotálico é composto somente do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (CARDOSO *et al.*, 2003). Os venenos de serpentes amazônicas não estão incluídos no “pool” antigênico para a produção dos antivenenos nacionais para uso em humano.

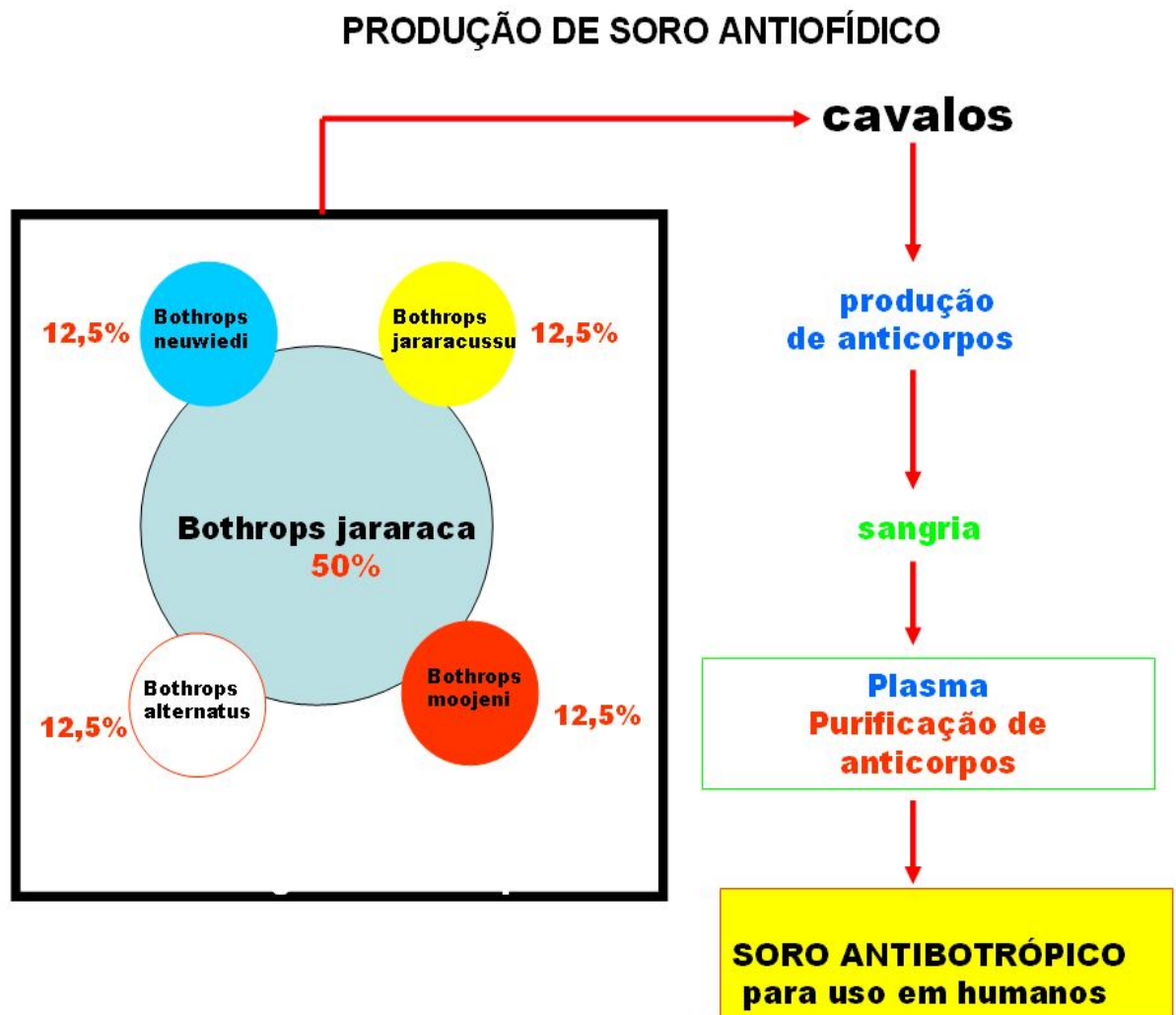


Figura 5- Fluxograma da produção de soro antibotrópico para uso humano.

A obtenção do antivenenos para uso humano é feita a partir do plasma hiperimune por precipitação com sulfato de amônia, fracionamento enzimático e termocoagulação. A digestão enzimática com pepsina cliva a imunoglobulina IgG em dois fragmentos, um maior F(ab')₂ bivalente e com atividade de anticorpo e um fragmento menor, Fc sem a capacidade de combinar com o antígeno, mas com a atividade de fixação de complemento pela via clássica (Figura 6) (CARDOSO *et al.*, 2003).

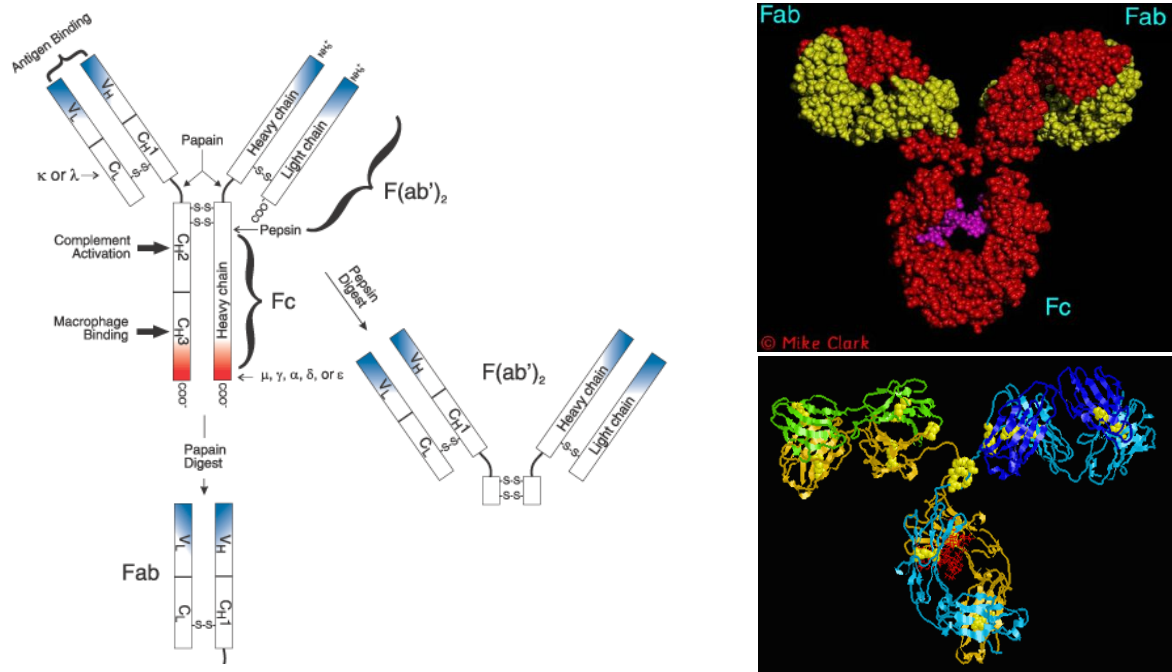


Figura 6 – Estrutura e modelos moleculares de imunoglobulinas IgG.

Além do uso da técnica anteriormente citada para a obtenção de anticorpos antivenenos, pela purificação total ou parcial do antiveneno equino, o melhoramento da soroterapia poderia ser alcançado pelo emprego de anticorpos monoclonais de origem murina ou humana, dirigidos contra os antígenos mais relevantes dos venenos. Esses anticorpos monoclonais são em teoria mais potentes, devido à presença majoritária de anticorpos específicos (WEN, 2003).

A neutralização cruzada dos antivenenos com venenos de serpentes que não são utilizados durante o processo de imunização é relativamente comum (ROJAS *et al.*, 1987; GENÉ *et al.*, 1989; SANTORO *et al.*, 1999). Essas reações podem acontecer até mesmo entre venenos de serpentes de diferentes gêneros e de localidades geograficamente muito distantes (MEBS & KORNALIK, 2001; ANDERSON *et al.*, 1993), sugerindo a presença de antígenos com propriedades imunológicas similares nestes venenos. Entretanto, em determinadas situações, a neutralização cruzada é baixa ou até mesmo inexistente. Portanto, é necessário e importante verificar o grau de reatividade cruzada dos antivenenos frente às diferentes atividades biológicas das toxinas dos venenos que não são utilizados no processo de imunização dos animais, em função das possíveis peculiaridades imunológicas dos venenos das espécies de cada região.

A existência da variação intraespecífica nos venenos de serpentes pode ter efeito direto sobre o tratamento do acidente ofídico e na pesquisa toxicológica, dentre eles a produção de antivenenos ineficientes, sintomas não esperados e a dificuldade na repetição dos resultados, no caso de estudos experimentais. Para que os antivenenos possam ter ampla eficácia, os “pools” dos venenos que são utilizados para a sua obtenção teriam que incluir amostras de venenos de espécimes coletados de diferentes áreas geográficas e em diferentes estágios do desenvolvimento ontogenético (WUSTER & McCARTHY, 1996; WARRELL, 1997; CHIPPAUX & GOYFFON, 1998).

Assim, como os venenos de serpentes amazônicas não são incluídos no “pool” antigênico para a produção dos antivenenos nacionais, faz-se necessário avaliar a eficácia neutralizante dos antivenenos de uso humano e veterinário sobre as atividades biológicas dos venenos de serpentes amazônicas.

1.2. Acidente Ofídico em Animais Domésticos no Brasil

Os animais domésticos também são vítimas de animais peçonhentos, ou e devido aos prejuízos econômicos que acarretam e pela dificuldade do tratamento, os pecuaristas voltam sua atenção para esses acidentes (GRUNERT & GRUNERT, 1969; BELLUOMINI *et al*, 1982-1983), RAPOSO *et al.* (2000/2001) ao relatarem casos de envenenamento por serpentes em equinos, observaram que os primeiros sintomas foram edema e hemorragia no local da picada, seguida de urina sanguinolenta e fezes com sangue, além de congestão e hemorragia severa na musculatura, timo, intestino, baço, rins, fígado, cérebro e áreas de necrose na musculatura próxima da picada (Figura 7). Sinais clínicos como estes são similares aos observados nos acidentes ofídicos em humanos causados por espécimes do gênero *Bothrops*.

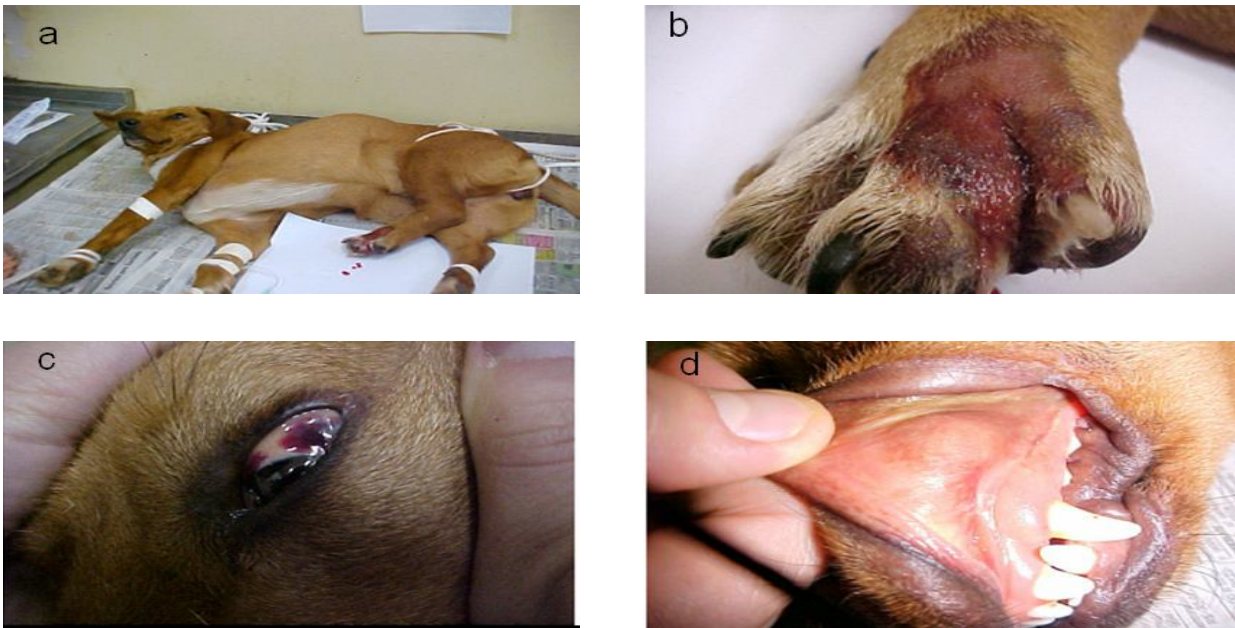


Figura 7 - Animal doméstico acidentado por serpente do gênero *Bothrops*, a – Animal em tratamento, b – Extremidade do membro superior esquerdo afetado, apresentando edema, calor e dor, c – mucosa ocular apresenta-se avermelhada devido ao efeito hemorrágico do veneno, d – Mucosa oral apresenta-se ectérica.

Os edemas mais intensos produzidos pela picada de jararaca em bovinos são provocados pelas espécies: *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox* e *Bothrops moojeni*, mas nos envenenamentos pelas espécies *Bothrops jararaca* e *Bothrops neuwiedi* os edemas são menores. O veneno de *Bothrops* tem ação coagulante, hemorrágica e necrosante, podendo levar o animal à morte (NOVAES *et al.*, 2007).

De acordo com ARAÚJO & BELLUOMINI (1960/1962) e ARAÚJO *et al.* (1963), os equinos e bovinos são entre os animais domésticos, os mais sensíveis à picada de cobras. Em suas pesquisas, mostraram em bovinos as potências dos venenos, sendo os valores para cada espécie: *Crotalus durissus terrificus* = 20; *Bothrops cotiara* = 4; *Bothrops atrox* = 2,5; *Bothrops jararaca* e *Bothrops neuwiedi* = 1 e *Bothrops jararacussu* = 0,5, demonstrando com isso, um maior grau de resistência daqueles animais aos envenenamentos botrópicos (NOVAES *et al.*, 2007).

Na análise de 1.260 formulários do Instituto Butantan no período de 1905 a 1941, foram identificados 390 acidentes em cães com 46 mortes, 532 em equídeos com 49 mortes e 313 em bovinos com 36 mortes. Assim de 1.235 acidentes com 131 mortes, 498 foram causados por serpentes do gênero *Bothrops* com 28 mortes, 111

por *Crotalus* com 19 mortes e 626 sem identificação da serpente, mas com 84 mortes. Do total acima citado, 536 picadas foram na região da cabeça e 405 foram no focinho (BIONDO *et al.*, 1993). Segundo ARAÚJO *et al.* (1963) demonstraram que o acidente em animais por *Bothrops* é, em média, cinco vezes menos potente que por *Crotalus*.

As notificações de acidentes ofídicos em animais domésticos não são consideradas compulsórias, o que impede uma estatística mais precisa e real do prejuízo por eles causados. A razão disso ocorre porque os antivenenos para uso em veterinária são produzidos e vendidos livremente para médicos veterinários, enquanto que os antivenenos de uso humano são produzidos por organizações governamentais, distribuídos gratuitamente para uso restrito em hospitais, o qual favorece a obtenção de dados epidemiológicos (TOKARNIA, 2006).

Segundo PARRISH (1958) e GRUNERT & GRUNERT (1969), a gravidade do acidente em bovinos depende do local e da quantidade de veneno inoculado. Em acidentes produzidos por espécimes do gênero *Bothrops*, o sintoma mais comum é o processo inflamatório (SMITH & JONES, 1962), que produz edema volumoso, podendo atingir a glote, levando o animal à morte por insuficiência respiratória quando o animal é picado no focinho. Essa ação é menos grave quando atinge os membros ou outras partes do animal. Em acidente por espécimes do gênero *Crotalus*, as toxinas provocam sintomas como queda das pálpebras, dificuldade da visão, discreto edema e o animal apresenta perda de equilíbrio (Figura 8) (NOVAES *et al.*, 2007).



Figura 8 - Acidente crotálico. Quadro clínico: queda das pálpebras, dificuldade da visão, edema discreto no local da inoculação do veneno, o animal apresenta perda de equilíbrio.

2. JUSTIFICATIVA

A composição da fauna de serpentes na Amazônia indica a ocorrência de espécies e subespécies peculiares para essa região, o que assume grande importância para o problema do ofidismo, pois em alguns casos, serpentes da mesma espécie, mas de regiões diversas, podem ter venenos de composição e propriedades farmacológicas, bem como imunológicas diferentes. Os poucos dados científicos sobre a fauna de serpentes peçonhentas da Amazônia e das características das atividades biológicas e imunológicas de seus venenos, principalmente de áreas pouco exploradas da Amazônia, sugere que podemos não estar empregando a melhor terapêutica para os acidentes ocorridos. Novos sistemas de colonização da Amazônia (indústria hoteleira), o avanço das fronteiras agrícolas e a exploração madeireira sugerem a necessidade de iniciar pesquisas sobre a biodiversidade dos animais peçonhentos e da eficácia neutralizante dos antivenenos nacionais sobre as atividades biológicas de seus venenos.

Atualmente, os venenos de espécies amazônicas não estão incluídos no “pool” dos venenos que são utilizados como antígenos para a produção dos antivenenos, tanto para uso humano como para uso veterinário. Portanto, precisa-se avaliar a capacidade neutralizante dos antivenenos nacionais no caso de acidentes produzidos por serpentes amazônicas. Análises moleculares e das atividades biológicas destes venenos poderiam contribuir para uma melhor compreensão sobre a clínica e a soroterapia no caso de acidentes ofídicos causados por essas espécies.

Na Amazônia a espécie *Bothrops atrox* causa mais de 90% dos acidentes ofídicos e no Estado de Roraima, as picadas por *Crotalus durissus ruruima* são a segunda maior causa desses acidentes.

Atualmente, na região Sul do país estão sendo produzidos, com apresentação na forma líquida ou liofilizada, os antivenenos para uso em veterinária contra os venenos de jararacas e cascavéis, mas os venenos antígenos usados para a produção desses antivenenos não incluem os venenos de serpentes amazônicas. Embora esses antivenenos sejam usados na Amazônia para o tratamento de

animais acidentados por serpentes peçonhentas, não existem dados na literatura pesquisada sobre a eficácia neutralizante desses antivenenos sobre as atividades biológicas dos venenos de serpentes amazônicas.

Os antivenenos para uso em humanos com data de validade vencida, mas conservado à temperatura de 8° C, e sem apresentar precipitação e/ou aparência turva em casos de emergência veterinária são usados para o tratamento de acidente ofídico em animais. A eficácia neutralizante desses antivenenos precisa também ser avaliada, com intuito de obter subsídios sobre a eficácia neutralizante para seu uso terapêutico veterinário ou não na região Amazônica.

3. OBJETIVOS

3. 1. GERAL

Avaliar a eficácia neutralizante dos antivenenos nacionais sobre as atividades biológicas dos venenos de serpentes amazônicas.

3. 2. ESPECÍFICOS

3.2.1. Obter, por técnicas proteômicas, o perfil molecular dos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*.

3.2.2. Avaliar a eficácia neutralizante dos antivenenos de uso em veterinária sobre as atividades biológicas dos venenos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Venenos de Serpentes

Os venenos de espécimes adultos de *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima* (venenos “amarelo” e “branco”) foram obtidos do banco de venenos de animais peçonhentos do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührnheim”.

4.2. Animais de Experimentação

Para a caracterização experimental das atividades biológicas dos venenos *in vivo*, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos, não isogênicos, pesando 20 ± 2 g, provenientes do Biotério Experimental do Laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo “Prof. Paulo Friedrich Bührnheim”. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, sob temperatura controlada de 22-25°C, com ração própria para a espécie e água *ad libitum*, com ciclo de luz de 12 horas.

4.3. Antivenenos

Os antivenenos utilizados nos experimentos foram os antivenenos: (SAB) produzido no Instituto Butantan, lote 0211138/0 com vencimento em 06/11/2005 (uso humano), antiveneno anti-crotálico (SAC-LIQ) produzido na Fundação Ezequiel Dias/FUNED, lote 020821-32, com vencimento em 28/04/2006 (uso humano), antiveneno antibotrópico/crotálico (SABC-VETERINÁRIO-LIQ), uso veterinário líquido, produzido no laboratório Vencofarma, lote-006, vencimento novembro/2008, e o antiveneno polivalente liofilizado antibotrópico/crotálico (SABC-VETERINÁRIO-LIO), uso veterinário, fabricado no laboratório Lema BIOLOGIC do Brasil Ltda, lote 003, vencimento março/2009. Os antivenenos de uso humano com data de validade vencida estavam conservados a 8° C e sem aparência turva e/ou presença de precipitado.

4.4. Caracterização Proteômica dos Venenos

4.4.1. Eletroforese TRIS-TRICINA SDS-PAGE

O sistema de eletroforese Tris-Tricina compõe-se basicamente de três tipos de géis, sendo que a trama de polímeros existentes em cada tipo de gel vai ficando menor à medida que avança a corrida eletroforética para o ânodo. O gel Tris-Tricina com glicerol é o mais indicado para proteínas com baixas massas moleculares (até 1 kDa) para obter melhor resolução de proteínas e peptídeos com baixa massa molecular.

A eletroforese em gel de poliacrilamida pelo sistema Tris-Tricina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por SCHÄGGER & VON JAGOW (1987), no gel fracionador foi usado glicerol.

As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra TRIS-HCl 0,05 M, pH 6,8 com 12% de glicerol (v/v), 4% SDS, 0,01% de azul de bromofenol. As amostras do veneno de *Bothrops atrox* ou *Crotalus durissus ruruima* foram aplicadas em concentração de 20 µg. A redução das amostras foi feita com DTT (ditiotreitól) em concentração final de 0,1 M. Foi usado como padrão de massa molecular as toxinas do veneno de *Bothrops atrox* (50, 23, 14 kDa), segundo LÓPEZ-LOZANO (2002).

A corrida eletroforética foi desenvolvida em sistema de refrigeração, 10°C, com tampão catódico superior Tris-Tricina 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25 e tampão anódico inferior Tris-HCl 0,2 M, pH 8.9.

Após a corrida eletroforética os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 0,2% em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1: 5: 4 (v/v) "overnight". Em seguida, os géis foram descorados em solução de ácido acético, metanol e água (1: 1: 8) para a revelação das proteínas.

4.5. Eletroforese Bidimensional

4.5.1. Focalização Isoelétrica: separação das proteínas pelo ponto isoelétrico (pI)

Foram utilizados 500 µg dos venenos de *Bothrops atrox* ou *Crotalus durissus ruruima*, DTT e tampão IPG na solução de hidratação para fitas de 24 cm com pH 3 – 10 NL por 12 horas. Após a hidratação, as proteínas foram focalizadas por 7 horas com um total de 40.000 volts/hora, utilizando-se o sistema de focalização IPGPHOR 3 da GE Healthcare. Depois da focalização isoelétrica, os sistemas foram equilibrados em solução de equilíbrio com DTT (redução por 20 minutos) e posteriormente em solução de equilíbrio com iodoacetamida (alquilação por 20 minutos).

4.5.2. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Os géis de 12,5% foram preparados segundo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970). As toxinas do veneno de *Bothrops atrox* (10 µg) foram utilizadas como marcadores de massa molecular (50, 23 e 14 kDa), segundo LÓPEZ-LOZANO (2002).

Após a focalização, as fitas foram colocadas horizontalmente sobre o gel de poliacrilamida para a separação por massa molecular, como gel selante foi usado agarose 0,1%.

A corrida eletroforética foi desenvolvida com sistema de refrigeração, a 10°C, em solução tampão de corrida 1 x (Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%) com 60 mA por gel. (Tampão anódico). A mesma solução tampão 2 x concentrada foi usada como tampão catódico.

Os géis foram corados com *Coomassie Blue* 0,2% por no mínimo 90 min e posteriormente em solução descorante (20% etanol, 5% ácido acético, 75% água destilada) por 15, 45 e 120 min respectivamente. Todos os géis foram escaneados e

posteriormente analisados no sistema *ImageMaster 2D Platinum 6.0*, segundo manual de instruções do fabricante.

4.6. Avaliação da Eficácia Neutralizante dos Antivenenos de uso Veterinário

4.6.1. Avaliação da Neutralização da Letalidade

Para avaliar a atividade letal dos venenos, a dose letal 50% (DL₅₀) foi previamente estimada usando-se grupos de quatro camundongos albinos, inoculados pela via intraperitoneal (i.p.) com diferentes doses (µg) dos venenos. Os venenos foram dissolvidos em solução salina 0,9%, volume final de 0,5 mL e as mortes dos animais foram registradas durante 24 horas. A DL₅₀ foi calculada através da análise de Probitos (FINNEY, 1971).

A eficácia na neutralização da letalidade foi estimada incubando-se por 30 min a 37°C o veneno equivalente a 5DL₅₀ com diferentes quantidades (µL) dos antivenenos e inoculados pela via intraperitoneal (i.p.). A neutralização, calculada por análise de Probitos (FINNEY, 1971), foi expressa como a dose efetiva 50% (DE₅₀), definida como a razão mL de antiveneno / mg do veneno no qual 50% dos indivíduos foram protegidos da atividade letal da dose do veneno usado.

A potência neutralizante dos antivenenos é expressa como a quantidade de veneno (mg) que é neutralizado por 1 mL do antiveneno, usando-se a seguinte fórmula: Potência (mg/mL) = 5DL₅₀ - 1DL₅₀ / DE₅₀ (ARAÚJO *et al.*, 2008).

4.6.2. Neutralização da Atividade Hemorrágica

A dose mínima hemorrágica (DMH) é definida como a menor quantidade (µg) de veneno capaz de produzir um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro após duas horas de inoculação do veneno (GUTIERREZ *et al.* 1985). Grupos de quatro camundongos foram injetados intradermicamente (i.d.) na região abdominal, previamente depilada, com diferentes doses (µg) dos venenos de *Bothrops atrox* ou *Crotalus durissus ruruima*. As doses foram diluídas em 100 µL de volume final em solução salina. Após duas horas, os animais foram sacrificados, a pele removida e a

área hemorrágica fixada entre duas placas de vidro. Com o auxílio de um transluminador, o contorno da lesão foi copiado e medido o diâmetro (mm) com paquímetro digital (*Starret*). O valor da dose mínima hemorrágica foi obtido pela análise de regressão linear da área hemorrágica (mm) relacionada com a dose de veneno.

A eficiência neutralizante dos antivenenos foi avaliada usando-se como dose desafio 5 doses mínimas hemorrágicas (5 DMH) do veneno de *Bothrops atrox* ou 2 doses mínimas hemorrágicas (2 DMH) do veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Determinadas doses (μL) dos antivenenos foram incubadas a 37°C por 30 min com as respectivas doses desafios do veneno botrópico ou crotálico. Após a incubação, 100 μL de cada sistema foi injetado intradermicamente na região abdominal dos camundongos e o halo hemorrágico avaliado como anteriormente descrito.

A percentagem de inibição (%) foi calculada com a seguinte fórmula: % inibição = $100 - (\text{diâmetro hemorrágico experimental} \times 100) / \text{diâmetro hemorrágico do controle}$ (GUTIÉRREZ *et al.*, 1985).

4.6.3. Avaliação da Neutralização da Atividade Desfibrinogenante

A dose mínima desfibrinogenante (DMD) do veneno de *B. atrox* foi previamente determinada e definida como a menor quantidade de veneno, que quando injetado por via intravenosa (i.v.) em camundongos, após 2 horas torna o sangue incoagulável (THEAKSTON & REID, 1983).

A eficiência neutralizante foi avaliada incubando por 30 min a 37°C o veneno, contendo duas doses mínimas desfibrinogenantes, (2DMD) com diferentes doses (μL) dos antivenenos e injetados pela veia caudal dos camundongos. Após duas horas, os camundongos foram anestesiados com éter e o sangue deles foi coletado por solução de continuidade da região do plexo braquial. A incoagulabilidade ou não do sangue foi avaliada após duas horas.

A neutralização da atividade desfibrinogenante foi estimada como a menor quantidade de antiveneno que neutraliza a desfibrinogenação induzida pelo veneno (GENE *et al.*, 1989).

4.6.4. Avaliação da Neutralização da Atividade Coagulante

A atividade coagulante dos venenos foi avaliada sobre fibrinogênio bovino tipo I-S (Sigma), segundo método descrito por THEAKSTON & REID (1983). A dose mínima coagulante sobre o fibrinogênio (DMC-F) corresponde à menor dose (μg) de veneno que induz a coagulação de uma solução de fibrinogênio (2 mg/mL) em 60 segundos.

A neutralização da atividade coagulante foi avaliada incubando por 30 min a 37°C, a dose de veneno equivalente a 2DMC-F com diferentes doses (μL) dos antivenenos. Após a incubação, o sistema foi agregado a 200 μL da solução de fibrinogênio e calculado o tempo de início da coagulação. A neutralização foi expressa como a razão antiveneno/veneno no qual o tempo de início da coagulação foi prolongado em três vezes quando comparado com o tempo de início da coagulação do controle (GENE *et al.*, 1989).

4.6.5. Avaliação da Neutralização da Atividade Fosfolipásica A₂

A neutralização da atividade fosfolipásica A₂ foi avaliada em placas com gel de agarose 1% em PBS, pH 8,2, 0,04 M contendo 3% de gema de ovo como fonte do substrato fosfatidilcolina. Como dose desafio foi utilizado 10 μg do veneno de *Crotalus durissus ruruima* ou 5 μg do veneno de *Bothrops atrox*. As doses desafios dos venenos foram incubadas com diferentes quantidades (μL) de antivenenos por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, 20 μL de cada sistema foram aplicados nos poços do gel de agarose e incubados em câmara úmida a 37°C por 24 horas. Seguidamente o diâmetro (mm) dos halos foi medido com paquímetro digital.

A eficácia dos antivenenos foi expressada como a menor quantidade de antiveneno que inibe a atividade fosfolipásica A₂ do veneno usando-se a fórmula [%

de inibição $PLA_2 = 100 - (\text{diâmetro do halo experimental} \times 100 / \text{diâmetro do halo do controle})$].

4.7. Análise por *Western Blotting*

A técnica utilizada foi segundo a metodologia descrita por TOWBIN *et al.* (1979). As amostras foram previamente submetidas à eletroforese Tris-Tricina (SDS-PAGE), segundo SCHÄGGER & VON JAGOW (1987). Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas com tampão de transferência (Tris 14 mM, glicina 192 mM e 200 mL/L de Metanol) para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente constante de 260 mA por 2:30 h. A membrana de nitrocelulose foi corada com *Ponceau S* para verificar a eficiência da transferência das proteínas do gel para a membrana. Depois a membrana foi lavada abundantemente com água destilada para tirar o excesso de corante. Logo, a membrana foi tratada com solução de bloqueio (5g de leite desnatado Molico-Nestlé[®] dissolvidos em 100 mL de tampão Tris-Salina 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05% por duas horas para bloquear sítios inespecíficos de ligação.

Depois do bloqueio, a membrana foi lavada com solução TBS-T (Tampão Tris-Salina *Tween* 20) três vezes por 5 min cada. Em seguida, foram adicionados, separadamente, os antivenenos antibotrópico-crotálico de uso veterinário líquido ou liofilizado e antibotrópico ou anticrotálico de uso humano com data de validade vencida, diluídos 1:1000 em TBS e incubados à temperatura ambiente por uma hora e trinta minutos. Lavou-se novamente a membrana com TBS-T três vezes por 5 min cada. O conjugado imunoenzimático (anti IgG de cavalo com peroxidase) foi diluído na proporção 1:2000 em solução TBS e incubado com a membrana por 1:30 h à temperatura ambiente.

Após a incubação, a membrana de nitrocelulose foi lavada com solução TBS-T três vezes e com TBS duas vezes por 5 min cada. Após as lavagens, a reação de detecção das proteínas foi desenvolvida com adição do substrato para peroxidase (1,5 mg 4- α -cloro-1-naftol + 0,5 ml Metanol + 24 μ l H₂O₂ + 17,5 ml TBS). Após o aparecimento das bandas, a reação foi parada lavando a membrana com água destilada.

4.8. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram apresentadas como a média \pm DP com 5% de limite de confiança. As médias de dois grupos experimentais foram determinadas pelo teste t-Student ou ANOVA e Teste de Tuckey.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do Perfil Protéico do veneno de *Bothrops atrox* por Eletroforese Bidimensional

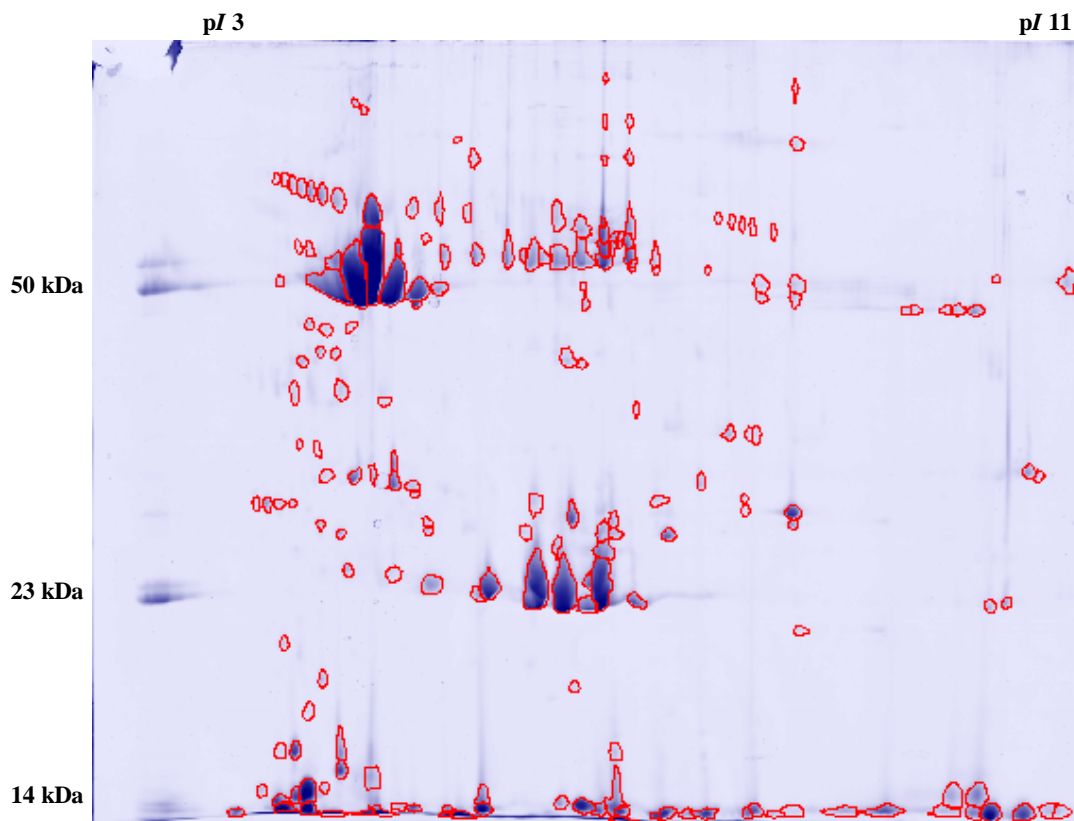


Figura 9 – Perfil eletroforético bidimensional do veneno de *Bothrops atrox* com detecção de 200 spots, distribuídos em diferentes p/s e massas moleculares. Gel analisado no *ImageMaster 2D Platinum 6.0* e corado com Coomassie Blue R – 250.

Segundo a figura 9, no veneno de *Bothrops atrox* foram detectados 200 spots protéicos, sendo que 167 deles apresentaram pI 3-6 e 66 spots com pI de 7-11. Quanto à massa molecular, as proteínas distribuíram-se uniformemente com massas moleculares entre 14-80 kDa. As proteínas de maior intensidade, com 23 e 50 kDa são metaloproteinase hemorrágicas, já identificadas em estudos anteriores por LÓPEZ LOZANO *et al* (2002).

5.2. Neutralização das Atividades Biológicas do Veneno de *Bothrops atrox*

5.2.1. Neutralização da Atividade Letal - Potência Neutralizante dos Antivenenos

Tabela 1 – Neutralização do efeito letal do veneno de *Bothrops atrox* com os antivenenos.

Antiveneno	DE ₅₀ µL antiveneno/mg veneno	Potência mg veneno/mL antiveneno
Antibotrópico-crotálico Líquido Veterinário	343,10± 0,22	1,39
Antibotrópico-crotálico Liofilizado Veterinário	749,88± 0,91	1,06
Antibotrópico	110,88± 0,31	3,86

DL₅₀ = 100 µg (84 – 115) 5 mg / kg..

5 DL₅₀ = 500 µg, dose desafio usada para calcular a DE_{50%} do veneno de *Bothrops atrox*.

DE₅₀ = antiveneno (µL) que neutraliza 50% da atividade letal de 1 mg do veneno.

Potência: quantidade de antiveneno (mL) que neutraliza 100% a atividade letal de 1 mg do veneno.

Potências dos antivenenos antibotrópico-crotálico de uso veterinário líquido ou liofilizado = 1,5 mg do veneno de *B. jararaca*/mL (segundo a bula).

Potência do antiveneno antibotrópico= 5 mg do veneno de *Bothrops jararaca*/mL (segundo a bula).

Segundo a tabela 1, o antiveneno antibotrópico de uso humano, com data de validade vencida, neutralizou com maior eficácia o efeito letal em camundongos induzido pelo veneno de *Bothrops atrox*. Enquanto que, os antivenenos de uso veterinário líquido e liofilizado mostraram menor eficácia, com uma potência de 1,39 e 1,06 mg/ml, respectivamente. O antiveneno líquido de uso veterinário apresentou maior potência que o antiveneno liofilizado de uso veterinário.

5.2.2. Neutralização da Atividade Hemorrágica

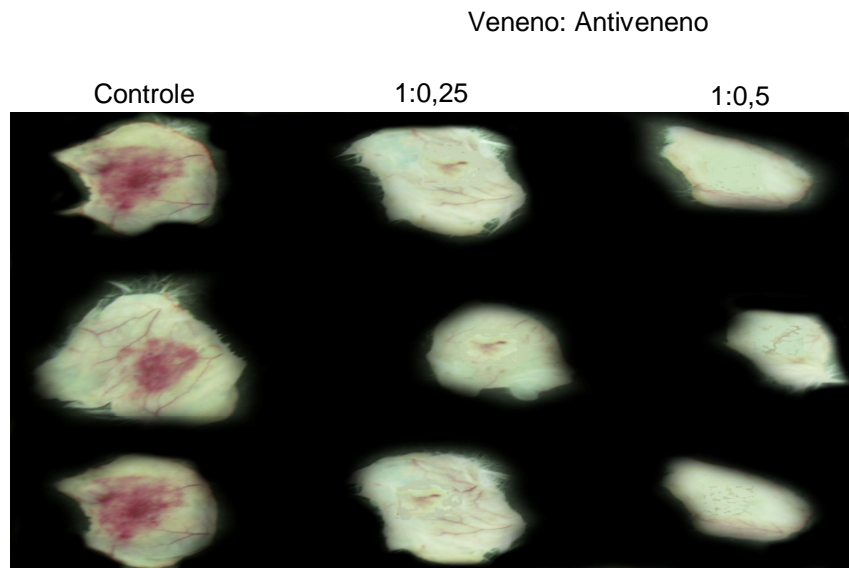


Figura 10 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* com o antiveneno antibotrópico. Controle: 10 µg do veneno.

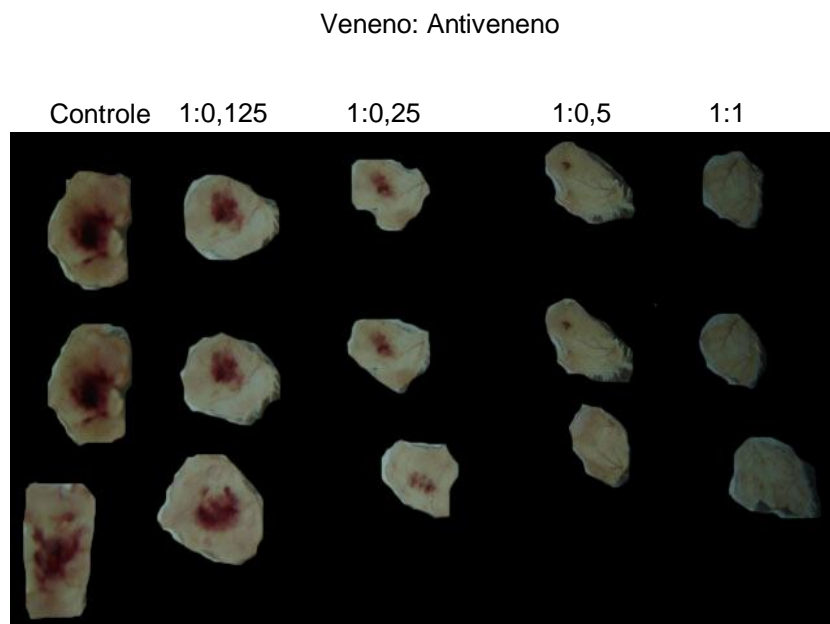


Figura 11 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* com o antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário. Controle: 10 µg do veneno.

Veneno: Antiveneno

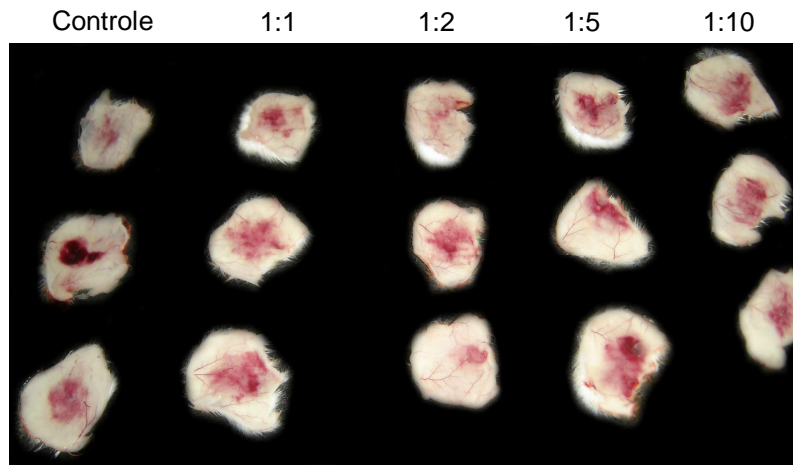


Figura 12 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* com o antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado uso veterinário. Controle: 10 µg do veneno.

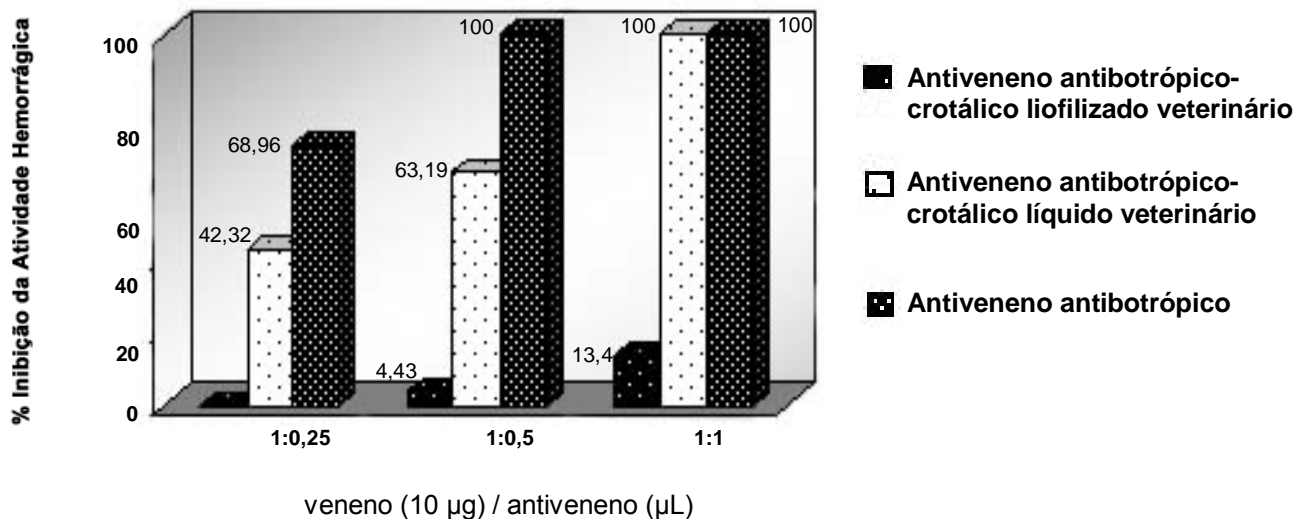


Gráfico 1 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops atrox* com os antivenenos.

Segundo as figuras 10, 11, 12 e o gráfico 1, o antiveneno antibotrópico de uso humano, com data de validade vencida, foi o mais eficaz na proporção de 1:0,5 quanto à neutralização de 100% da atividade hemorrágica, induzido por 5 DMH do veneno de *Bothrops atrox*. O antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário inibiu 100% esta atividade na proporção de 1:1, sendo duas vezes menos potente que o antiveneno antibotrópico de uso humano vencido. O antiveneno

antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário apresentou baixa eficácia neutralizante da atividade hemorrágica do veneno botrópico, pois, mesmo na proporção de 1:10 não houve maior eficácia neutralizante.

5.2.3. Neutralização da Atividade Desfibrinogenante

Tabela 2 – Neutralização da atividade desfibrinogenante do veneno de *Bothrops atrox* com os antivenenos.

Antivenenos	Veneno: Antiveneno	
	1:0,25	1:0,5
Antibotrópico-crotálico líquido veterinário	Sangue coagulável	Sangue coagulável
Antibotrópico-crotálico liofilizado veterinário	Sangue coagulável	Sangue coagulável
Antibotrópico	Sangue incoagulável	Sangue coagulável

Controle: 6 µg do veneno de *Bothrops atrox* = 2 DMD, produz sangue incoagulável.

Segundo a tabela 2, a atividade desfibrinogenante, *in vivo*, de 2DMD (6 µg) do veneno de *Bothrops atrox* foi melhor neutralizada pelos antivenenos de uso veterinário. Entretanto, o antiveneno antibotrópico de uso humano vencido apresentou menor eficácia neutralizante nessa atividade.

5.2.4 Neutralização da Atividade Coagulante

Tabela 3 – Neutralização da atividade coagulante do fibrinogênio do veneno de *B. atrox* com os antivenenos.

Antivenenos	Tempo de Início da Coagulação (seg)			
	Veneno / Antiveneno			
	1:0,06	1:0,12	1:0,25	1:0,5
Antibotrópico-crotálico líquido veterinário	51,25	116,05	>180	>180
Antibotrópico-crotálico liofilizado veterinário	63	95	120	>180
Antibotrópico	>180	>180	>180	>180

Controle: 3 µg do veneno de *B. atrox* = produz coágulo de fibrinogênio bovino em 44 s. 1DMC-F= 1,5µg e 2DMC-F= 3µg.

Segundo a Tabela 3, o antiveneno que apresentou maior eficácia na neutralização da atividade coagulante do fibrinogênio bovino do veneno de *Bothrops atrox* foi o antiveneno antibotrópico de uso humano vencido, que com a menor dose usada, prolongou por mais de três vezes (> 180 seg) o tempo de início da coagulação do fibrinogênio bovino quando comparando com o controle (44 seg). Dos antivenenos de uso veterinário, o líquido apresentou melhor eficácia.

5.2.5. Neutralização da Atividade Fosfolipásica A₂

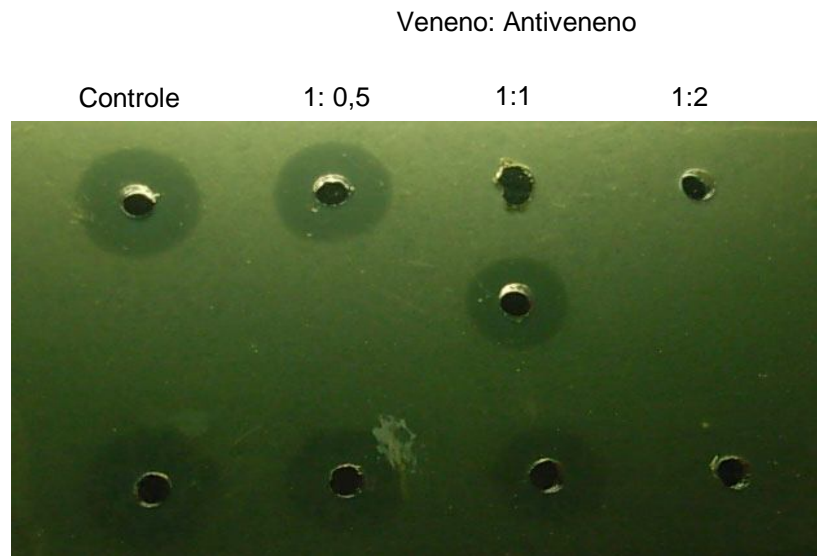


Figura 13 – Neutralização da atividade fosfolipásica A₂ do veneno de *Bothrops atrox* com diferentes diluições do antiveneno antibotrópico. Controle: 5 µg do veneno.

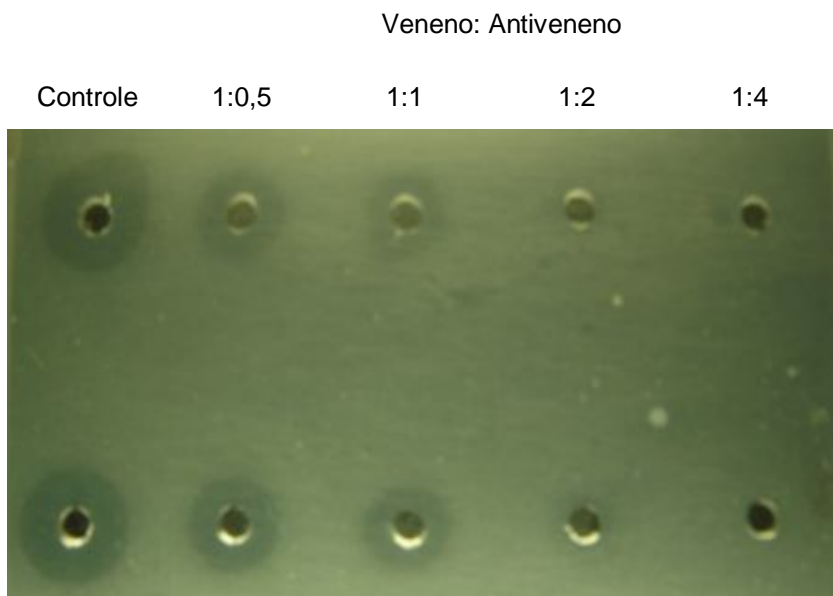


Figura 14 – Neutralização da atividade fosfolipásica A₂ do veneno de *Bothrops atrox* com diferentes diluições do antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário. Controle: 5 µg do veneno.

Veneno: Antiveneno

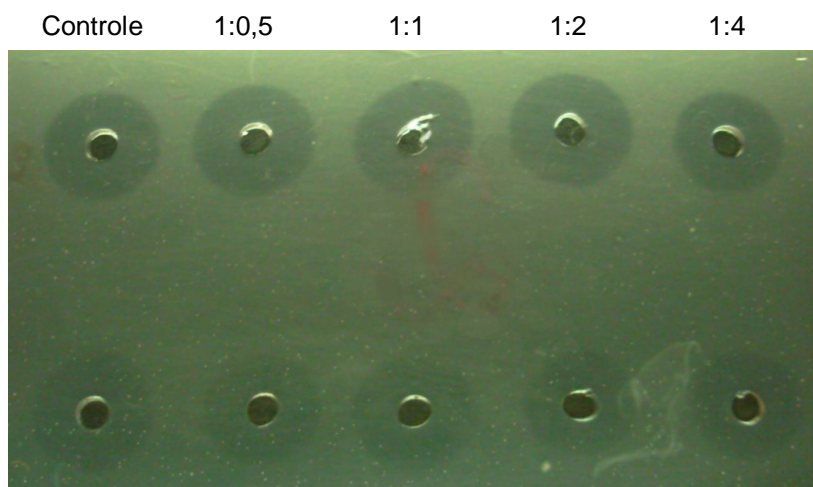


Figura 15 – Neutralização da atividade fosfolipásica A_2 do veneno de *Bothrops atrox* com diferentes diluições do antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário. Controle: 5 μ g do veneno.

Tabela 4 – Neutralização da atividade fosfolipásica A_2 do veneno de *Bothrops atrox* com os antivenenos.

Antiveneno	% de Inibição da Atividade Fosfolipásica A_2			
	Veneno: Antiveneno			
	1:0,5	1:1	1:2	1:4
Antibotrópico-crotálico líquido veterinário	15,53	16,03	48,34	100
Antibotrópico-crotálico liofilizado veterinário	3,01	4,96	10,48	17,95
Antibotrópico	7,63	16,08	100	100

Controle: 10 μ g do veneno / 20 μ l PBS, halo (mm)= 13mm = 100% de atividade PLA₂.

Segundo as Figuras 13, 14, 15 e Tabela 4, o antiveneno antibotrópico de uso humano apresentou melhor eficácia, pois na proporção de 1:2 inibiu 100% da atividade fosfolipásica A_2 do veneno de *Bothrops atrox*. Em relação aos antivenenos de uso veterinário, o antiveneno liofilizado apresentou menor eficácia.

5.3. Análise Imunoquímica por *Western blotting*

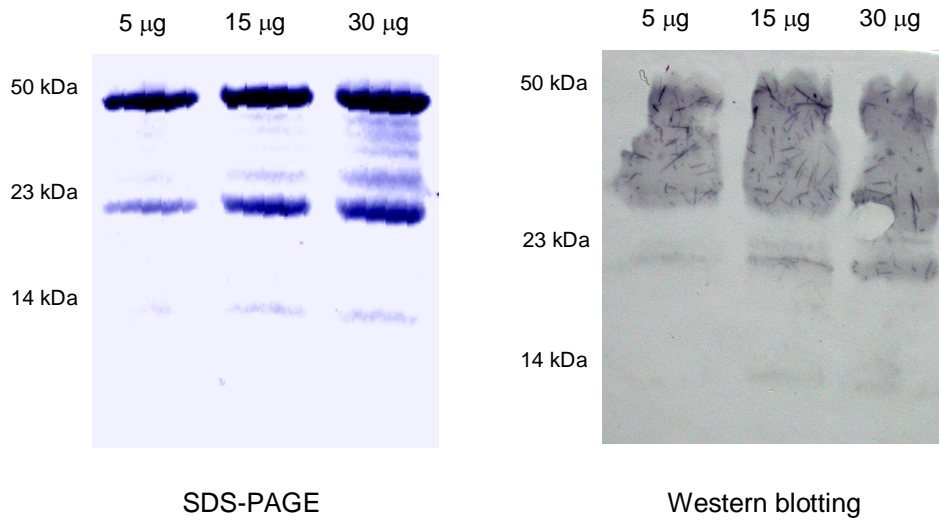


Figura 16 – Perfil imunoquímico do veneno de *Bothrops atrox*: Gel de eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno antibotrópico.

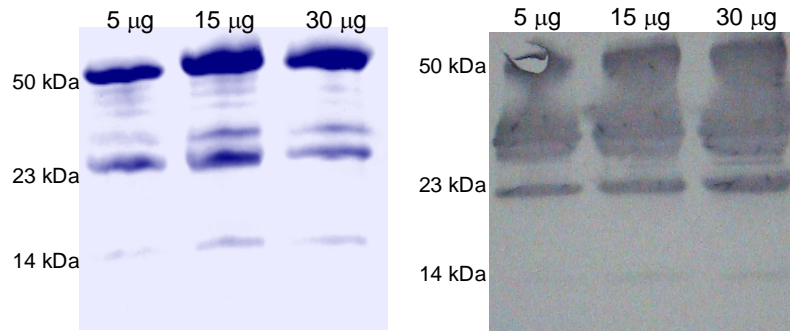


Figura 17 – Perfil imunoquímico do veneno de *Bothrops atrox*: Gel eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário.

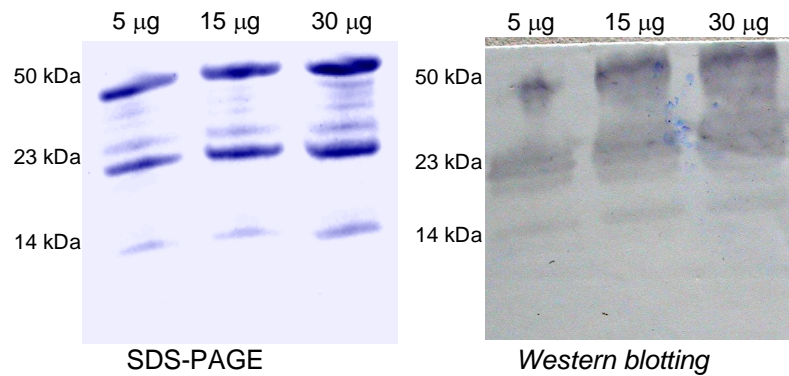


Figura 18 – Perfil imunológico do veneno de *Bothrops atrox*: Gel de eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário.

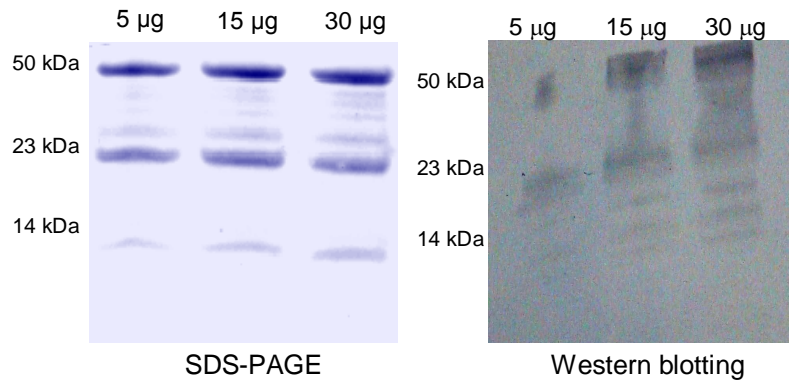


Figura 19 – Perfil imunológico do veneno de *Bothrops atrox*: Gel de eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno anticrotálico.

Segundo as figuras 16, 17, 18 e 19, os perfis imunológicos do veneno de *Bothrops atrox* obtido com os antivenenos utilizados foram semelhantes na detecção de toxinas uma massa molecular de 23 kDa, usando-se 30 µg do veneno, embora as intensidades de detecção tenham sido maiores com os antivenenos antibotrópico de uso humano e o líquido de uso veterinário. Toxinas com massas moleculares abaixo de 23 kDa foram detectadas com baixa intensidade com todos os antivenenos.

A baixa intensidade de detecção das toxinas de *Bothrops atrox* com os antivenenos crotálico de uso humano e o liofilizado de uso veterinário, sugere baixa interação antígenos-anticorpos.

5.4. Caracterização do Perfil Protéico do veneno de *Crotalus durissus ruruima* por Eletroforese Bidimensional

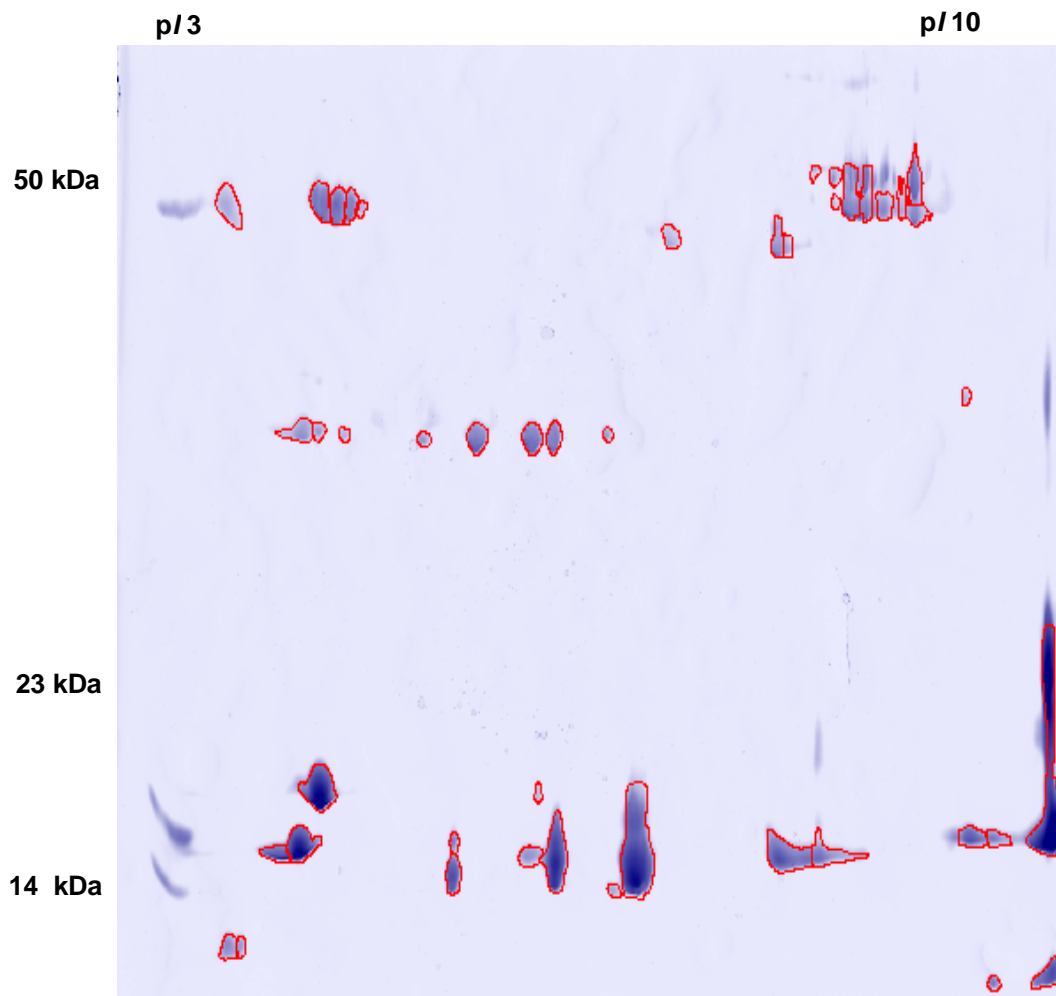


Figura 20 – Perfil eletroforético bidimensional do veneno “amarelo” de *Crotalus durissus ruruima* foram detectado 70 spots, com diferentes p/s e massas moleculares. Gel analisado no sistema *ImageMaster 2D Platinum 6.0* e corado com *Coomassie Blue R-250*.

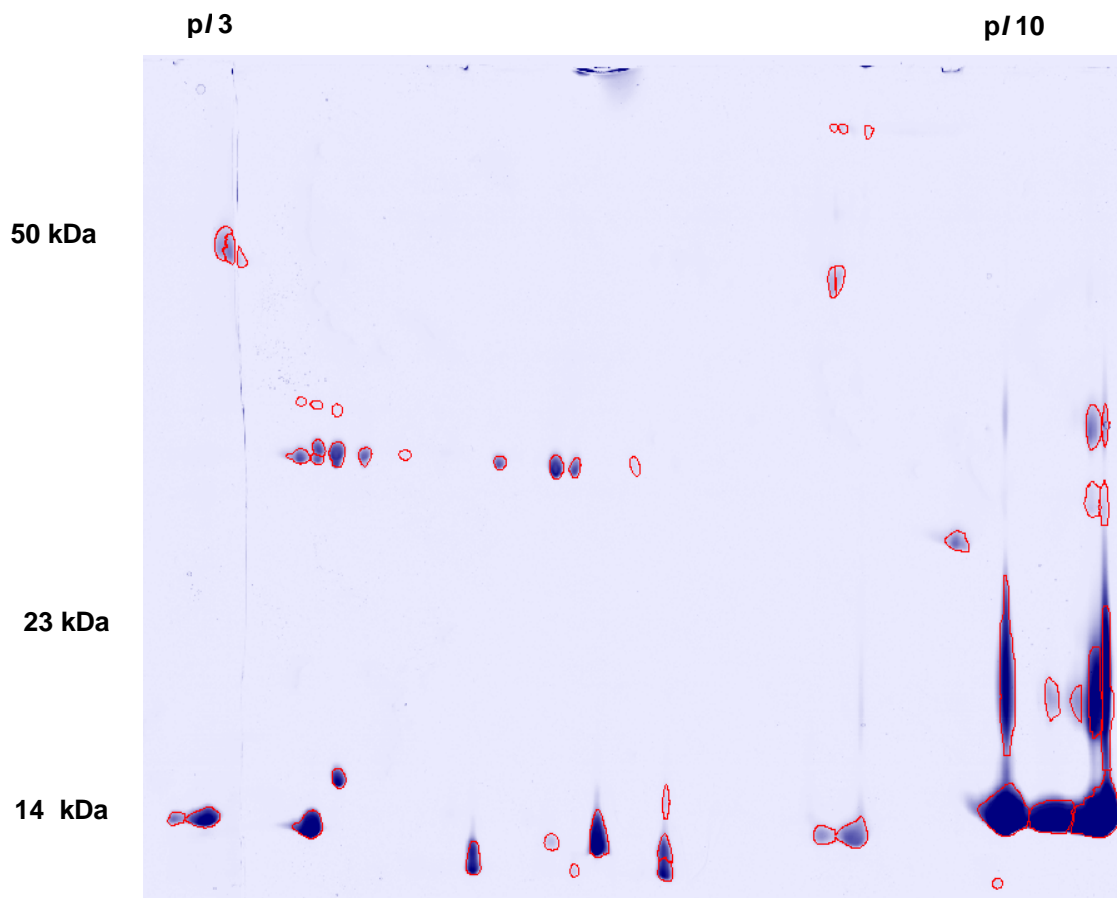


Figura 21 – Perfil eletroforético bidimensional do veneno “branco” de *Crotalus durissus ruruima* foram detectado 47 spots, com diferentes p/s e massas moleculares. Gel analisado no sistema *ImageMaster 2D Platinum 6.0* e corado com *Coomassie Blue R-250*.

No veneno “amarelo” de *Crotalus durissus ruruima* foram detectadas 70 proteínas com massas moleculares de 10-70 kDa, onde 26 foram observadas abaixo de 30 kDa e 28 proteínas com ≥ 50 acima de 50 kDa. Mais de 43 proteínas foram detectadas com p/ 7-9 e 36 proteínas com p/ de 3-6 (Figura 12).

No veneno “branco” foram detectadas 47 proteínas com pH 3-10, onde foram observadas 28 proteínas com p/ 3-6 e 19 proteínas p/ 7-9, 35 proteínas apresentaram massas moleculares abaixo de 30 kDa e apenas 4 proteínas de ≥ 50 kDa.

Proteínas com p/s 4,5-5,5 e 8-9 com massa molecular de 50 kDa foram detectadas maior intensidade somente no veneno “amarelo”, por outro lado proteínas com p/s 8 -10 com massa molecular de 14 kDa foram detectadas com mais intensidade somente no veneno “branco”. A maior intensidade sugere uma

maior quantidade das respectivas toxinas. Nesses venenos, condicionada pela expressão diferencial dos seus respectivos genes.

5.5. Neutralização das Atividades Biológicas do Veneno “amarelo” de *Crotalus durissus ruruima*

5.5.1. Neutralização da Atividade Letal – Potência Neutralizante dos Antivenenos

Tabela 5 – Neutralização do efeito letal do veneno de *Crotalus durissus ruruima* com os antivenenos.

Antivenenos	DE ₅₀ µL antiveneno/mg veneno	Potência mg veneno/µL antiveneno
Antibotrópico-crotálico líquido veterinário	761 ± 0,49	0,41
Antibotrópico-crotálico liofilizado veterinário	761 ± 0,49	0,41
Anticrotálico	84 ± 0,42	2,90

DL₅₀ = 2 µg (1,6 – 2,7), 100 µg/kg.

5 DL₅₀ = 10 µg do veneno *Crotalus durissus ruruima*

Dose desafio = 5 DL₅₀ = 10 µg/camundongo.

DE₅₀ = Antiveneno (µL) que neutraliza 50% da atividade letal do veneno (mg).

Potência dos antivenenos antibotrópico-crotálico de uso veterinário líquido ou liofilizado = 1 mg do veneno de *Crotalus durissus terrificus*/mL (segundo a bula).

Potência do antiveneno anticrotálico = 1,5 mg do veneno de *Crotalus durissus terrificus*/mL (segundo a bula).

Segundo a Tabela 5, o antiveneno anticrotálico é aproximadamente sete vezes mais potente que os antivenenos de uso veterinário na neutralização da atividade letal do veneno de *Crotalus durissus ruruima*.

5.5.2. Neutralização da Atividade Hemorrágica

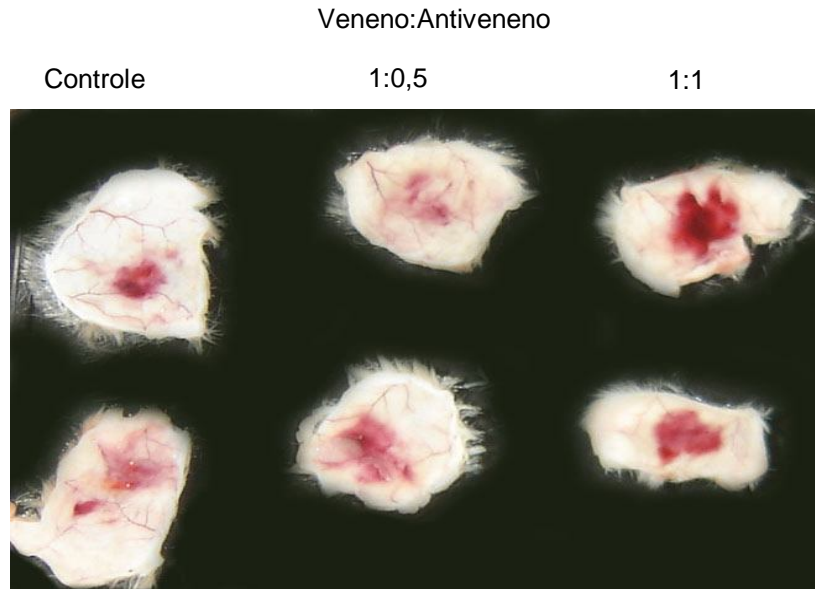


Figura 22 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Crotalus durissus ruruima* pelo antiveneno anticrotálico. Controle: 100 µg do veneno.

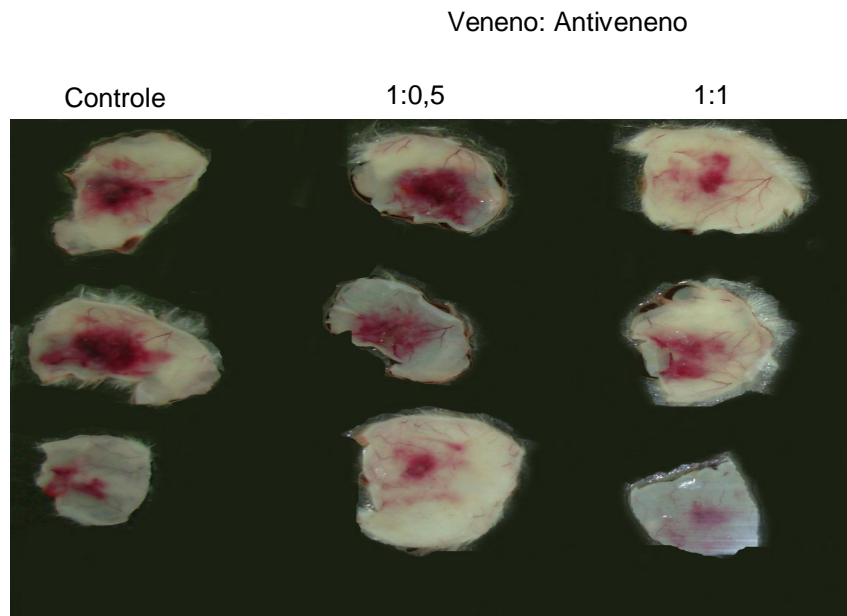


Figura 23– Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Crotalus durissus ruruima* pelo antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário. Controle: 100 µg do veneno.

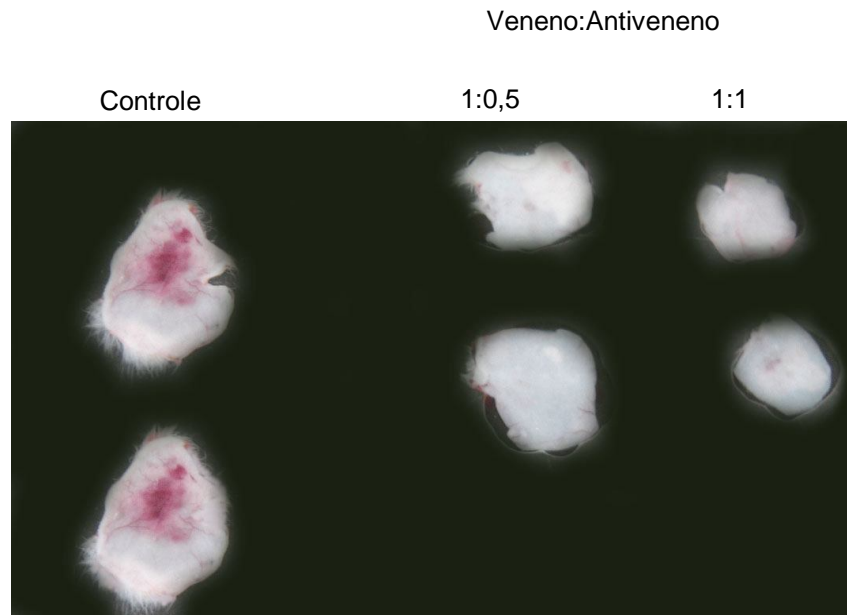


Figura 24 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Crotalus durissus ruruima* pelo antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário. Controle: 100 µg do veneno.

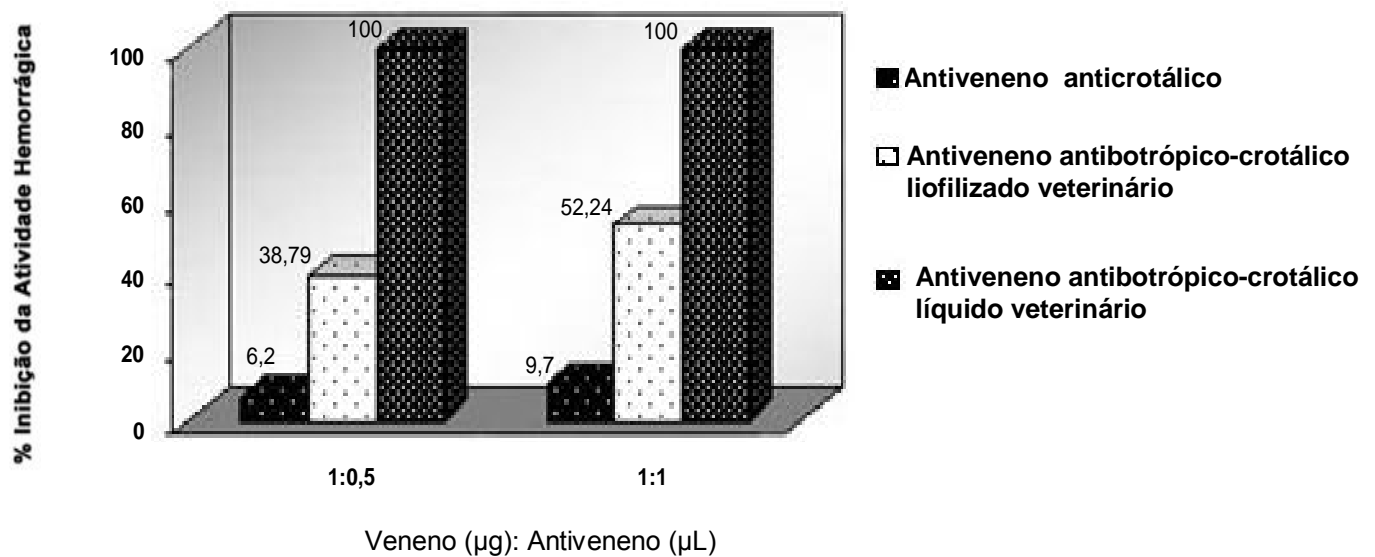


Gráfico 2 – Neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *Crotalus durissus ruruima* pelos antivenenos.

Segundo as figuras 21, 22, 23 e o gráfico 2, o antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário foi o mais eficaz na proporção de 1:0,5 quanto à neutralização da atividade hemorrágica de 2 DMH (100 µg) do veneno de *Crotalus durissus ruruima*, com inibição de 100%. Os antivenenos antibotrópico-crotálico

liofilizado de uso veterinário e o anticrotálico apresentaram baixa eficácia neutralizante da atividade hemorrágica do veneno crotálico.

5.5.3. Neutralização da Atividade Coagulante

Tabela 6 – Neutralização da atividade coagulante do fibrinogênio do veneno de *Crotalus durissus ruruima* com os antivenenos.

Antivenenos	Tempo de Início da Coagulação (seg)		
	Veneno (6µg): Antiveneno (µL)		
	1:0,5	1:1	1:2
Antibotrópico-crotálico líquido veterinário	>180	>180	>180
Antibotrópico-crotálico liofilizado veterinário	67,33	88	>180
Anticrotálico	36	>180	>180

Controle: 2DMC-F = 6 µg do veneno, início da coagulação/ fibrinogênio em 36,67 segundos.
1DMC-F= 3 µg do veneno, início da coagulação /fibrinogênio bovino em 60 segundos.

Segundo a tabela 6, o antiveneno que apresentou maior eficácia neutralizante da atividade coagulante do fibrinogênio bovino do veneno de *Crotalus durissus ruruima* foi o antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário, pois com a menor dose utilizada prolongou por mais de três vezes (> 180 seg) o tempo de início da coagulação do fibrinogênio bovino quando comparado com o controle (36,67 seg). O antiveneno liofilizado de uso veterinário foi o menos eficaz.

5.5.4. Neutralização da Atividade Fosfolipásica A₂

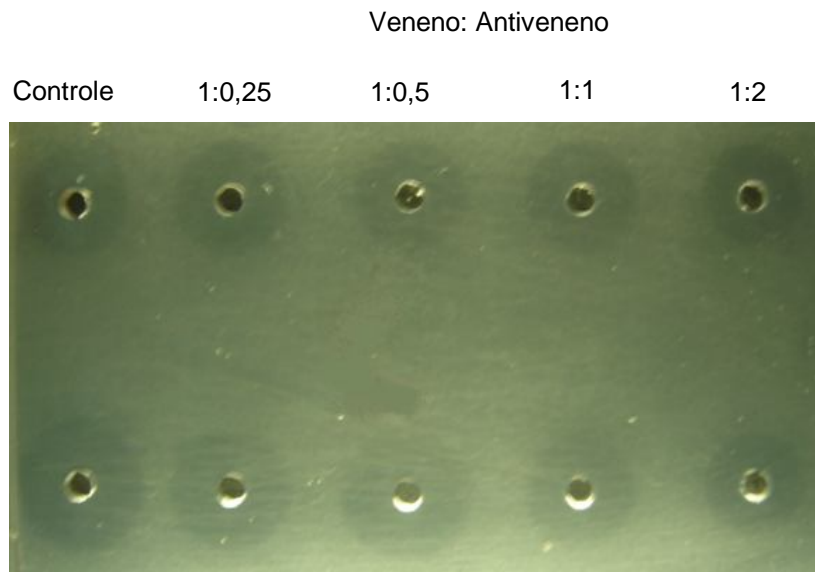


Figura 25 – Neutralização da atividade fosfolipásica A₂ do veneno de *Crotalus durissus ruruima* pelo antiveneno anticrotático: Controle 10 µg do veneno.

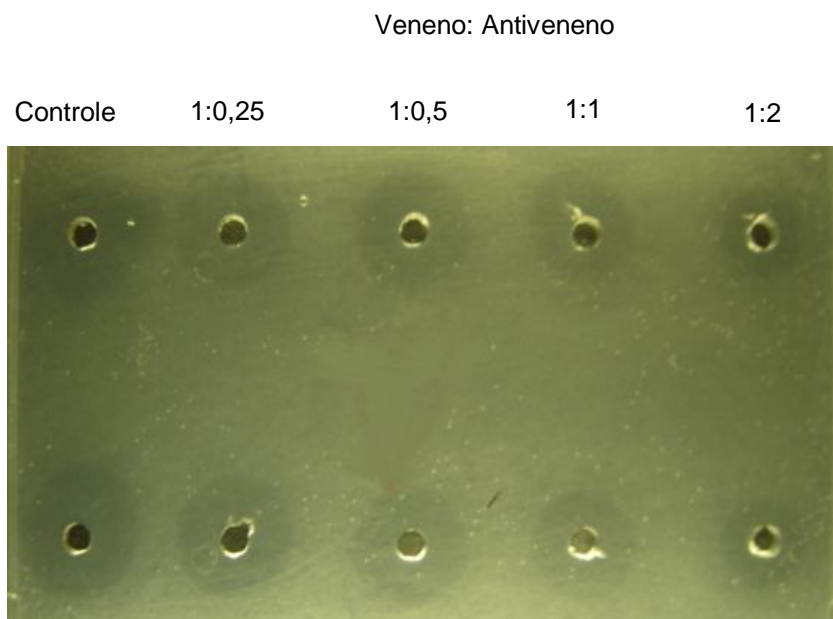


Figura 26 – Neutralização da atividade fosfolipásica A₂ do veneno de *Crotalus durissus ruruima* pelo antiveneno antibotrópico-anticrotático líquido de uso veterinário: Controle 10 µg do veneno.

Veneno: Antiveneno

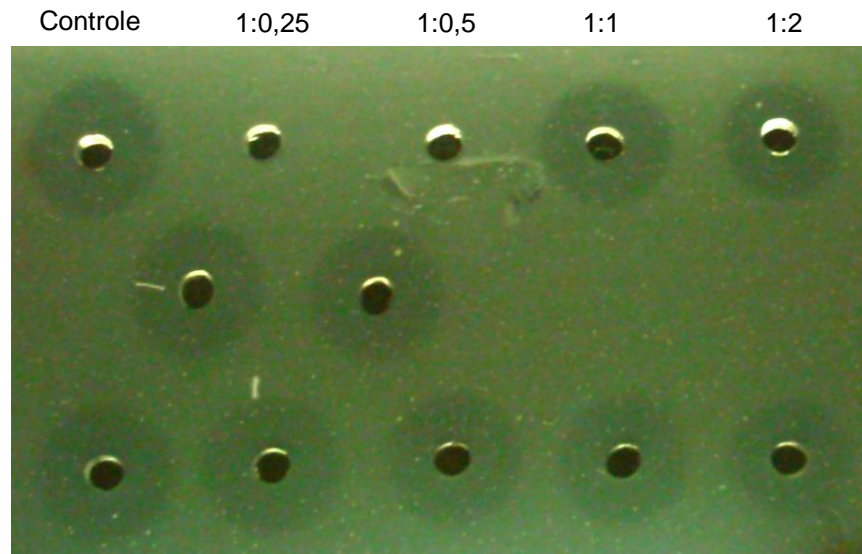


Figura 27 – Neutralização da atividade fosfolipásica A_2 do veneno de *Crotalus durissus ruruima* pelo antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário: Controle 10 μ g do veneno.

Tabela 7 – Neutralização da atividade fosfolipásica A_2 do veneno de *Crotalus durissus ruruima* com os antivenenos.

Antivenenos	% de Inibição da Atividade Fosfolipásica A_2			
	Veneno (10 μ g): Antiveneno (μ L)			
	1:0,25	1:0,5	1:1	1:2
Antibotrópico-crotálico líquido veterinário	1,57	4,7	9,38	26,37
Antibotrópico-crotálico liofilizado veterinário	0,35	4,88	6,8	17,24
Anticrotálico	6,78	9,75	22,4	29,94

Controle: 10 μ g do veneno / 20 μ l PBS = halo (mm) com média de 15,03 mm = 100% de atividade PLA_2 .

Segundo as figuras 25, 26, 27 e tabela 7, o antiveneno anticrotálico apresentou melhor eficácia neutralizante, pois na proporção de 1:2 inibiu 29,94% da atividade fosfolipásica A_2 do veneno de *Crotalus durissus ruruima*, enquanto que, os antivenenos de uso veterinário apresentaram menor eficácia neutralizante. O antiveneno liofilizado inibiu apenas 17,24% dessa atividade na proporção 1:2.

5.6. Análise Imunoquímica por Western blotting

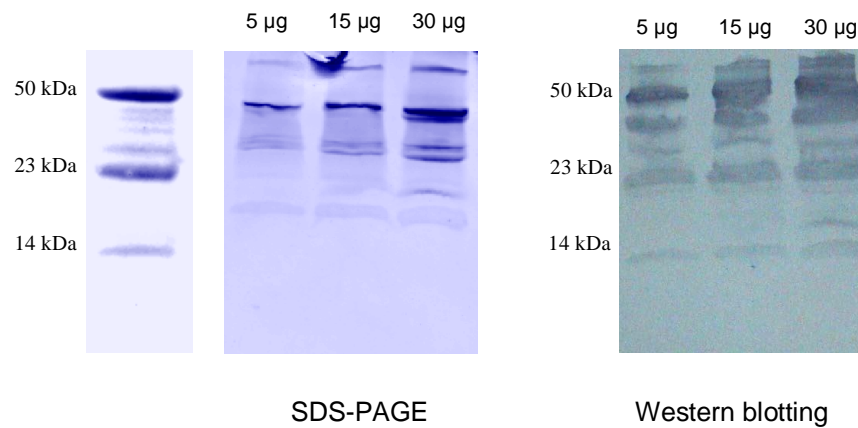


Figura 28 – Perfil imunoquímico do veneno de *Crotalus durissus ruruima*: Gel de eletroforese SDS-PAGE-Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno anticrotálico.

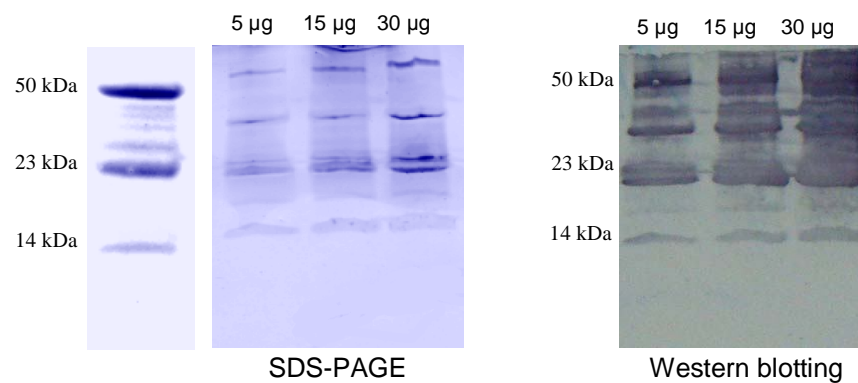


Figura 29 – Perfil imunoquímico do veneno de *Crotalus durissus ruruima*: Gel eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno antibotrópico-crotálico líquido de uso veterinário.

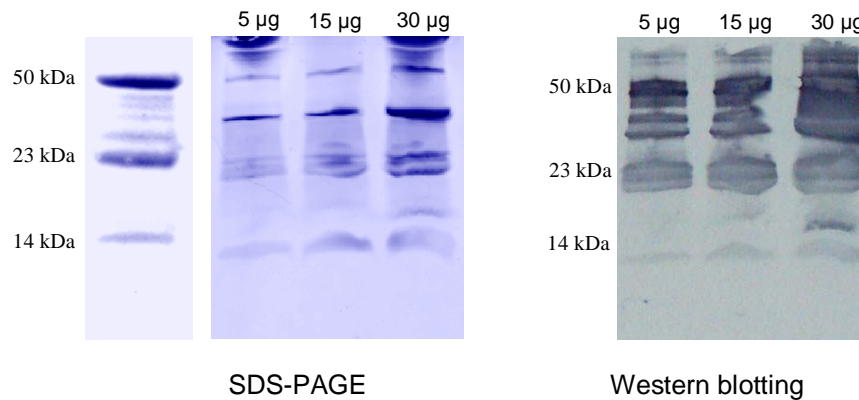


Figura 30 – Perfil imunológico do veneno de *Crotalus durissus ruruima*: Gel eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno antibotrópico-crotálico liofilizado de uso veterinário.

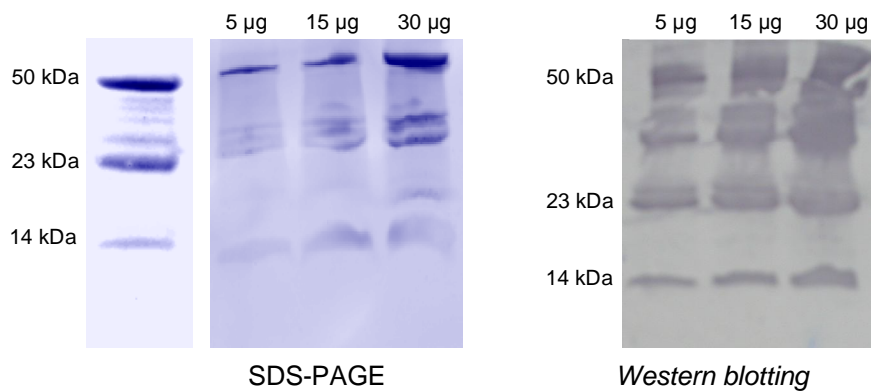


Figura 31 – Perfil imunológico do veneno de *Crotalus durissus ruruima*: Gel eletroforese SDS-PAGE Tris-Tricina e membrana de nitrocelulose após *western blotting* com o antiveneno antibotrópico.

Segundo as figuras 28, 29, 30 e 31, os perfis imunológicos do veneno “amarelo” de *Crotalus durissus ruruima* obtidos com os antivenenos utilizados foram semelhantes, mas o perfil obtido com o antiveneno crotálico, foi menos intenso, quando comparado com os outros antivenenos. Nos perfis imunológicos com os antivenenos de uso veterinário, as toxinas com massas moleculares de 14 kDa foram detectadas com menor intensidade quando comparadas com o perfil obtido com o antiveneno antibotrópico. O melhor perfil imunológico foi observado com o veneno antibotrópico. A baixa intensidade de detecção das toxinas pelos antivenenos sugere baixa interação antígeno-anticorpo.

6. DISCUSSÃO

Os venenos de serpentes são uma mistura complexa de substâncias, principalmente de peptídeos e proteínas, que apresentando diversos mecanismos de ação tanto em animais como em humanos vítimas de acidente ofídico. A variação na composição do veneno das serpentes acontece em todos os níveis taxonômicos, incluindo variações inter-famílias, inter-gêneros, inter-espécies, intra-espécies, desenvolvimento ontogenético e/ou por pressões evolutivas regionais. Essas variações podem ter grandes efeitos negativos tanto na escolha das serpentes para a obtenção do *pool* antigênico, como na produção dos soros antiofídicos para uso terapêutico (CHIPPAUX *et al.*, 1998).

Variações na composição do veneno de *Bothrops atrox* durante o seu desenvolvimento ontogenético foram previamente descritos por LÓPEZ-LOZANO *et al.* (2002) e confirmado por estudos proteômicos, usando sistemas de eletroforese bidimensional (GUERCIO *et al.*, 2006). As maiores mudanças detectadas na composição do veneno foram as variações ontogenéticas na quantidade de metaloproteases de 60, 50 e 23 kDa. O perfil 2D-eletroforético do veneno de espécimes adultos de *B. atrox* obtido neste trabalho apresenta grande semelhança com o perfil já previamente descrito, principalmente na detecção das isoformas das metaloproteases hemorrágicas de 23 e 50 kDa.

Estudos proteômicos por eletroforese bidimensional dos venenos de *B. jararaca*, *B. neuwiedi*, *B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. jararacussu*, venenos usados no *pool* antigênico para a produção do soro antiofídico antitoxinotrópico nacional para uso humano, sugerem diferenças significativas entre eles (SERRANO *et al.*, 2005) e também quando comparados com o perfil do veneno de *Bothrops atrox*, veneno que não está incluído no *pool* antigênico.

A presença de epítomos comuns nas toxinas dos venenos de serpentes pode permitir a neutralização cruzada pelas imunoglobulinas (IgG) dos antivenenos antiofídicos pela formação do complexo antígeno-anticorpo, gerando impedimento estereoquímico ou mudanças no estado conformacional na região da toxina responsável pela atividade tóxica (MANDELBAUM *et al.*, 1989).

Os venenos botrópicos apresentam diversas atividades biológicas como hemorrágica, necrosante, desfibrinogenante e coagulante, existindo significativa reação-cruzada na imunoneutralização dessas atividades por antivenenos antibotrópicos mono ou polivalentes (MANDELBAUM & ASSAKURA *et al.*, 1988; CLAUS & MEBS, 1989; MANDELBAUM *et al.*, 1989; LOMONTE *et al.*, 1990; MOURA DA SILVA *et al.*, 1990; BOGARIN *et al.*, 1999; ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2000; KYOKO *et al.*, 2002; ROJAS *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2008), o que sugere a presença de epítomos imunogênicos comuns. No entanto, podem existir também epítomos específicos para as toxinas de cada espécie.

As possíveis diferenças na estrutura-conformação dos epítomos das toxinas que induzem a produção de anticorpos neutralizantes das atividades biológicas dos venenos, que são usados para a produção do soro antibotrópico, com respeito aos epítomos das toxinas do veneno de *B. atrox* podem ajudar a explicar a menor eficácia do soro antibotrópico nacional em neutralizar as atividades biológicas do veneno dessa espécie (MUNIZ *et al.*, 2007). A potência neutralizante do antiveneno antibotrópico para a atividade letal do veneno de *B. jararaca* é de 5 mg do veneno / mL de antiveneno (bula do antiveneno antibotrópico) e para o veneno de *B. atrox* é de 3,5 mg/mL de antiveneno (MUNIZ *et al.*, 2002).

O antiveneno antibotrópico de uso humano com data de validade vencida, usado neste trabalho, apresentou potência neutralizante da atividade letal de 3,8 mg de veneno/mL de antiveneno contra o veneno de *B. atrox*, possivelmente a conservação a 8°C foi fator fundamental para preservar por um longo tempo os estados conformacionais nativos das IgG neutralizantes do antiveneno. Assim, os dados obtidos sugerem que, em caso de emergência veterinária e ante a falta do antiveneno específico para uso veterinário, o antiveneno antibotrópico para uso humano com data de validade vencida, mantido em condições ótimas de armazenamento, poderia ser usado para o tratamento de acidente ofídico em animais causado por *Bothrops atrox*, mas, sempre com a permissão do profissional veterinário responsável pela soroterapia.

Os antivenenos antibotrópico-crotálico de uso veterinário, com apresentação em estado líquido e liofilizado, apresentaram menor potência neutralizante da atividade letal (1,3 mg e 1,0 mg de veneno / mL de antiveneno, respectivamente) do veneno de *B. atrox* quando comparado com a potência do antiveneno antibotrópico.

Quando comparados todos os antivenenos, o antiveneno de uso veterinário líquido, no geral, foi mais eficaz na neutralização da letalidade e das outras atividades avaliadas (fosfolipásica A₂, desfibrinogenante, coagulante e hemorrágica) do veneno de *B. atrox* com relação ao antiveneno liofilizado, mas o antiveneno antibotrópico para uso humano foi mais eficaz que os antivenenos de uso veterinário.

Segundo as bulas dos antivenenos antibotrópico-crotálico de uso veterinário, líquido e liofilizado, ambos os antivenenos apresentam uma potência neutralizante da atividade letal de 1,5 mg do veneno de *Bothrops jararaca* / mL de antiveneno, porém os nossos resultados sugerem uma menor potência dos antivenenos de uso veterinário contra a letalidade do veneno de *B. atrox*, principalmente do antiveneno liofilizado.

Com o uso da técnica de *western blotting* foi detectada reação imunológica cruzada entre as toxinas de *Bothrops atrox* e os anticorpos IgG de todos os antivenenos avaliados. A menor intensidade de interação foi observada entre as toxinas de *B. atrox* e os anticorpos IgG do antiveneno liofilizado de uso veterinário, sugerindo uma menor quantidade de anticorpos no antiveneno liofilizado que formam complexo com as toxinas do veneno de *Bothrops atrox*, assim, apresentando uma menor potência neutralizante da letalidade.

Análises proteômicas dos venenos crotálicos de espécies norte-americanas demonstraram variação nos constituintes desses venenos (SERRANO *et al.*, 2005). Os perfis moleculares obtidos por eletroforese bidimensional dos constituintes desses venenos estudados (*Crotalus atrox*, *Crotalus horridus horridus* e *Crotalus ruber*) apresentam baixa similaridade com os perfis obtidos neste trabalho do veneno “branco” ou “amarelo” de *Crotalus durissus ruruima*.

Comparando os perfis bidimensionais dos constituintes dos venenos “amarelos” e brancos” (figuras 12 e 13), é possível observar preferencialmente grandes diferenças no número e na intensidade das toxinas com massas moleculares de 50 kDa (pI 3 a 4 e 7,5 a 8,5) e de 14 kDa (pI 8,5 a 10), predominando no veneno “amarelo” as proteínas de 50 kDa e no veneno “branco” as proteínas de 14 kDa. As proteínas de 50 kDa sugerem toxinas hemorrágicas e/ou L-amino-oxidases e as de 14 kDa toxinas PLA₂ neurotóxicas (subunidade da crotoxina).

Essas variações qualitativas / quantitativas sugerem diferentes níveis de regulação da expressão gênica dessas toxinas nas glândulas dos espécimes doadores dos venenos. A identificação, por espectrometria de massa, poderá ou não confirmar se são as toxinas aqui sugeridas.

Variações na composição e nas atividades biológicas dos venenos das espécies do gênero *Crotalus* também já foram reportadas. Uns dos exemplos mais interessantes é a da cascavel centro-americana *Crotalus durissus durissus*, já que os espécimes recém-nascidos apresentam um veneno com fortes atividades neurotóxicas e miotóxicas, similares às do veneno da subespécie brasileira *C. d. terrificus*: já os venenos de espécimes adultos dessa espécie apresentam principalmente atividades, necrosante e hemorrágica, mas sem significativa neurotoxicidade a semelhandando-se aos venenos botrópico (LOMONTE *et al.*, 1983; GUTIÉRREZ *et al.*, 1991; GUTIÉRREZ, 2002).

Também foi anteriormente descrito a variação no conteúdo da crotamina nos venenos dos espécimes de *Crotalus durissus terrificus* ao apendendo da procedência geográfica do espécime doador do veneno (JIMÉNEZ-PORRAS, 1970).

Muniz (2002), estudando o veneno de *Crotalus durissus ruruima* obtido de espécimes capturadas em diferentes áreas geográficas do Estado de Roraima, Brasil, e de espécimes nascidos em cativeiro no Centro de Ofidismo Prof. Paulo Friedrich Bührnheim, observou que os venenos de todos os espécimes estudados apresentaram atividade neurotóxica, mas além dessa atividade, em algumas

amostras também foram observadas atividade hemorrágica e da crotamina, e em outras amostras só uma das últimas atividades mencionadas.

Em casos clínicos de acidentes em humanos causados por essa espécie foi observado forte processo inflamatório e hemorragia no local da picada, processos amplamente observados nos acidentes causados pelo gênero *Bothrops*. (SOUZA, 2002).

Nos venenos de *Crotalus durissus terrificus* e de *Crotalus durissus ruruima*, a principal toxina é a crotoxina, complexo molecular heterodimérico formado por uma subunidade básica de 14 kDa, PLA₂, e uma subunidade ácida de 9 kDa, a crotapotina. A crotoxina, além de possuir potente atividade neurotóxica pré-sináptica, possui uma potente atividade miotóxica, produzindo rabdomiólise sistêmica em acidentes humanos (AMARAL *et al.*, 1988). Outra característica importante dessa neurotoxina consiste em minimizar a resposta imune do animal imunizado, seja contra ela mesma ou contra outros antígenos (AMARAL *et al.*, 1991). Dessa forma, os antivenenos contra os venenos crotálicos apresentam menor potência neutralizante quando comparados com a potência neutralizante dos antivenenos contra os venenos botrópicos.

Como os antígenos dos venenos crotálicos não apresentam toxinas hemorrágicas, o antiveneno anticrotálico para uso humano nacional não neutraliza, experimentalmente, a atividade hemorrágica do veneno de *Crotalus durissus ruruima* (MUNIZ, 2002), fenômeno comprovado neste trabalho utilizando o mesmo antiveneno com data de validade vencida, mas essa atividade foi neutralizada pelos antivenenos de uso veterinário, sugerindo que os antivenenos de uso veterinário, antibotrópico-crotálico, apresentam anticorpos IgG contra fatores hemorrágicos de venenos botrópicos que também apresentam atividade neutralizante cruzada da atividade hemorrágica produzida por fatores hemorrágicos de venenos crotálicos, processo molecular previamente observado por MANDELBAUM *et al.*, (1989).

Os venenos de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus terrificus* apresentam potente efeito neurotóxico devido à presença da crotoxina. O *pool* antigênico para a produção do antiveneno anticrotálico nacional para uso humano

está constituído pelos venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* e apresenta eficácia neutralizante do efeito neurotóxico do veneno de *C. d. ruruima*, tanto em animais de experimentação como na soroterapia em acidentes crotálicos em humanos (MUNIZ, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2007). A imunoneutralização cruzada entre os venenos crotálicos é característica comum (RICHARDSON III *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

Na bula dos antivenenos de uso veterinário, líquido e liofilizado, a potência neutralizante da atividade letal do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é de 1 mg / mL para ambos antivenenos. No caso do antiveneno anticrotálico para uso humano, também segundo a bula, a potência neutralizante da atividade letal do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é de 1,5 mg / mL de antiveneno, sendo assim 1/3 mais potente que os antivenenos de uso veterinário.

Com respeito à atividade neutralizante da atividade letal do veneno “amarelo” de *C. d. ruruima*, pelos antivenenos usados neste trabalho, podemos observar que os antivenenos de uso veterinário foram sete vezes menos potentes (0,49 mg de veneno / mL de antiveneno) que o antiveneno crotálico (2,9 mg / mL de antiveneno) na neutralização dessa atividade. Isso sugere uma baixa quantidade de anticorpos neutralizantes, principalmente da atividade neurotóxica da crotoxina nos antivenenos de uso veterinário, embora mediante *western blotting* tenha sido detectada interação antígeno-anticorpo entre as toxinas de *Crotalus durissus ruruima* e os anticorpos IgG dos antivenenos de uso veterinário.

A capacidade neutralizante do antiveneno especificada na bula não representa um valor absoluto. Há que se considerar também, que a gravidade do envenenamento, e portanto, a dose do antiveneno necessária para o tratamento dependem de variáveis como: porte da serpente que causou o acidente, região anatômica da picada, via de inoculação do veneno e do antiveneno, tempo transcorrido entre o acidente e a soroterapia (JORGE & RIBEIRO, 1997).

Em animais, o antiveneno deve ser aplicado lentamente por via intravenosa e, na impossibilidade, por via subcutânea ou intramuscular. O tamanho e o peso do animal não são considerados para o cálculo do antiveneno a ser aplicado. Assim, o

volume a ser aplicado em um bovino pode ser o mesmo a ser aplicado em um cão, dependendo da gravidade do acidente (BICUDO, 1994).

Imunoglobulinas purificadas são geralmente estáveis e preparações de imunoglobulinas por processos de liofilização, normalmente, são apropriadamente conservadas, apresentando um tempo de vida média maior que aquelas que são conservadas em meios líquidos (THEAKSTON *et al.*, 2003), o que mostra grande vantagem, onde as condições de distribuição e armazenamento não podem ser controladas, como é o caso em muitos lugares da Amazônia.

Problemas de alterações no estado conformacional nativo das IgG podem acontecer durante o processo de produção, clivagem proteolítica (obtenção de $F(ab')_2$ e/ou liofilização (THEAKSTON *et al.*, 2003), gerando IgGs sem eficácia neutralizante. A fração $F(ab')_2$ é muito mais estável e solúvel durante o processo de re-hidratação do preparado liofilizado antes de ser usado na soroterapia.

Quando comparados entre si, o antiveneno liofilizado de uso veterinário apresentou menor eficácia neutralizante das atividades biológicas dos venenos de *B. atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, sugerindo possíveis alteração na estrutura/conformação das imunoglobulinas IgG durante o processo de liofilização, diminuindo sua potência neutralizante.

Assim, os dados obtidos experimentalmente sobre a eficácia dos antivenenos de uso veterinário devem ser considerados como dados referenciais a ser confirmados ou não mediante a prática clínica no tratamento de acidentes em animais causados pelas as serpentes *B. atrox* e *C. d. ruruima*

Embora a composição dos antígenos e o processo de produção dos antivenenos, fração $F(ab')_2$, para uso humano seja conhecida (THEAKSTON *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2008), para o caso dos antivenenos de uso veterinário, utilizado neste trabalho, tanto na bula quanto em outras fontes pesquisadas, não foi encontrada essa classe de informações para a produção dos antivenenos. Essa ausência de informações dificulta muito mais a obtenção de subsídios que ajudem a explicar a baixa potência neutralizante dos antivenenos de

uso veterinário observado neste trabalho com respeito à potência neutralizante dos antivenenos para uso humano.

No Brasil, sobre o controle de qualidade do Ministério da Saúde, a produção dos antivenenos antiofídicos para uso humano corresponde a instituições públicas e, toda a produção é comprada pelo Ministério da Saúde para ser distribuído gratuitamente para todos os centros de referência em tratamento de acidentes ofídicos no país. A produção destes antivenenos acarreta um alto custo financeiro (MORAIS & MASSALDI, 2006).

A produção dos antivenenos antiofídicos de uso veterinário, no país, é realizada por empresas privadas e está regulamentada pelo Ministério da Agricultura, sendo vendido comercialmente em drogarias de produtos veterinários, mas não foram obtidas na literatura pesquisada, informações sobre o controle de qualidade desses antivenenos.

Não foram encontradas nas fontes pesquisadas, informações sobre a eficácia clínica dos antivenenos de uso veterinário no tratamento de acidentes ofídicos, produzidos por serpentes nas diversas regiões geográficas do país.

Devido à escassez de estudos clínicos, existe uma dúvida: na prática clínica os antivenenos antiofídicos de uso veterinário são realmente eficazes na neutralização das atividades biológicas dos venenos das serpentes brasileiras? (BICUDO, 1994). Assim, faz-se necessário obter informações ao respeito para confirmar ou não a eficácia desses antivenenos e gerar subsídios com o intuito de aprimorar a eficácia / produção dos antivenenos antiofídicos para uso veterinário.

7. CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos, podemos concluir:

1. O perfil molecular do veneno de *Bothrops atrox*, obtido por eletroforese bidimensional, apresenta similar complexidade quando comparado com outros publicados, principalmente com relação às metaloproteinases hemorrágicas de 23 e 50 kDa.
2. O perfil molecular dos venenos “branco” e “amarelo” de *Crotalus durissus ruruima*, obtido por eletroforese bidimensional, sugere nas glândulas produtoras do veneno dos espécimes doadores analisados, uma expressão diferencial nos genes que codificam as toxinas de 50 kDa e das toxinas básicas de 14 kDa.
3. Experimentalmente, a potência neutralizante (mg de veneno / mL de antiveneno) do antiveneno antibotrópico – anticrotálico de uso veterinário líquido (1,39 mg) indica uma eficácia neutralizante da atividade letal do veneno de *Bothrops atrox* próxima à eficácia sobre o veneno de *Bothrops jararaca* (1,5 mg), mas a potência do antiveneno liofilizado (1,06 mg) sugere um antiveneno menos eficaz na neutralização da atividade letal do veneno de *Bothrops atrox*.
4. Experimentalmente, a potência neutralizante (0,41 mg de veneno / mL de antiveneno) dos antivenenos antibotrópico – anticrotálico de uso veterinário, líquido e liofilizado, indica uma baixa eficácia neutralizante da atividade letal do veneno de *Crotalus durissus ruruima*, quando comparada com a eficácia sobre a atividade letal (1 mg) do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
5. No geral, o antiveneno antibotrópico-crotálico de uso veterinário liofilizado foi o menos eficaz na neutralização das atividades biológicas dos venenos de *Bothrops atrox* ou de *Crotalus durissus ruruima*.

6. Os antivenenos antibotrópico e anticrotálico para uso em humanos, com data de validade vencida, foram mais eficazes que os antivenenos de uso veterinário na neutralização das atividades biológicas dos venenos estudados.

7. A obtenção de dados clínicos sobre a eficácia dos antivenenos de uso veterinário na neutralização das atividades biológicas dos venenos de serpentes amazônicas podem ou não confirmar os resultados experimentais obtidos neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAME, B. L.; SOTO, J. G.; SECRAW, D. J.; PEREZ, J. C.; GLENN, J. L.; STRAIGHT, R.C. Regional variation of biochemical characteristics and antigenicity in great basin rattlesnake (*Crotalus viridis lutosus*) venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 97b: pp. 95-101, 1990.

ALVES, E. Accidentes produzidos por animales venenosos. In: **Medicina de urgência**. Madrid: Ed. Cabral, 900-914, 1958.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; PEDROSA, T.M.G., DA SILVA, O.A.; PEDROSO, E.R.P. Afibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, 30: pp. 288-292, 1988.

AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; REZENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, 33: pp. 251-255, 1991.

ANDERSON, S.G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OWBNY, C.L. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten central American snake venoms. *Toxicon*, 31: pp. 1051-1059, 1993.

ARAÚJO H.P., BOURGUIGNON S. C., BOLLER M. A. A., DIAS A. A. S. O., LUCAS E. P. R., SANTOS I. C., DELGADO I. F. Potency evaluation of antivenoms in Brazil: the national control laboratory experience between 2000 and 2006. *Toxicon* 51: 502-504, 2008.

ARAÚJO, P.; ROSENFELD, G.; BELLUOMINI, H. E. Toxicidade de venenos ofídicos. II. Doses mortais para bovinos. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 30: 43-48, 1963.

ARAÚJO, P.; BELLUOMINI, H. E. Toxicidade de venenos ofídicos. I. Sensibilidade específica de animais domésticos e de laboratório. *Memórias do Instituto Butantan, São Paulo*, 30:143-156, 1960/62.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERNG, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), envenenamento in Brazil, *Toxicon*, 23: 631-636, 1985.

BELLUOMINI, H.E.; ARAÚJO, P.; ROSENFELD, G.; PENHA, A.M. Beitrag zur Serumtherapie bei experimenteller Vergiftung Von Rindern MIT dem Gofit der Klapperchlange. *Dtsch. Tierarztf. Wschr.* v.90. pp. 81-20, 1983.

BICUDO, P.L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In: Barravieira B. *Venenos Animais , uma visão Integrada*. EPUC. Rio de Janeiro, pp. 375-387, 1994.

BICUDO, P. L. & BIONDA, A.W. Acidentes ofídicos atendidos no Hospital Veterinária da FMVZ, Unesp-Botucatu, SP, período de 1972-1989, estudo retrospectivo (não publicado), (cit. Bicudo, 1994).

BICUDO P. L. Acidentes ofídicos em medicina veterinária. In BARRAVIEIRA. **Venenos Animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro, pp. 375-387, 1989.

BIONDA, A.W.; BICUDO, P.L.; KOHAYAGAWA A. Acidentes ofídicos em medicina veterinária – revista de 1.260 notificações do Instituto Butantan. 18ª Jornada Científica da Associação de Docentes. Botucatu: Unesp, 1993.

BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A. Enfermedades causadas por mordeduras y picaduras de algunos animals: mordeduras de serpientes. In: **Medicina Veterinária**. 2. ed. México: Interamericana, pp. 943-945, 1963.

BOLAÑOS, R. **Serpientes, Venenos y Ofidismo em Centro América**, San José. Ed. Universitária de Costa Rica. pp. 210 1984.

BOGARIN G., ROMERO M., ROJAS C. L., CASADAMONT J. L., OTERO R., GUTIÉRREZ J. M. Neutralization by monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom of toxic activities induced by homologous and heterologus *Bothrops* snake venoms *Toxicon* 37: pp. 551-557, 1999.

BOCHNER, R; STRUCHINER, C. J. *Epidemiologia dos acidentes Ofídicos nos Últimos 100 Anos no Brasil*: Uma Revisão. *Cad. Saúde*, Rio de Janeiro, 19(1): pp. 7-16, 2003.

BOGARIN G., ROMERO M., ROJAS C. L., CASADAMONT J. L., OTERO R., GUTIÉRREZ J. M. Neutralization by monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom of toxic activities induced by homologous and heterologus *Bothrops* snake venoms *Toxicon* 37: pp. 551-557, 1999.

BORGES, C. C.; SADAHIRO, M. & SANTOS, M. C. *Aspectos Epidemiológicos e Clínicos dos Acidentes Ofídicos Ocorridos nos Municípios do Estado do Amazonas*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: pp. 637-646. 1999.

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: MS/FUNASA. 1998b.

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. pp. 131 1999.

BRASIL, Centro de Vigilância Epidemiológica . Incidência dos acidentespor serpentes peçonhentas por D.I.R. de ocorrência –1998 – no Estado de São Paulo. Disponível em : http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo /map_serin.htm. Acesso em 22 nov. 2005.

CAMEY K. U., VELARDE D. T., SANCHEZ E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon* 40: pp. 501-509, 2002.

CARDOSO, D.F., YAMAGUCHI, I.K., SILVA, A.M.M. Produção de Soros Antitoxinas e Perspectivas de Modernização por Técnicas de Biologia Molecular, In: Cardoso, J.L.C; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Jr. V.H. *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica do acidentes*, In: Cardoso, J.L.C; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Jr. V.H. **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica do acidentes**, pp. 367- 379, 2003.

CARDOSO, D.F. & MOTA, I. Effect of Crotalus venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, 35: pp. 607-612, 1997.

CARDOSO, J. L. *Ofidismo. Aracneísmo. Escorpionismo*. Epidemiologia. Patogenia e Clínica. Diagnóstico e Terapêutica. In: SOERENSEN, B. (ed.). **Animais Peçonhentos. Reconhecimento. Distribuição Geográfica. Produção de Soros. Clínica e Tratamento dos Envenenamentos**. Atheneu, Rio de Janeiro. pp. 109-138, 1990.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Comstock. pp. 425. 1989.

CLAUS AND D. MEBS. Cross-neutralizations of thrombin-like enzymes in snake venoms by polyvalent antivenoms. *Toxicon* 27: 1397-1399, 1989.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29: pp. 279-303, 1991.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, Antivenoms, immunotherapy. *Toxicon*, 36: pp. 823-846, 1998.

CHNER, R.; STRUCHINER, C.J. *Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão*. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 19: pp. 7-16, . 2003.

DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; I.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; MORAIS, J.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. Cross reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bthrops* species. *Mem Inst. Butantan*, 51: pp. 153-168, 1989.

DOS SANTOS, M.C. Caracterização bioquímica e das atividades biológicas dos venenos, variedades "amarela" e "branca" de *Crotalus durissus ruruima* (Hoge, 1965). Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Imunologia na Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

ESTEVIÃO-COSTA M. I., MARTINS M. S., SÁNCHEZ E. F., DINIZ C. R., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C. Neutralization of the haemorrhagic activity of *Bothrops* and *Lachesis* snake venom by a monoclonal antibody against mutalysin-II. *Toxicon* 38: pp. 139-144, 2000.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FRANÇA, F.O. S. & FAN, H.W. Acidente botrópico. In: Schvartsman, S. **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**. Ed. Sarvier, São Paulo. pp. 149-160, 1992

FRANÇA, F.O.S. & MÁLAQUE, C.M.S.; CARDOSO, J.L.; WEN, F.H.; HADDAD, V.JR. Acidente botrópico p. 72-86. In: **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo, pp. 468 2003.

GENÉ, J.A; ROY,A; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27: pp. 841-848, 1989.

GIORGI, R.; BERNARDE, M.M.; CURY, Y. Analgesic effect evoke by low molecular weight substonce extracted from *Crotalus durissus terrificus*, *toxicon*, 31: pp. 1257-1265, 1993.

GLENN, J. L. & STRAIGHT, R. C. Intergradation of two different venom populations of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Toxicon*, 27: pp. 411-418, 1989.

GLENN, J. L. & STRAIGHT, R. C.; WOLT, T.B. Regional variation in the presence of canebrake toxin in *Crotalus horridus* venom. *Comp. Biochem. Physiol.* 3: pp. 337-346, 1994.

GRUNERT, E., GRUNERT, D. Observaciones de lesiones por mordedura de serpentes Bothrops em los bovinos y caballos em Rio Grande do Sul/Brasil. *Not. Méd. Vet.* V. 3, pp. 213-227. 1969.

GUÉRCIO, R.A.P, SHEVCHENKO, A., SHEVCHENKO, A., LÓPEZ-LOZANO, J. L., PABA, J., SOUSA, M.V., RICART, C.A.O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science*, 4 (11): pp. 1-14, 2006.

GUTIÉRREZ J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G.; And CERDAS, L. Neutralization of. Proteolytic and hemohragic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23: pp. 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ J. M., DOS SANTOS M. C., FURTADO M. F. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus rattlesnakes*. *Toxicon* 29: pp. 1273-1277, 1991.

GUTIÉRREZ J. M., AND LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, : pp. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones em América Latina. *Revista de Biología Tropical* : pp. 377-394, 2002.

GUTIÉRREZ J. M., HIGASHI H. G., WEN F. H., BURNOUF T. Strengthening antivenom production in Central and South América public laboratories: report a worshop. *Toxicon* : pp. 30-35, 2007.

HEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. Development of simple standart assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull, W.H.O.,: pp. 949-956, 1983.

HOGUE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Memórias do Instituto Butantan, 42/43: pp. 373-396, 1978/79.

KAMIGUTI, A.S.; CARDOSO, J.L.C. Hemostatic changes caused by the venoms south American snakes. Toxicon,: pp. 955-963, 1989.

KYOKO, U.C.; VELARDE, D.T.; SANCHEZ, E.F. Pharmacological Characterization and Neutralization of the Venoms used in the Production de Bothropic Antivenom in Brasil.Toxicon : 40. 501-509, 2002.

JIMÉNEZ-PORRAS J. M. Biochemistry of snake venoms (a review). Clinical Toxicology 3: pp. 389-431, 1970.

JORGE M. T., RIBEIRO L. A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. Revista Associação Médica Brasileira 43: pp. 74-76, 1997.

LAGO, L.A. ; JUNIOR, A.P.M.; MELO, M.M.; LAGO, E.P.; OLIVEIRA, N.J.F.; FILHO, F.A.Perfil bioquímico de bovinos inoculados experimentalmente com veneno crotálico iodado livre e iodado incorporado em liposomas. Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec., . 56, 653, 2004.

LINDIONEZA, A.R.; JORGE, M.T.; IVERSSON, L.B. Epidemiologia do Acidente por Serpente Peçonhentas: estudo de casos atendidos em 1988. Rev. Saúde Pública 29 (5), 1995.

LOMONTE, B.; J.M. GUTIERREZ; E. CARMONO & M.E.ROVIRA. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox*, snake venoms. Toxicon, 28: pp. 1137 - 1146, 1990.

LOMONTE B., GUTIÉRREZ J. M., FURTADO M. F., OTERO R., ROSSO, J. P., VARGAS O., CARMONA E., ROVIRA M. E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. Toxicon 28: pp. 1137-1146, 1990.

LOMONTE B., GENÉ J. A., GUTIÉRREZ J. M., CERDAS L. Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de exemplares adultos e recién nacidos. Toxicon 21: pp. 379-384, 1983.

LÓPEZ-LOZANO JL, SOUSA MV, RICART CAO, CHÁVES-OLORTEGUI C, SANCHEZ EF, MUNIZ EG, BÜHRNHEIM PF, MORHY L: Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. Toxicon, 40: pp. 997-1006, 2002.

LÓPEZ-LOZANO, J.L., MUNIZ, E.G., BUHRHEIMM P.F. Intrasubspecific variations in the biological properties of venoms of rattlesnakes (*Crotalus durissus ruruima*) from Roraima State, Brazil. Resumons do IV Simpósio da SBTx, pp. 134-135, 1996.

MANDELBAUM F., ASSAKURA, M. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes . *Toxicon* 26: pp. 379-385, 1988.

MANDELBAUM F., SERRANO M. T., SAKURADA J. K., RANGEL H. A., ASSAKURA M. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the crotalinae and viperinae subfamilies. *Toxicon* 27: pp. 169-177, 1989.

MARTINS, I.S.S. SANTORO, M.L. Distúrbios Hemostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil. In:Cardoso, J.L.C; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Jr. V.H. **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica do acidentes**, Sarvier, São Paulo. pp. 367- 379, 2003.

MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. Crossreactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan*, 51: pp. 153-168, 1989.

MEBS, D. Toxicity in animals. Trends ins evolution? *Toxicon*, 38:87-96, 2001.

MORAIS V.; MASSALDI H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 12: pp. 497-511, 2006.

Melgarejo, A.R.. Serpentes Peçonhentas no Brasil in, Cardoso, J.L.França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad, Jr.V.(eds): **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier São Paulo, pp 289-309, 2003.

MEBS, D. AND KORNALIK, F. Studies on the cross-reactivity of snake venom antisera. *Mem. Inst. Butantan*, 51: pp. 127-132, 1989.

MINTON, S.A. AND WEINSTEIN, S.A. Geografic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon*, 24: pp. 71-80,1986.

MORAIS V., MASSALDI H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. trop.Dis.* 12: pp. 497-511, 2006.

MOURA DA SILVA A. M., D'IMPERIO LIMA M. R., NISHIKAWA A. K., BRODSKYN C. I., DOS SANTOS M. C., FURTADO M. F. D., DIAS DA SILVA W., MOTA I. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. *Toxicon* 28: pp. 181-188, 1990.

MUNIZ, E.G.; NORONHA, M.D.N.; SILVA-HAAD, J.; LOPEZ-LOZANO, J.L., Biological Characterization of *Bothrops atrox* venom and serum neutralization of its toxic activities, no prelo, 2007.

MUNIZ, E. G. Veneno de *Crotalus durissus ruruima*-Propriedades moleculares, farmacológicas e imunológicas. Dissertação de Mestrado, UFAM, 2002.

NASCIMENTO, S.P. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima Brasil, entre 1992-1998. *Caderno de Saúde Pública*, 16: pp. 271-276, 2000.

NASCIMENTO, S.P.; NORONHA, M.D.N.; MUNIZ, E.G.; LÓPEZ-LOZANO, J.J.; ALVES-GOMES, J.A. Características Epidemiológica e Clínica dos acidentes por Serpentes peçonhentas no Estado de Roraima, Brasil. Mens Agitat, Volume II, número 2: pp.43-54, 2007.

NORONHA, M.D.N., Muniz, E.G. & Lozano-Lopez, J.L. Epidemiologia dos acidentes ofídicos atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, de janeiro de 1995 a julho de 2003. Rev. Soc. Brás. Méd. Trop. (Supl. I): pp. 125, 2004.

NORONHA, M.D.N.N, Epidemiologia dos Acidentes por Serpentes Peçonhentos no Município de Manaus-Am, Monografia - Escola Superior Batista do Amazonas-Brasil/2005.

NUÑIS, R.O.; GUTIERREZ, J.M.; ROBLES, A.; ESTRADA, R.; OSORIO, G.DEL-VALE.; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, C. A.; PARRISH, H. M. The nature of poisonous snakebites: epidemiology, diagnosis and treatment. Vet. Med.:pp. 197-203, 1958.

OWNBY, C.L. AND GEREN, C.R. Pathogenesis of hemorrhage induced by hemorrhagic proteinase IV from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. Toxicon. 25: pp. 517-526, 1987.

PARRISH, H.M.; SCATTERDAY, J.R.; POLLARD, C.B. The clinical management of snake venom poisoning in domestic animals, Journal of the America Medical Association, 130: 548-551, 1957.

RAEL, E.D.; LIEB, C.S.; MADDUX, N.; VARELA-RAMIREZ, A.; PEREZ, J. Hemorrhagic and mojave toxins in the venoms of the offspring of two Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*). Comp. Biochem. Physiol. 3: pp. 595-600, 1993.

RAPOSO, J.B.; MENDEZ, M.C.; BAIALARDI, C.E.G.; RAFFI, M.B. *Acidente Ofídico em Bovino no Sul do Brasil* – Relatório de Caso, rev. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguaiana, 7- 8: 5 - 8, 2000/2001.

REZENDE, N.A.; TORRES, E.M.; DIAS, M.B.; CAMPOLINA, D.; CHAVES-OLORTEGUI, C. & AMARAL, C.E.S. South American rattlesnake bite (*Crotalus durissus SP*) without envenoming insight on dignosis and treatment. Toxicon. 36: pp. 2029-2032, 1998.

RICHARDSON III W. H., TANEN D. A., TONG T. C., BETTEN D. P., CARSTAIRS S. D., WILLIAMS S. R., CANTRELL F. L, CLARK R. F. Crotalidae polyvalent immune fab (ovine) antivenom is effective in the neutralization of South American Viperidae venoms in a murine model. Annals of Emergency Medicine 45: pp. 595-601, 2005.

RODRIGUEZ J. P., DE MARZI M., MARUÑAK S., MALCHIODI E. L., LEIVA L. C., ACOSTA O. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. Medicina 66: pp. 512-516, 2006.

ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; GÓMEZ, M.; CERDAS, L. *Neutralization de lãs actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido em Costa Rica.* rev. Biol. Trop. 35: pp. 59-67, 1987.

ROJAS E.; QUESADA, L.; ARCE V.; LOMONTE, ROJAS G.; GUTIÉRREZ J. M. Neutralization of four peruvian Bothrops SP snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* 93: pp. 85-95, 2005.

ROSANY, B., STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 19: 7-16, Já.Fev. 2003.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: W. Bucherl and Buckley. Ed. *Venomous animais and their venoms*. Vol. II. *Venomous Vertebrates*. Academic Press, New, pp. 345-383, 1971.

RUSSELL, F.E. Snake venom poisoning in the United State of América, In: Bon, C.; goyffon, M. (Eds.), **Envenomings and their treatments**. Foundation Marcel Merieux, lyon, pp. 235-245, 1996.

SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA,; M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subespécies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collineatus*). *Comp.Bioch. And Phisiol. Part C* 122: pp. 61-73, 1999.

SERRANO, S.M.T.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology VS. Substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45: pp. 1115-1132, 2005.

SILVA-HAAD, J.J. Las serpientes del gênero *Bothrops* em la amazônia colombiana.. Aspectos biomédicos (epidemiologia, clínica y biología del ofidismo). *Act. Méd. Colomb.* 14: pp. 148-165, 1989.

SILES-VILLAROEL, M.; ZELANTE, F.; FURLANETR, F.; FURLANETTO, R.C.; ROLIM-ROSA, R. Contribuição ao estudo imunológico de venenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan*, 38: pp. 13-30, 1974.

SMITH, H.A.; JONES, T.C. Enfermidades producidas por venenos extrños. In: *Veterinária*. 2. Tenha Ed. México: pp. 585, 1962.

SOUZA, A R. Acidentes por *Bothrops atrox* no Estado do Amazonas: estudo de 212 casos com identificação de serpente. MsC Dissertação Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil. pp. 94, 2002.

THEAKSTON R. D. G., WARRELL D. A.; GRIFFITHS E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41: pp. 544-557, 2003.

THEAKSTON, R.D. The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*: 21: 341-52, 1983.

THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A. The development of simple standard assay procedure for the charaction of snake venoms bull. *Who*. 61, pp-949-956, 1983.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras*. 26: 55-68, 2006.

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 391:37-62, 1996.

VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxins from the South American rattlesnaks venom. *J. Formosan Med. Assoc.*, 71: 394-400, 1972.

WEN, F.H., Soroterapia, In: Cardoso, J.L.C; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Jr. V.H. **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica do acidentes**, Samoier, São Paulo, p. 380-393, 2003.

WARRELL, DA. Geographical intraspecies variation in the clinical manifestation of envenoming by snakes. In: Thorpe RS, Wuster W, Malhorta A, editors. *Venomous snakes: ecology, evolution and snake bites*. Oxyford: Claredon Press, p. 189-204, 1997.

WÜSTER, AND MCMARTHY, W.; WÜSTER, AND C.J. MCCARTHY. *Venomous snake systematic: implications for snake bite treamente and toxinology* IN: C. Bon and M. Goyffon, edifors. *Envenoming and their treatments* lyon: foundation mercel mérieux, France, pp. 13-23, 1996.

[http://www.unac.org.br/envenenamento % 20 botropico % em % 20 bovinos.pdf](http://www.unac.org.br/envenenamento%20botropico%20em%20bovinos.pdf). NOVAES, A.P.; LUCAS, S.; ABE, A.S.; FERNANDES, W.; PUORTO,G.; ALMEIDA, I.L. *Envenenamento Botrópico em Bovinos: Tratamento Opicional*, julho, 2007.

<http://www.bichoonlene.com.br/artigos/ps0002.htm>. julho/2007. *Acidente ofídicos em veterinária: por pecuária de corte* 1996.