



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ELLYNES AMANCIO CORREIA NUNES

**ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DE COMPONENTES DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops erythromelas***

**CAMPINA GRANDE – PB
2016**

ELLYNES AMANCIO CORREIA NUNES

**ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DE COMPONENTES DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops erythromelas***

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna.

**CAMPINA GRANDE
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

N972e Nunes, Ellynes Amancio Correia.

Estudo da neutralização dos componentes do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* [manuscrito] / Ellynes Amancio Correia Nunes. - 2016.

45 p. : il. color.

Digitado.

Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Veneno botrópico. 2. Ofidismo. 3. Soroterapia. 4. Envenenamento. I. Título.

21. ed. CDD 615.942

ELLYNES AMANCIO CORREIA NUNES

ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DE COMPONENTES DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops erythromelas*

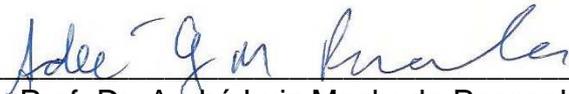
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado
em Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 18/ 05 / 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna(Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. André Luiz Machado Pessanha
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Daniela Priscila Marchi-Salvador
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Aos meu pais, pela dedicação, companheirismo,
amizade e confiança, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu o dom da vida e a capacidade de com ela conquistar os meus objetivos por meio de sua misericórdia e graça, ao meu Senhor Jesus Cristo pelo seu sacrifício, que me permitiu estar aqui hoje conquistando mais esta etapa, agradeço também ao Espírito Santo, por fazer morada em mim e por me ensinar o caminho que devo seguir.

Agradeço a minha mãe Maria do Socorro Correia Nunes Amancio, por ter sacrificado a sua juventude e os seus sonhos para que eu e meus irmãos pudéssemos crescer e conquistar nossos objetivos de vida, mesmo passando por dificuldades e problemas, sempre se mostrou disposta a nos apoiar e incentivar na vida, ajudando em cada escolha que fiz até aqui. Agradeço também a meu pai Edberto Amancio da Silva, por acreditar em mim e me incentivar a não ser só uma graduada mas conquistar também mestrado e doutorado. Amo vocês.

Agradeço aos meus três irmãos, Elly, Elly-Berto e Ellydberto, por também me apoiarem e acreditarem em mim, também os amo.

Agradeço a meus avôs maternos, Josino Nunes da Silva (In memória) e Gilvanira Correia Nunes, por estarem presentes na minha vida, e especialmente a minha avó que me ensinou muito com seus testemunhos de vida, e sempre esteve pronta a ouvir e rir das minhas aventuras. Ao meu avô, eternas saudades, sempre o trago comigo no coração. Amo vocês.

As minhas tias maternas, especialmente Gilvany Correia Nunes Montenegro com seu esposo, meu tio de coração Dênis Ramalho Montenegro, que no momento das minhas dificuldades sempre se dispuseram a me ajudar. Obrigada, também amo vocês.

Aos meus primos maternos, especialmente Talita Nunes Cardoso, que me incentivou a entrar na vida acadêmica e me ajudou muito nesta caminhada. Obrigada, amo-os.

Agradeço a professora Karla Patrícia de Oliveira Luna, por me orientar neste trabalho, pelo tempo, pela paciência e por todo conhecimento compartilhado comigo, obrigada.

Ao professor Abraão Ribeiro, por me proporcionar conhecer um pouco mais da área, e por também me devotar tempo e paciência, compartilhando comigo seus

conhecimentos, e por me direcionar a minha então orientadora, Karla Luna. Obrigada.

A minha companheira de laboratório e amiga da vida, Fleuriane Dantas Lira, que dedicou o seu tempo em me auxiliar nos experimentos e compartilhou comigo conhecimento, companheirismo e amizade. Obrigada.

Aos meus amigos que me deram seu total apoio no decorrer destes quatro anos e suas amizades não só dentro da Universidade como nos encontros da vida, Rayane Souza Teodomiro, Raisal Nóbrega Araújo, Diele Emele Pontes, Rayane Diniz e Marcos Júnior. Obrigada.

Aos demais integrantes do LPTA, pelas muitas discussões nos grupos de estudo, com vocês também adquiri conhecimentos. Obrigada.

“Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares. Josué 1:9.”

Sumário

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. DESENVOLVIMENTO | 18 |
| 2.1 Metodologia | 18 |
| 2.1.1 Pacientes..... | 18 |
| 2.1.2 Considerações Éticas | 19 |
| 2.1.3 Obtenção do veneno..... | 19 |
| 2.1.4 Perfil eletroforético de proteínas do veneno da serpente <i>B. erythromelas</i> diante do soro de indivíduos | 19 |
| 2.1.5 "Western blotting" para avaliação do cruzamento entre soro de indivíduos envenenados por serpentes dos gêneros <i>Crotalus</i> e <i>Philodryas</i> com veneno da serpente <i>B. erythromelas</i> | 21 |
| 2.1.6 Ensaios de neutralização do veneno da serpente <i>B. erythromelas</i> diante dos antivenenos comerciais | 23 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 3.1 Perfil eletroforético de proteínas do veneno da serpente <i>B. erythromelas</i> diante do soro de indivíduos | 25 |
| 3.2 "Western blotting" para avaliação do cruzamento entre soro de indivíduos envenenados por serpentes dos gêneros <i>Crotalus</i> e <i>Philodryas</i> com veneno da serpente <i>B. erythromelas</i> | 27 |
| 3.3 Ensaios de neutralização do veneno da serpente <i>B. erythromelas</i> diante dos antivenenos comerciais | 29 |
| 4. CONCLUSÕES | 35 |
| ABSTRACT | 37 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 38 |

ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DE COMPONENTES DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops erythromelas*

Ellynes Amancio Correia Nunes*

RESUMO

Ofidismo é um problema de saúde pública mundial negligenciado, que vitima aproximadamente 1,8 milhões de pessoas por ano e envolvendo 94 mil mortes. O gênero *Bothrops* é responsável por 90,6% dos envenenamentos, com aproximadamente 0,45% de letalidade nos casos tratados, no Brasil. No Nordeste do Brasil, a espécie endêmica é *Bothrops erythromelas*, responsável pelo maior número de acidentes registrados na Paraíba. O veneno botrópico induz hemorragia local e sistêmica, coagulopatia, edema, necrose podendo levar à morte e/ou incapacidade permanente. Uma vez que pouco se sabia a respeito de isotipos e especificidade de anticorpos produzidos por pacientes envenenados por serpentes da espécie *B.erythromelas*, objetivou-se avaliar o veneno desta serpente, frente ao reconhecimento entre moléculas e anticorpos presentes no soro de indivíduos envenenados por outros gêneros de serpente, e frente aos soros comerciais brasileiros. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida, posteriormente estas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose. Depois se analisou a neutralização do veneno frente ao soro comercial, onde foram feitos pools de soro com veneno, em seguida as amostras foram submetidas ao processo de eletroforese. Os resultados obtidos mostraram que bandas de 29 a 31 KDa não são bem neutralizadas mesmo após a soroterapia em pacientes envenenados pela mesma serpente. Observou-se também que não ocorreu reação cruzada entre o veneno da referida serpente e o veneno de espécies pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Philodryas*. Foi visto que o soro comercial não é capaz de neutralizar as bandas de 29 a 31 KDa encontradas no veneno.

Palavras-Chave: Envenenamento. Ofidismo. Soro comercial.

* Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.
Email: ellynescorreia@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As serpentes estão incluídas no maior grupo da classe Reptilia da atualidade, os Lepidosauria, que contem mais de 4800 espécies de lagartos e 2900 espécies de serpentes. Estes são animais predominantemente terrestres, com exceção de algumas espécies de serpentes que adquiriram hábitos aquáticos. As serpentes são os únicos integrantes deste grupo que são completamente apodes. Dentro dos Lepidosauria, existem dois grupos irmãos, a saber, os Sphenodontidae (tuataras) e o Squamata (lagartos e serpentes). Dentro dos Squamata, os lagartos e as serpentes podem ser distintos apenas em termos coloquiais, mas não filogeneticamente, porque as serpentes evoluíram dos lagartos, portanto assim como os lagartos as serpentes pertencem a subordem Scleroglossa. As serpentes atuais estão distribuídas em três infraordens, Scolecophidia, que abriga três famílias; Alethinophidia, com treze famílias; e Colubroidea, com quatro famílias, nesta última estão inclusas as três famílias de interesse médico no Brasil, as famílias Viperidae, Elapidae e Colubridae. (POUGH, 2008).

As serpentes dispõem de várias adaptações sensoriais, que lhes permitem explorar melhor o ambiente em que vivem. Entre estas adaptações destaca-se o olfato, sentido bastante desenvolvido nesse grupo, que diferente da maioria das outras espécies de animais não está associado as narinas, mas aos movimentos vibratórios da língua, que sendo longa e bifurcada, permitem que as serpentes captem partículas químicas do ar, que são levados ao órgão de Jacobson, que é um quimiorreceptor especializado, revestido por um epitélio sensorial, o qual se abre por dois orifícios na mucosa bucal superior logo atrás da escama rostral (MELGAREJO, 2002).

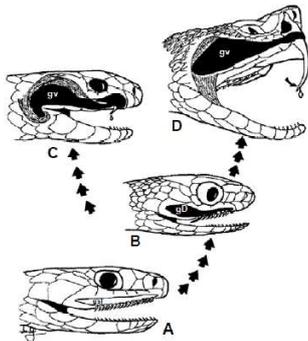
De acordo com Melgarejo (2002) a termorrecepção é um tipo de adaptação que se observa em serpentes das famílias Boidae e Viperidae, o que as torna mais especializadas no momento de captura de alimento. A família Boidae apresenta fossetas labiais, que são adaptações sensitivas nas escamas supra e infralabiais. Os representantes da família Viperidae por sua vez apresentam fosseta loreal, localizada entre a narina e os olhos da serpente.

Sobre a alimentação, pode-se dizer que todas as serpentes são carnívoras e engolem o alimento inteiro, uma vez que seus dentes agudos e recurvados não lhes permitem parti-lo (MELGAREJO, 2002). No entanto, as serpentes possuem

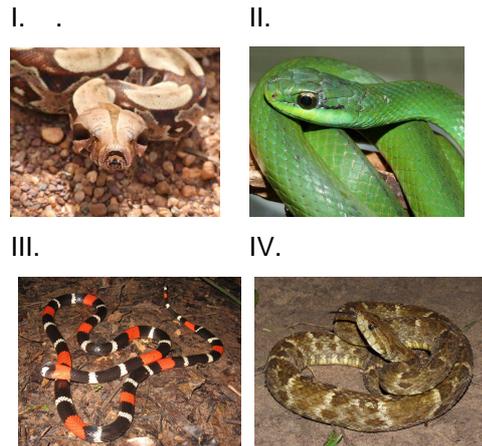
especializações predatórias que permitem que elas segurem presas grandes, com pouco risco de ferimento, a constrição e o veneno. A constrição é característica das jiboias e pítons, serpentes pertencentes a família Boidae, podendo estar presente em algumas serpentes da família Colubridae (POUGH, 2008). No que concerne a especialização de glândulas produtoras de veneno, dependendo da espécie, a toxina pode ser produzida em dois tipos de glândulas: Duvernoy e de Peçonha (STOCKER, 1990). Estas diferem entre si pela ausência de um lúmen nas glândulas Duvernoy e a presença deste lúmen na glândula de peçonha, ambas são responsáveis pela estocagem deste veneno, este lúmen torna as peçonhentas mais adaptadas a inoculação do veneno através da presa, isso se dá pelo formato triangular das células desta glândula. (VITAL BRAZIL, 1982)

As serpentes peçonhentas com presas inoculadoras anteriores (Elapidae e Viperidae) apresentam especializações alternativas de um sistema de inoculação ancestral. Uma variedade de serpentes possui dentes aumentados (presas inoculadoras) no maxilar. São reconhecidas três categorias de serpentes peçonhentas; as que possuem uma dentição áglifa (Figura 1A) que se caracteriza pela ausência de uma presa inoculadora de veneno e tem como representante as jiboias (*Boa constrictor constrictor*) (Figura 1.I.); as com dentição opistóglifas (Figura 1B) (Grego, opistho = atrás, glyph = sulcado) aquelas que apresentam presas nas regiões caudais da maxila, exemplo, cobra verde (*Philodryas Olfersii*) (Figura 1.II.); as com dentição do tipo proteróglifas (Figura 1C) (Grego, proto = primeiro) que apresentam a presa fixa na região anterior da maxila, por exemplo, corais verdadeira (*Micrurus* sp.) (Figura 1.III.); e as solenóglifas (Figura 1D) (Grego, solen = tubo) que possuem presas móveis na região anterior da maxila, a exemplo, as víboras, como jararacas (*Bothrops* sp.) (Figura 1.IV.). (POUGH, 2008; MELGAREJO, 2002).

Figura 1: Representação do provável processo de especialização peçonhenta das serpentes de acordo com a sua dentição (A) dentição áglifa; (B) opistóglifa; (C) proteróglifa; (D) solenóglifa. E exemplares de serpentes por família de acordo com o tipo de dentição: I. *Boa constrictor constrictor*. II. *Philodryas olfersii*. III. *Micrurus lemniscatus*. IV. *Bothrops atrox*.



Fonte: MELGAREJO, 2002.



Fonte: <http://www.herpetofauna.com.br>.

De todas as espécies de ofídios conhecidos cerca de 10% são considerados peçonhentos (ROMANO-HOGE, 1990). No Brasil encontram-se cerca de 73 espécies de serpentes peçonhentas de importância médica distribuídas em duas famílias: Viperidae e Elapidae. A família Viperidae está representada pelos gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus), e *Elapidae* pelos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais verdadeiras) (COSTA & BÉRNILS 2014).

Acidentes ofídicos são um problema de saúde pública negligenciado que tem acometido quase todas as regiões do mundo, com exceção dos polos onde não ocorrem estes animais. Isto é particularmente relevante nas áreas rurais dos países tropicais e subtropicais, nos quais os acidentes são mais comuns e o acesso aos serviços de saúde é limitado e deficiente. A real magnitude da ameaça dos envenenamentos por serpentes para a saúde pública nesses países é desconhecida porque os acidentes são subnotificados, o que torna difícil para as instituições responsáveis aprimorar a prevenção e o tratamento das vítimas (KASTURIRATNE et al., 2008).

Em escala mundial cerca de 2.500.000 de pessoas são envenenadas e 125 mil morrem anualmente por acidentes com serpentes, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (ALBUQUERQUE et al., 2013). No Brasil ocorrem aproximadamente 20.000 casos notificados por ano com uma letalidade de 0,45% (KASTURIRATNE et al., 2008). A maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem na América Latina são causados por serpentes das espécies do gênero *Bothrops*, estas são responsáveis por 90% dos acidentes notificados, tornando-se as serpentes de maior importância do ponto de vista médico e as mais estudadas clínica e imunologicamente (BRASIL, 2013). Os acidentes geralmente ocorrem no início e no final do ano, com trabalhadores rurais do sexo masculino, em idade produtiva (entre os 19 e 45 anos), atingindo principalmente os membros inferiores (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

São conhecidas no Brasil cerca de 29 espécies e subespécies do gênero *Bothrops* e *Bothrocophias* (COSTA; BÉRNILS 2014). Várias são as técnicas atuais de análise de parentesco entre espécies, estas podem ser, análise de DNA mitocondrial, eletroforese de proteínas totais do plasma e morfologia interna do hemipênis (JANEIRO-CINQUINI et al., 1989). De acordo com a análise filogenética das espécies do gênero *Bothrops* estudadas até o momento, foi possível classificar o gênero *Bothrops* em oito grupos distintos: Grupo *Atrax*: formado por *Bothrops atrax*, *B. moojeni*, *B. leucurus*, *B. colombiensis*, *B. isabelae*, *B. marajoenses* e *B. pradoi*; Grupo *Alternatus*: formado por *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. ammodytoides*, *B. itapetiningae* e *B. fonsecai*; Grupo *Neuwiedi*: formado por *B. neuwiedi*, *B. andianus*, *B. iglesiasae* e *B. erythromelas*; Grupo *Jararaca*: formado por *B. jararaca*; *B. insulares* e *B. alcatraz*; Grupo *Jararacussu*: formado por *B. jararacussu* e *B. brazili*; Grupo *lanceolatus*: formado por *B. lanceolatus* e *B. caribbaeus*; Grupo *Pictus*: formado por *B. pictus*; e Grupo *taeniatus*: formado por *B. taeniatus* e *B. bilineatus*. (JANEIRO-CINQUINI et al., 1989; PESANTES, 1989; PESANTES; FERNADES, 1989; FERNADES; PESANTES, 1989; FERNADES et al., 1991; CADLE, 1992; WERMAN, 1992; PESANTES et al., 1993; SALOMÃO et al., 1997, 1999; WUSTER et al., 1997, 1999, 2002; PARKINSON et al., 2002.).

Os venenos ofídicos contêm uma grande variedade de componentes (KAMIGUTI et al., 1996), cujo papel preliminar é agir para imobilizar a presa (JENNINGS et al., 2005). Cerca de 90% do peso seco das peçonhas das serpentes são compostas por proteínas. A parte não proteica compreende ânions e cátions

inorgânicos, lipídeos, carboidratos, pequenos peptídeos e aminoácidos (STOCKER, 1990). Os componentes proteicos dos venenos ofídicos foram agrupados em diferentes categorias baseadas em suas funções hemostáticas: 1) enzimas que coagulam fibrinogênio; 2) enzimas que degradam fibrinogênio; 3) ativadores de plasminogênio; 4) ativadores de protrombina; 5) ativadores de fator V da coagulação; 6) ativadores de fator X da coagulação; 7) enzimas com atividade anticoagulante incluindo inibidores da formação do complexo protrombinase, inibidores de trombina, fosfolipases e ativadores de proteína C; 8) enzimas com atividade hemorrágica; 9) enzimas que degradam inibidores de serino-proteinases plasmáticas; 10) ativadores da agregação plaquetária incluindo enzimas de ação direta, componentes não enzimáticos e agentes que necessitam de cofator; 11) inibidores da agregação plaquetária, a saber, fibrinogenases, 5'-nucleotidasas, fosfolipases e desintegrinas. Embora muitas peçonhas de serpentes contenham vários componentes hemostaticamente ativos, é importante ressaltar que uma única peçonha não contém todos esses componentes descritos (MARKLAND, 1998).

Os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas) são caracterizados por efeitos no local da picada como: dano tecidual local induzido por mionecrose, edema, hemorragia e infiltrado celular; choque hipovolêmico e alterações na coagulação sanguínea, ocasionando incoagulabilidade sanguínea por desfibrinogenação. Em casos graves, os acidentados podem causar hemorragias em órgãos equidistantes do local da picada (coração, pulmões, rins, intestinos e cérebro), gengivorragia, hematúria, hematêmese e insuficiência renal aguda, podendo levar portanto a vítima ao óbito (CARDOSO E BRANDO, 1982; VITAL BRAZIL, 1982; GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1989; FNS, 1998).

De acordo com Romano-Hoge (1990) a serpente pertencente ao gênero *Bothrops* que é endêmica da região Nordeste do Brasil no que concerne ao bioma caatinga é a *Bothrops erythromelas* (Figura 3), também conhecida como jararaca avermelha ou jararaca malha de cascavel. De acordo com dados do Ministério da Saúde (2003), esta espécie é responsável pelo maior número de atendimentos na Paraíba.

A peçonha da *Bothrops erythromelas* caracteriza-se por possuir uma das mais potentes atividades coagulantes do gênero *Bothrops* e (FURTADO *et al.*, 1991; ZAPPELLINI, 1991; SANCHES *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1992) pela ausência da

atividade trombina s milde, juntamente com *B. castelnaudi* . Essa atividade é responsabilizada pela presena de toxinas pr -coagulantes que ativam protrombina e Fator X da cascata de coagulaao, a ativaao destas substâncias desencadeiam um quadro de coagulaao alastrada (NAHAS et al., 1979; FURTADO et al., 1991; MARUYAMA et al.,1992).

O veneno da *Bothrops erythromelas*, bem como os das demais serpentes do gênero possuem 4 componentes isolados que merecem destaque, são eles, um peptídeo potenciador de bradicinina (ROCHA et al. 1949), um fator de crescimento do endotélio de veneno de serpente(COHEN, 1960, 2004) , uma metaloproteinase da classe PIII chamada de Berythactivase que desencadeia uma atividade coagulante (SILVA et al. 2003), e fosfolipase A₂ ácida com aao anti-plaquetária e indutora de liberaao de prostaglandina I₂ com baixa atividade miotóxica (ALBUQUERQUE et al., 2013; MOURA-DA-SILVA et al., 1991). De acordo com Silva et al. (2003) embora a berythactivase seja uma metaloproteiase da classe PIII, ela se diferencia do grupo por possuir baixa atividade fibrinogenol tica e baixa aao hemorrágica local.

Poucos estudos imunológicos são realizados com humanos, sobretudo, no que diz respeito a resposta imune humoral de pacientes envenenados por serpentes. Esse dado   preocupante porque a resposta imune humoral é a primeira frente de defesa do organismo, importante para delinear a evoluao da doena (LICHTMANN; PILLAI, 2008) . No caso específico da serpente *B. erythromelas* (Figura 2), a importância de se realizar estudos imunológicos referente a espécie, se dá porque a *B. erythromelas*   endêmica da regio Nordeste (ROMANO-HOGE, 1990), e   responsável pelo maior número de atendimentos na Paraíba (SINAN, 2012), mas seu veneno não consta no pool de venenos utilizados na formulaao do antiveneno comercial no Brasil. Um estudo realizado por Domingos et al., (1990) demonstrou que o veneno da serpente *B. jararaca* foi fracamente neutralizado pelo antiveneno comercial mesmo após soroterapia específica, mesmo que esta serpente faa parte deste pool de fabricaao do antiveneno.

Figura 2: A. Serpente da espécie *Bothrops erythromelas*. B. Distribuição Geográfica da Serpente *Bothrops erythromelas*.

A.



B.



Fonte: www.neotropis.ch/ www.macopa.com.br

Este trabalho teve como objetivo avaliar a neutralização do veneno da serpente *B. erythromelas*, diante do reconhecimento entre anticorpos presentes no soro de indivíduos envenenados por outros gêneros de serpente, e frente aos soros comerciais brasileiros.

Os Objetivos específicos do trabalho foram realizar eletroforese do veneno da serpente *B. erythromelas* para separação de seus principais componentes proteicos; verificar cruzamento entre o referido veneno e anticorpos presentes no soro desses pacientes; avaliar o cruzamento entre soro de indivíduos envenenados por serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* com veneno da serpente *B. erythromelas* e avaliar o padrão de neutralização dos componentes do veneno da serpente *B. erythromelas* diante do soro antiofídico gênero-específico (antibotrópico) comercializado no Brasil.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Metodologia

2.1.1. Pacientes

Os pacientes participantes do presente trabalho já foram catalogados e participaram do estudo realizado anteriormente pelo mesmo laboratório. Os tais foram provenientes do Hospital de Trauma de Campina Grande, Paraíba.

Fizeram parte da pesquisa pacientes de ambos os sexos e diferentes idades, envenenados por serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Philodryas* e *Bothrops* e atendidos no Centro de Assistência Toxicológica do Hospital de Trauma de Campina Grande, no ano de 2012. Esses indivíduos foram entrevistados e, em seguida, foram submetidos aos exames clínico-laboratoriais, além da coleta de informações a partir das fichas de atendimento. Os critérios de inclusão na seleção dos indivíduos contemplaram aqueles que receberam tratamento soroterápico e sinais/sintomas clínicos mais frequentes de envenenamento, como o edema local e alterações no tempo de coagulação sanguínea do paciente.

Foram coletados um total de 30 mililitros (mL) de sangue de cinco (n= 5) pacientes que foram submetidos à pesquisa. Esta coleta foi feita em três intervalos de tempo diferentes: 0 horas antes da soroterapia, 12 horas após a soroterapia e 24 horas após a soroterapia, totalizando três coletas, cada uma de 10 mL de sangue por paciente. Os pacientes que fizeram parte da pesquisa foram catalogados como Indivíduos: A, B, C, D e E. Onde o indivíduo A, foi vítima de um acidente causado pela serpente *Bothrops erythromelas*; os indivíduos B e D, foram vítimas de acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus*; e os indivíduos C e E, foram vítimas de acidentes causados por serpentes do gênero *Philodryas*.

A soroterapia empregada no tratamento dos acidentes causados por serpentes do gênero *Crotalus*, preconizado pelo Ministério da Saúde (2003), determina que em pacientes apresentando sinais e sintomas do envenenamento crotálico, devem ser submetidos a soroterapia com 5 ampolas de soro antiofídico gênero específico anticrotálico em casos de acidentes leves, com 10 ampolas em caso de acidentes moderados e 20 ampolas em casos de acidentes graves.

Nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* é determinado pelo Ministério da Saúde (2003) a aplicação de 2 a 4 ampolas do soro

gênero específico antibotrópico em casos de acidentes leves; 5 a 8, em casos de acidentes moderados e 12 em casos de acidentes graves.

O Ministério da Saúde (2003) determina também que em pacientes com envenenamentos causados por serpentes do gênero *Philodryas*, aplica-se apenas o tratamento dos sintomas apresentados pelo paciente.

2.1.2. Considerações Éticas

As amostras coletadas e utilizadas neste projeto foram processadas no laboratório do Hospital de Trauma de Campina Grande. Os dados coletados nesta pesquisa foram utilizados unicamente para atender aos objetivos delineados para uma tese de doutorado apresentada no ano de 2010. As informações foram apresentadas de forma coletiva, sem identificação dos pacientes ou dos profissionais de saúde envolvidos nos atendimentos destes. Os procedimentos só foram realizados após todos os participantes terem concordado e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Estadual da Paraíba (CEP-UEPB), protocolo número 0007.0.133.000-12 de acordo com a Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas realizadas com seres humanos.

2.1.3 Obtenção do veneno

O veneno da serpente *B. erythromelas* foi obtido através da ordenha de espécimes em cativeiro. Os espécimes foram provenientes do Zoológico Répteis da Caatinga, localizado no município de Puxinanã, estado da Paraíba. Foram selecionados apenas animais adultos. O veneno, após liofilização, foi mantido à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

2.1.4 Perfil eletroforético de proteínas do veneno de *B. erythromelas* diante do soro de indivíduos

O termo eletroforese é originado do grego *electro*, eletricidade; *phóresis*, transporte. Portanto, a técnica de eletroforese é definida como uma técnica de

separação de moléculas baseada na diferença de migração de compostos iônicos na presença de um campo elétrico. Esta técnica foi primeiramente utilizada pelo químico sueco Arne Tiselius, para separação de proteínas presentes no sangue, em 1930 (TAVARES, 1996).

Para se realizar a eletroforese é necessário a utilização de uma cuba de eletroforese, que pode ser de migração vertical ou horizontal; e uma fonte de tensão. Às cubas são adicionados géis que podem ser de poliacrilamida, para separação de proteínas com migração vertical, ou de agarose, para separação de DNA, com migração horizontal. Para a separação de proteínas são feitos dois géis, um gel de empilhamento (stacking gel) e um gel de separação (running gel), ambos são feitos entre duas placas de vidro separadas por espaçadores e unidos por uma pinça. Na região superior do complexo de géis, onde se encontra o gel de empilhamento é inserido um pente de plástico para formar as cavidades (poços) onde as amostras serão inseridas, este pente é removido do sistema após a polimerização do gel. Após a montagem do aparato, tanto o topo como a base do gel são imersos em solução tampão apropriado, o qual é importante para manter constante o estado de ionização das moléculas que estão sendo separadas (WILSON;WALKER, 2010).

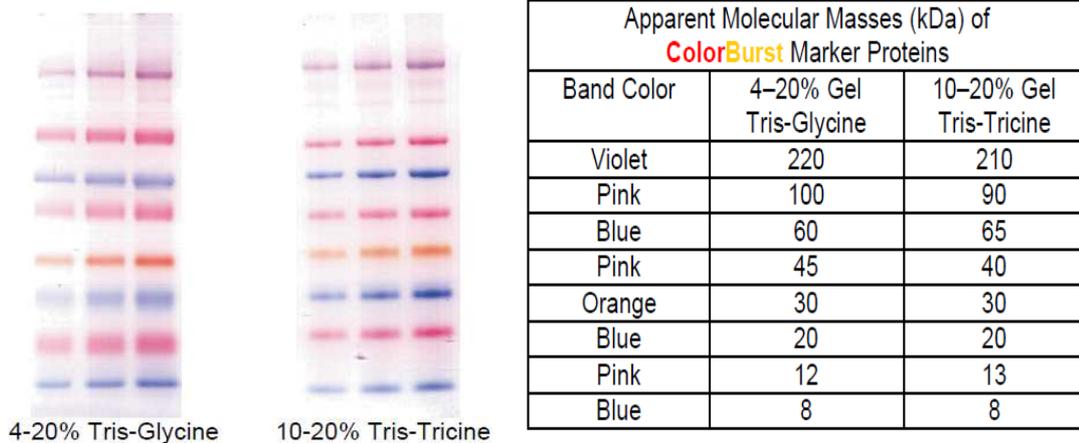
Mini géis de poliacrilamida 10% em presença de SDS (Dodecil sulfato de sódio) foram feitos e acoplados a um sistema de eletroforese da Hoeffer. Ao sistema foi adicionado Solução Tampão (TRIS 0,125 M; GLICINA 0,95 M; SDS 5g). As amostras correram a 60 mA e 90 volts por cerca de 1 a 2 horas. Os géis de empilhamento (stacking gel) e de separação (running gel) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4,5% (p/v) e 10% (p/v), respectivamente.

Aos géis foram aplicados padrão de peso molecular (PM) (Sigma-Aldrich) com um "range" de 6.5 a 200 Quilodalton (KDa) (FIGURA 3); pool de venenos de serpentes da espécie *Bothrops erythromelas*, com soro de indivíduos previamente envenenados pela mesma serpente. Todas as amostras foram eluídas em tampão da amostra de Laemmli (1970) (Tris-HCl 1M pH 6,8; SDS 10%; β mercaptoetanol 14,7 M; Glicerina; Azul de Bromofenol), e incubadas por 5 minutos em banho-maria antes de sua aplicação no gel. Posteriormente foi feita a coloração dos géis com o corante "Coomassie blue" (Azul de coomassie R-250; Metanol; Ácido Acético; H₂O), durante 30 minutos, seguido do tratamento com descorante (metanol 30%, ácido acético 10% e H₂O 60%) com intervalos de 10 em 10 minutos. Por fim o gel foi

acondicionado no "bastidor" entre duas folhas de papel celofane umedecidas em água. Este foi mantido a temperatura ambiente até secagem do gel.

FIGURA 3 : Padrão de Massa Molecular para análise de Eletroforese (Sigma-ColorBurst) com "range" entre 6.5 a 200 KDa.

ColorBurst Marker in SDS-PAGE Gradient Gels



Fonte: Sigma-ColorBurst

2.1.5 "Western blotting" para avaliação do cruzamento entre soro de indivíduos envenenados por serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* com veneno da serpente *B. erythromelas*

A metodologia de "Western blotting" foi primeiramente descrita por Towbin et al. (1979). É uma técnica utilizada em Biologia molecular para exercer a imunodeteção de proteínas, sendo também conhecida como "protein blotting" ou "imunoblotting", que admite a detecção, caracterização e quantificação das tais. Esta metodologia é oriunda da técnica de "Southern blotting" e "Northern blotting", que são técnicas voltadas a análise molecular de DNA e RNA respectivamente (KURIEN; SCOLFIELD, 2006).

Para que esta técnica seja aplicada, é necessário que as proteínas sejam anteriormente separadas pelo processo de Eletroforese em gel. Uma vez separadas as proteínas são transferidas para uma membrana absorvente, onde serão analisadas (KURIEN; SCOLFIELD, 2006).

Em nossos experimentos, após o processo de eletroforese, onde se utilizou um padrão de massa molecular (Sigma-ColorBurst; com "range" entre 6.5 a 200

KDa) (FIGURA 4); os géis foram submetidos a um processo de transferência das bandas de proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman). Ao sistema foi adicionado 3 papéis de filtro umedecidos com Tampão Anado I (Tris Base 36,3g; Metanol; H₂O), seguido de mais três papéis de filtro umedecidos com Tampão Anado II (Tris 3g; Metanol; H₂O), posteriormente foi colocada a membrana de nitrodelulose, seguida do Gel, em seguida se umidificou mais seis papéis de filtro com Tampão Catodo (Tris 3g; Ácido capróico 5,2g; Metanol; H₂O) e acrescentou-se ao sistema que foi submetido a transferência por cerca de uma hora no bloqueador em sistema SemiDry (Semi-DryBlotting Systems, C.B.S. Scientific, modelo EBU-4000) com a voltagem de 45 volts e amperagem máxima em 300mA.

Após a transferência a membrana de nitrocelulose (NTC), foi corada com o corante Ponceau a 0,2% e 1% de TCA por 5 minutos. Em seguida procederam-se incubações de bloqueio com leite desnatado (Molico) 5% e lavagem em PBS com pH entre 7.2 e 7.4. Após a última lavagem com PBS-Tween 20 0,05%, procedeu-se incubação da folha de NTC com os primeiros anticorpos (soro dos pacientes envenenados por *Crotalus* e *Philodryas*), "overnight", sob refrigeração.

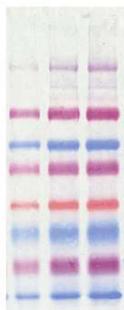
No dia seguinte, lavagens com PBS-Tween20 0,05% foram realizadas e o segundo anticorpo (IgM-conjugada a peroxidase), foi adicionado à membrana de NTC, sendo a mesma incubada por duas horas a temperatura ambiente.

A revelação da membrana foi realizada com 4-Cloronaftol (Sigma-Aldrich), feito na hora, e a reação parada com água destilada.

Os imunocomplexos formados (componentes antigênicos do veneno mais anticorpos presentes no soro do paciente) foram detectados através de uma sonda enzimática. No presente trabalho, a sonda enzimática utilizada foi a anti-IgM humana (Sigma-Aldrich) conjugada a peroxidase (Sigma-Aldrich).

FIGURA 4: Padrão de Massa Molecular para análise de "Western Blotting" (Sigma-ColorBurst) com "range" entre 6.5 a 200 KDa.

ColorBurst Marker transferred to nitrocellulose membranes using Towbin's buffer.²



| Apparent Molecular Masses (kDa) of ColorBurst Marker Proteins | | |
|--|---------------------------|----------------------------|
| Band Color | 4–20% Gel Tris-Glycine | 10–20% Gel Tris-Tricine |
| Violet | 220 | 210 |
| Pink | 100 | 90 |
| Blue | 60 | 65 |
| Pink | 45 | 40 |
| Orange | 30 | 30 |
| Blue | 20 | 20 |
| Pink | 12 | 13 |
| Blue | 8 | 8 |

Fonte: Sigma-ColorBurst

2.1.6 Ensaios de neutralização do veneno da serpente *B. erythromelas* diante dos antivenenos comerciais

Para se analisar a neutralização do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* frente aos antivenenos comerciais utilizou-se a metodologia descrita por Gené et al. (1989).

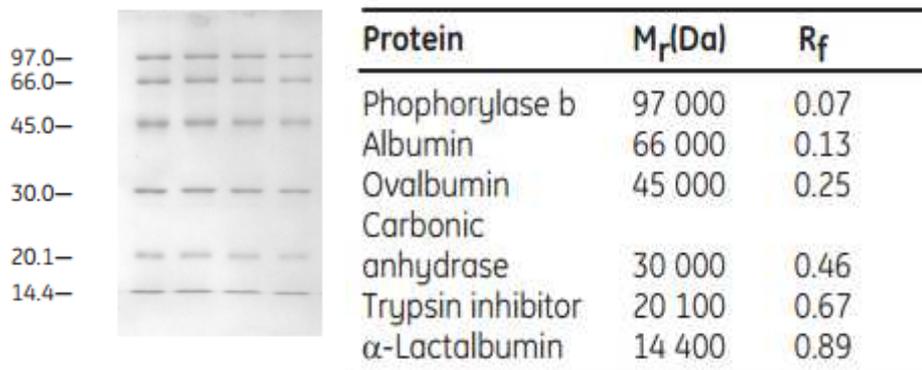
Foram incubadas doses fixas de veneno de serpente com diferentes concentrações de antivenenos comerciais em banho-maria por 30 minutos a uma temperatura de 37°C .

No primeiro experimento utilizou-se 10µL do veneno da serpente *B. erythromelas* que foi incubado com 10µL; 50µL; 100µL e 200µL, respectivamente, do soro antibotrópico comercial (Instituto Vital Brazil S.A.). No segundo experimento foram incubados 5µL do veneno da serpente com 10µL; 50µL; 100µL e 200µL, respectivamente do soro antibotrópico comercial. Foi adicionado aos pools Tampão de Amostra q.s.p. 1X (loading buffer- 2X).

Depois de incubadas a 37°C, as amostras foram aplicadas ao gel de poliacrilamida, onde foram submetidas ao processo de eletroforese.

No processo de SDS-PAGE foram utilizados três padrões de peso molecular, a saber, PM (Sigma-ColorBurst) com "range" entre 6.5 a 200 KDa (FIGURA 3) ; PM (PMA) (Product Booklet) com "range" de 14.4 KDa a 97.0 KDa (FIGURA 5) ; e PM (PMN) (Prestained Molecular Weight) com rage de 26,6 a 180 KDa (FIGURA 6).

FIGURA 5: Padrão de Massa Molecular para análise de Eletroforese (Product Booklet) com "range" de 14.4 KDa a 97.0 KDa



Fonte: Product Booklet

FIGURA 6: Padrão de Massa Molecular para análise de Eletroforese (Prestained Molecular Weight) com range de 26,6 a 180 KDa.

| Prestained Protein | Native* Subunit Molecular Mass (Da) |
|--|-------------------------------------|
| α_2 -Macroglobulin from equine serum | 180,000 |
| β -Galactosidase from <i>E. coli</i> | 116,000 |
| Lactoferrin from human milk | 90,000 |
| Pyruvate Kinase from rabbit muscle | 58,000 |
| Fumarase from porcine heart | 48,500 |
| Lactic Dehydrogenase from rabbit muscle | 36,500 |
| Triosephosphate Isomerase from rabbit muscle | 26,600 |

Fonte: Prestained Molecular Weight

Posteriormente este gel foi corado com o corante Coomassie Blue por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de tratamento com o descorante (metanol 30%, ácido acético 10% e H₂O 60%) com intervalos de 10 em 10 minutos.

Após coloração por Coomassie blue, o gel foi acondicionado no "bastidor" entre duas folhas de papel celofane umedecidas em água. Este foi mantido a temperatura ambiente até secagem do gel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil eletroforético de proteínas do veneno de *B. erythromelas* diante do soro de indivíduos envenenados.

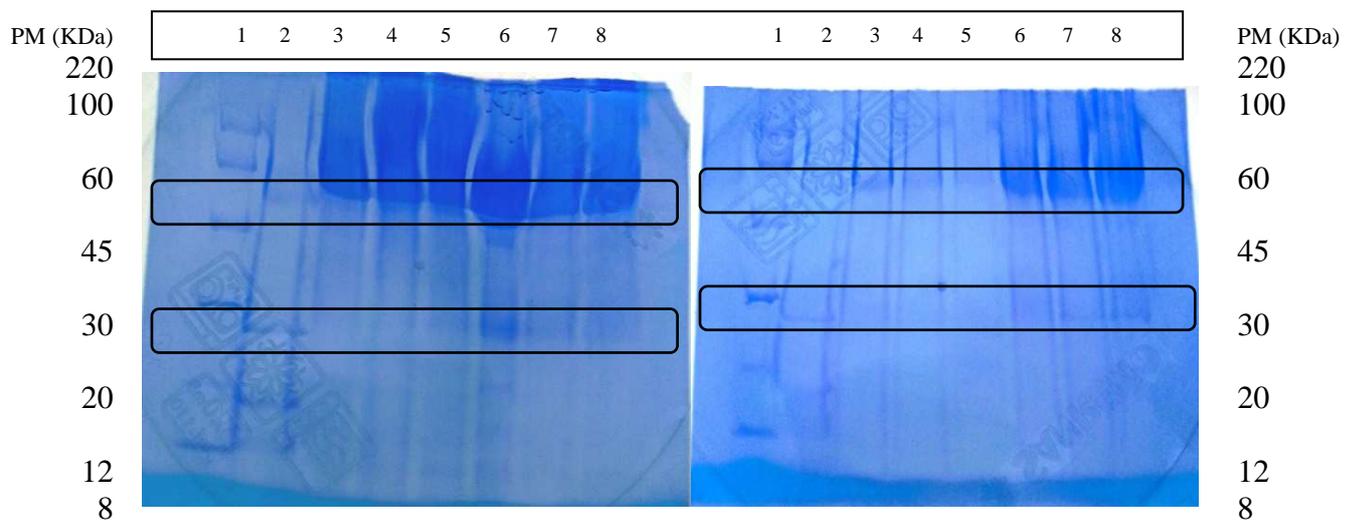
Ao se realizar a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS observou-se bandas proteicas que reafirmaram o que foi observado nos experimentos realizados por Luna et al. (2010), com os quais observou-se um padrão de bandas com peso molecular entre 29 KDa e 31 KDa (Figura 7) que não sofrem neutralização mesmo após o tratamento soroterápico dos pacientes envenenados.

No gel 1 (Figura 7) é possível verificar a interação entre o veneno da serpente *B. erythromelas* e o soro de indivíduos envenenados pela mesma serpente. Como pode-se observar nas Colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mostram a formação de um complexo imune que sugere uma grande interação entre o veneno da serpente e os anticorpos presentes nos soros dos pacientes, o que pode ser visualizado pela forte coloração da formação no início do gel. É importante observar, também, que algumas bandas presentes no gel como a banda de cerca de 29 KDa não é neutralizada mesmo após a soroterapia dos pacientes envenenados. É importante verificar que nos poços 3,4 e 5 foi utilizado o pool de soro acrescido de veneno da espécie *B. erythromelas*, este pool refere-se a primeira coleta que caracteriza o tempo zero do tratamento, sendo respectivamente, leve, moderado e grave. Os poços seguintes, a saber, 6,7 e 8 receberam pools de terceira coleta, o que indica o tempo de 24 horas após o tratamento, este também foi acrescido com o veneno da serpente e assim como os poços anteriores constituem envenenamentos do tipo, leve, moderado e grave, nesta ordem. No gel 2, foi utilizada a mesma sequência do gel 1. Pode-se visualizar que não há formação de imunocomplexos, como foi observado no primeiro gel.

A formação de complexo imune observada no primeiro gel, está relacionada a presença do veneno no sistema, uma vez que os anticorpos do soro dos pacientes reagiram e interagiram com as proteínas do veneno. E o mesmo não se observa no segundo gel, onde não houve a adição do veneno da *B.erythromelas*.

Figura 7: Gel 1: Coluna 1: PM (Sigma-ColorBurst; com "range" entre 6.5 a 200 KDa); Coluna 2: Veneno; Colunas 3, 4, 5 coletas I de soro de pacientes em zero hora (antes do tratamento soroterápico) + veneno, Colunas 6, 7, 8: coletas III de soro de pacientes (24 horas após tratamento soroterápico) sem veneno.

Gel 2: Coluna 1: PM(Sigma-ColorBurst; com "range" entre 6.5 a 200 KDa); Coluna 2: Veneno, Colunas 3, 4, 5 coleta I de soro de pacientes em zero hora (antes do tratamento soroterápico), Colunas linhas 6, 7, 8: coletas III de soro de pacientes (24 horas após tratamento soroterápico) sem veneno.



As bandas que se encontram destacadas no esquema (FIGURA 7) , a saber, 29 a 31 KDa, bem como a de aproximadamente 59 KDa, podem constituir um grupo de proteínas que não são neutralizadas pelo tratamento soroterápico, corroborando com os resultados de Luna et al. (2010).

Resultados semelhantes foram observados no estudo com veneno de outras espécies de *Bothrops*, como a *Bothrops jararacussu* que também apresentou bandas que não foram neutralizadas pelos antiveneno comercial indicado para o gênero, a saber o soro antibotrópico (SAB) , como foi relatado por Netto (2007).

Os soros antibotrópicos atualmente utilizados no Brasil são produzidos pelo Instituto Butantan – IB (SP), Instituto Vital Brasil – IVB (RJ) e Fundação Ezequiel Dias – FUNED (MG), por meio da imunização de cavalos com venenos provenientes das cinco espécies do gênero *Bothrops* mais prevalentes no Brasil: *B. jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* – 12,5% cada (BRASIL, 1996), e são distribuídos pelo Ministério da Saúde, através da Fundação Nacional de

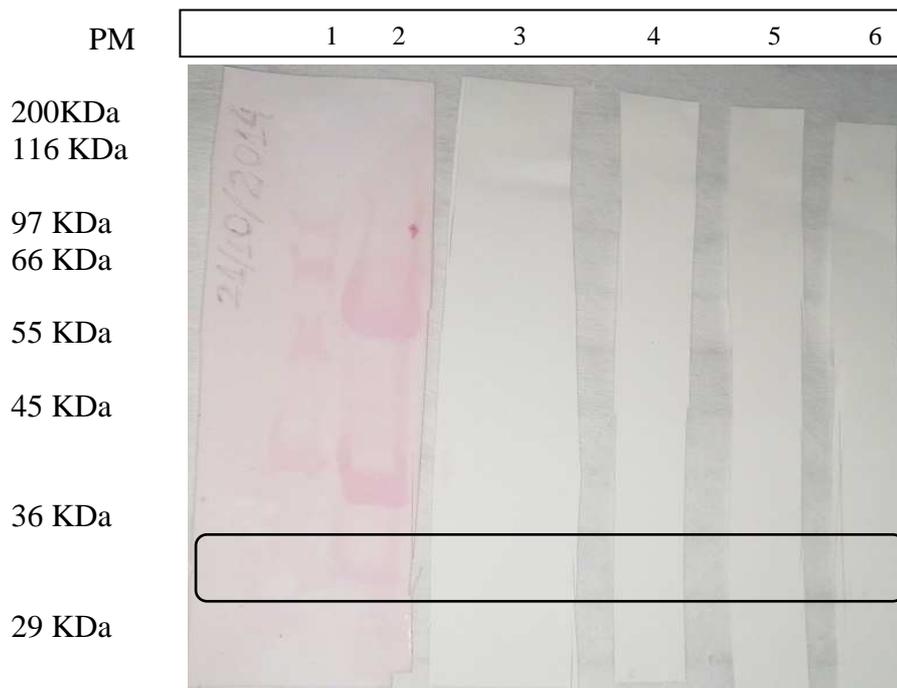
Saúde (FUNASA). O veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, diferentemente do veneno de *B. jararacussu*, não faz parte do pool para a produção do soro Antitoxinotrópico.

Jorge et al. (2014), viram que serpentes da espécie *B. erythromelas* possuíam variações na composição química do seu veneno de acordo com a sua localização geográfica. O que sugere que dentro da mesma espécie pode ocorrer tipos de envenenamentos diferentes, quanto a sua gravidade, mostrando que o soro poliespecífico não configura a melhor opção no tratamento para reverter o quadro de envenenamento de vítimas de acidentes ofídicos, mas que um soro produzido a nível de espécie seria mais eficiente na neutralização de todos os componentes do veneno, pois como Netto (2007) relatou, mesmo estando presente no pool de fabricação do soro antitoxinotrópico, o veneno de *B. jararacussu* não é bem neutralizado pelo antiveneno comercial.

3.2 "Western blotting" para avaliação do cruzamento entre soro de indivíduos envenenados por serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* com veneno da serpente *B. erythromelas*

Os resultados indicam que os antígenos do veneno da serpente *B. erythromelas* não apresentaram reação cruzada com o soro de indivíduos envenenados por outros gêneros de serpente (FIGURA 8), uma vez que não se observou bandas presentes na membrana de nitrocelulose, principalmente na nossa banda de interesse, localizada na região de 29-31 KDa, como destacado na figura 8. Este resultado é promissor, uma vez que o marcador que estudamos, banda de 29-31 KDa, pode vir a ser um diferenciador importante para o diagnóstico de envenenamento pela serpente *B. erythromelas* no Nordeste. Este dado portanto corrobora mais uma vez com os de Luna et al. (2010).

Figura 8: Western Blot. Coluna 1: Padrão de Massa molecular (Sigma-ColorBurst) com "range" entre 6.5 a 200 KDa. Coluna 2: veneno da serpente *B. erythromelas*; Coluna 3: soro de indivíduo envenenado por *C. durissus*; Coluna 4: soro de indivíduo envenenado por *Philodryas* sp.; Coluna 5: soro de indivíduo envenenado por *C. durissus*; Coluna 6: soro de indivíduo envenenado por *Philodryas* sp.



Fonte: Elaborada pela autora.

A necessidade de se observar a ocorrência de uma reação cruzada entre os venenos de *Bothrops erythromelas* e *Philodryas*. sp. se dá devido às semelhanças dos quadros fisiopatológicos, entre estes envenenamentos (FAN; CARDOSO 1995, FRANÇA; MÁLAQUE 2003). De acordo com estudos realizados por Tanjoni et al. (2003) onde foi utilizando o anticorpo monoclonal anti-jararagina que reconhece um epítipo presente na região Cterminal do domínio desintegrina-like, uma metaloproteinase do veneno de *Bothrops jararaca*, demonstraram pela técnica de Dot Blot que estes anticorpos reagiram com os venenos de *P. offersii* e *P. patagoniensis*, sugerindo que as metaloproteinases destes venenos apresentam epítipos comuns aos de *B. jararaca*. Corroborando tais achados, Rocha et al. (2006) demonstraram que o soro antibotrópico comercial apresentou reatividade cruzada com o veneno das serpentes *P. offersii* e *P. patagoniensis* sendo capaz de neutralizar a ação hemorrágica, e eficientemente a atividade tóxica destes venenos

(*P. olfersii* e *P. patagoniensis*), com eficiências similares aos obtidos com o veneno de *B. jararaca*.

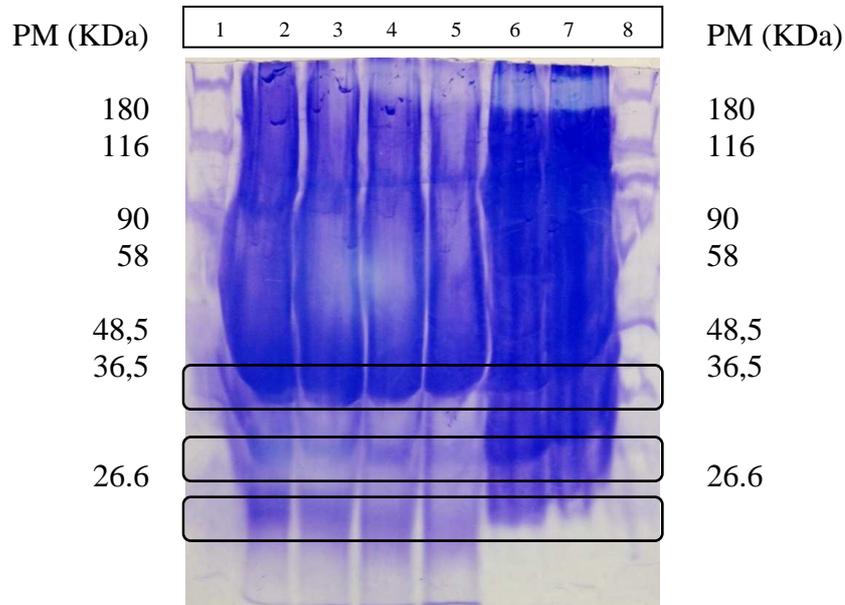
Com relação ao que se sabe sobre os venenos das serpentes pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, possuem bioquímica diferenciada. De acordo com Breithaupt (1976) os principais componentes do veneno crotálico são: fosfolipases A₂, Crotapotina, Crotoxina, Crotamina e Girotoxina. O veneno botrópico por sua vez possui em sua composição química, Botropsina I e II, Trombocitina, Jararacina, metaloproteinasas, Jararacafribase, e outras enzimas pro-coagulantes. (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Contudo Spencer (1998) indica que umas das principais frações da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu*, a Bothropstoxin-1 é uma fosfolipase A₂. Assim, as fosfolipases são constituintes tanto do veneno botrópico como do crotálico. Daí se dá a necessidade de se observar uma possível reação cruzada entre estas duas peçonhas.

3.3 Ensaio de neutralização do veneno da serpente *B. erythromelas* diante dos antivenenos comerciais.

A figura 9 mostra o perfil de neutralização apresentado quando 10 µL do veneno da serpente *B. erythromelas* foi incubado com 10 µL (Coluna 2); 50 µL (Coluna 3); 100 µL (Coluna 4) e 200 µL (Coluna 5), respectivamente, do soro antibotrópico comercial. Nas colunas 6 e 7 temos veneno bruto em tampão da amostra.

Como é possível observar, na coluna 2, a concentração de SAB (10 µL) não foi suficiente para neutralizar o veneno, uma vez que as bandas referentes aos componentes do mesmo ainda são bem visíveis.

Figura 9: Gel 2: Coluna 1: PM (Prestained Molecular Weight) com range de 26,6 a 180 KDa; Coluna 2: Veneno + SAB 10 μ L; Coluna 3 veneno + SAB 50 μ L; Coluna 4: veneno + SAB 100 μ L; Coluna 5: veneno + SAB 200 μ L. Colunas 6 e 7: veneno + tampão da amostra. Coluna 8: PM (Prestained Molecular Weight) com range de 26,6 a 180 KDa.

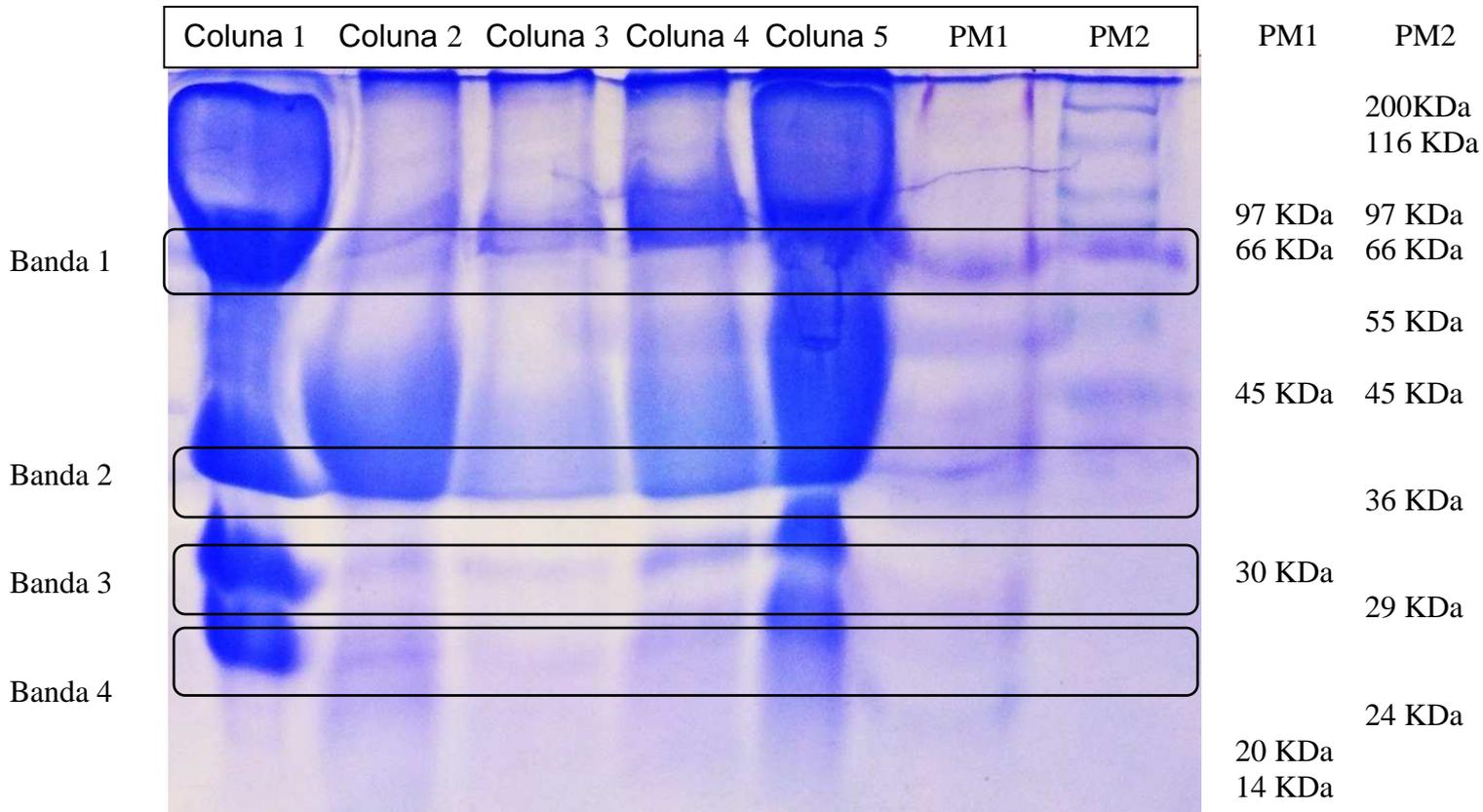


Fonte: Elaborada pela autora.

Nas colunas 3 (50 μ L SAB), 4 (100 μ L SAB), 5 (200 μ L SAB) é possível observar que apenas uma banda do veneno aparece idêntica a banda observada na coluna com veneno (Coluna 6 e 7). Essa linha, apesar de não bem visualizada na coluna referente ao padrão de massa molecular (Coluna 8) , é alusiva a banda de 31KDa.

Como a visualização da banda de veneno apenas mostrou uma concentração muito grande de veneno por poço de gel, corremos um novo gel com 5 μ L de veneno incubado com 10 μ L, 50 μ L, 100 μ L e 200 μ L de soro antiveneno comercial. E também utilizamos um novo padrão de massa molecular para uma melhor visualização das bandas não neutralizadas (Figura 10).

Figura 10: Gel 1: Coluna 1: Veneno + SAB 10 μ L Coluna 2: veneno + SAB 50 μ L, Coluna 3: veneno + SAB 100 μ L; Coluna 4: veneno + SAB 200 μ L ; Coluna 5: veneno + Tampão de Amostra; Coluna 6: PM1 (Sigma-ColorBurst) com "range" entre 6.5 a 200 KDa. e Coluna 7 : PM2 (Product Booklet) com "range" de 14.4 KDa a 97.0 KDa.



Fonte: Elaborada pela autora.

Como é possível observar o perfil de neutralização permanece o mesmo, na Coluna 2, assim como no primeiro experimento, a quantidade de soro antiofídico para a quantidade de veneno no sistema não surtiu o efeito desejado uma vez que é possível observar nitidamente as bandas não neutralizadas no gel. À medida que se aumenta a concentração do soro, observa-se que mais bandas vão sendo neutralizadas e que algumas, especialmente aquela localizada na região de 31KDa permanece inalterada, assim como foi observado no primeiro experimento. Portanto mais uma vez estes resultados apoiam os de Luna et al. (2010).

Em estudos realizados por Boechat et al. (2001), foi observado que o soro antibotrópico possuía uma eficácia de apenas 58% na letalidade da ação do veneno da *Bothrops erythromelas* quando comparado ao de *Bothrops jararaca*, que possui uma eficiência de 100%. Essa diferença na ação de neutralização dos venenos

botrópicos colocam em questão a qualidade do soro comercial antibotrópico fornecido pelo Ministério da Saúde, uma vez que a *B.erythromelas* é a principal responsável pelos acidentes ofídicos registrados na região nordeste do Brasil.

Nossos resultados confirmam o que foi observado por Bezerra (2000), que estudando a eficiência do soros antibotrópicos poliespecífico e monoespecífico, mostrou que é necessário o dobro de concentração do soro poliespecífico para neutralizar a ação do veneno de *B.erythromelas*, quando comparado a atividade neutralizante do soro monoespecífico, que por sua vez se mostrou mais eficaz, comprovando o déficit de neutralização quando se utiliza um soro produzido a nível de gênero.

Bezerra (2000) justificou que a diferença entre estes soros, no que se refere a atividade de neutralização poderia ser justificada pelo maior número de determinantes antigênicos na peçonha de *B. erythromelas* diante do soro antibotrópico monoespecífico, tornando este soro mais ávido a estes antígenos.

É importante ressaltar que ambos os soros, seja ele mono ou poliespecífico, reconhecem as proteínas da peçonha de *B.erythromelas*, porém devido a intensidade das bandas e reatividade do soro monoespecífico frente a este veneno é significativamente maior do que o soro poliespecífico comercial. (BEZERRA, 2000)

Em seus estudos Zappellini (1991), observou que a dose de soro recomendada pelo Instituto Butantan não consegue inibir a letalidade do veneno de *B.erythromelas*, afirmando que se fez necessário em sua pesquisa aumentar a dose em 10 vezes para inibir tal letalidade e que mesmo aumentando em 30 vezes esta dose, o soro comercial não foi capaz de controlar a hipotensão causada pela peçonha. Foi observado também que o uso do soro antibotrópico comercial como única opção para o tratamento de pessoas acidentas por *B. erythromelas* e por outras serpentes, não seria eficiente contra todos os efeitos causados pelo envenenamento.

Esta observação frente a ação de neutralizante do soro comercial antibotrópico foi também observado em experimentos com outras espécies do gênero, Dos Santos et al. (1992), em seus estudos realizados com *Bothrops jararacussu* observou que a ação do soro antibotrópico comercial não se mostrou tão eficiente na neutralização desta peçonha quando comparado ao soro antibotrópico-crotálico, principalmente no que se refere a ação de PLA₂, e a ação

miotóxica deflagrada por este tipo de envenenamento, confirmando o que já havia sido aferido por Vital Brazil (1901).

Deve-se considerar que a técnica de incubação do veneno com o SAB mimetiza o que ocorre no organismo vivo. Porém, também devemos salientar que, em um envenenamento não é possível saber a quantidade de veneno inoculada e, certamente, o tempo decorrido entre a ligação dos antígenos presentes no veneno com os anticorpos do soro, é bem maior. Ou seja, de acordo com os resultados descritos na figura 10, uma quantidade maior de soro pode sim ajudar na neutralização de toxinas em período de tempo menor.

De acordo com Jorge e Ribeiro (1997), a tendência atual deve ser a utilização de doses menores de soro, pelo menos quando se trata de envenenamentos leves e moderados, principalmente em locais de alta prevalência de *B. jararaca*. Nossos resultados não corroboram essa afirmação, pois o raciocínio não se aplica a áreas onde ocorrem a espécie *B. erythromelas*, já que a mesma não está presente no pool de venenos que compõem o SAB. Eles afirmam ainda que em envenenamentos graves permanecem as recomendações de doses altas (12 ou mais ampolas), conforme orientações oficiais (Ministério da Saúde, 2003; Manual de vigilância epidemiológica, São Paulo, 2015). Esses casos, entretanto, são menos frequentes. Dada a diversidade de espécies encontradas nas várias regiões do país, é importante que estudos semelhantes sejam realizados também em outros locais, para se avaliar a eficácia dessas doses de antiveneno em relação a outras espécies peçonhentas.

O tempo decorrido entre o envenenamento e o tratamento deve ser levado em consideração, pois, de acordo com nossa experiência clínica no Estado da Paraíba, observamos que pacientes que levam mais de 6 horas para chegar ao socorro hospitalar e realizar o tratamento apresentam, com frequência, hemorragias disseminadas. Essas hemorragias, entretanto, podem ser revertidas após correto tratamento soroterápico (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003). Porém, deve-se considerar que, se a banda mais importante encontrada neste estudo, 29KDa-31KDa, for responsável por causar hemorragias, estamos diante de potentes toxinas específica desse veneno, e que não são neutralizadas com o tratamento soroterápico em uso.

Em outro trabalho realizado na Paraíba (dados ainda não publicados), observou-se que, mesmo após 24 horas de tratamento soroterápico, 100% dos

indivíduos envenenados pela serpente *B. erythromelas* e atendidos no Hospital de Trauma de Campina Grande, apresentaram tempo de coagulação alterado. (LEITE, 2014).

4 CONCLUSÕES

Dessa forma, pode-se concluir, que ao se analisar o perfil de neutralização das toxinas presentes no veneno da serpente *B. erythromelas* frente ao soro de indivíduos envenenados antes e após a soroterapia, observou-se que as bandas de 29 a 31 KDa apresentaram padrão de neutralização diferenciado, uma vez que mesmo 24 horas após a submissão do paciente ao soro antivenenoso, estas bandas permaneceram não neutralizadas.

O mesmo se observou quando se analisou o perfil de neutralização do veneno da serpente *B.erythromelas*, frente ao soro antivenenoso comercial, mesmo sendo submetido a diferentes concentrações de soro antivenenoso. As mesmas proteínas encontradas nas bandas de 29 a 31 KDa permaneceram inalteradas, ou seja, não houve neutralização.

Esta implicação indica que o soro antivenenoso gênero específico produzido no Brasil não age com total eficiência no processo de reverter completamente os danos causados pela ação do veneno da *Bothrops erythromelas*.

Além disso, identificamos outras bandas proteicas com cerca de 24, 36 e 55 KDa no veneno da serpente *B. erythromelas*, representando toxinas que não foram neutralizadas pelo soro antivenenoso comercial, o que aumenta em muito a preocupação de que mais de uma classe de toxinas possa estar agravando os envenenamentos deflagrados por essa espécie. Estudos de venômica são necessários para que essas bandas sejam identificadas quanto a sua estrutura, composição química, sequência de aminoácidos e atividade biológica.

Avaliando-se o possível cruzamento entre o soro de pacientes envenenados por serpentes pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Philodryas* frente ao veneno de *B. erythromelas*, a metodologia de "Western blotting" mostrou que os antígenos do veneno de *B. erythromelas* não apresentaram reação cruzada com o os soros dos indivíduos envenenados pelas serpentes dos outros dois referidos gêneros. Dado importante uma vez que pretendemos no futuro identificar marcadores específicos do envenenamento pela serpente *B. erythromelas*.

Estes resultados ajudam a direcionar novas pesquisas para o melhoramento de futuros tratamentos através da inclusão de soros mais específicos no tratamento de indivíduos envenenados por serpentes, um problema de saúde pública negligenciado. Essa estratégia pode levar a diminuição da letalidade, morbidade e

de danos irreversíveis que possam ser causados pelos envenenamentos causados por esta espécie de serpente.

STUDY OF NEUTRALIZATION OF COMPONENTS THE POISON BY SNAKE
Bothrops erythromelas.

ABSTRACT

Snakebites occur worldwide and are a neglected public health problem, affecting about 1.8 million people a year and involving 94 000 deaths. The *Bothrops* genus is responsible for 90.6% of poisonings, with about 0.45% lethality in the treated cases in Brazil. In northeastern Brazil, the endemic species is *Bothrops erythromelas*, is responsible for the largest number of accidents recorded in Paraíba. The *Bothrops* venom induces local and systemic bleeding, coagulopathy, edema, and necrosis, and can lead to death and / or permanent disability. Since little was known about isotypes and specificity of antibodies produced by patients poisoned by snakes of *B.erythromelas* species, aimed to evaluate the toxin of the serpent, against the recognition of molecules and antibodies present in the serum of individuals poisoned by snake other genres, and front of the Brazilian commercial serum. Proteins were separated on a polyacrylamide gel, later were transferred to a nitrocellulose membrane. After the neutralization was analyzed against commercial poison serum, which were made serum pools with poison, and then the samples were subjected to electrophoresis process. The results showed that bands 29-31 KDa are not well neutralized even after serum therapy in patients poisoned by the serum serpent. It was also observed that there was no cross-reactivity between the poison of that snake and the poison of species belonging to the genre *Crotalus* and *Philodryas*. Finally it was seen that the commercial serum is not able to neutralize the bands from 29 to 31 KDa found in the venom.

Keywords: Poisoning. Snakebites. Commercial serum.

5 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, P.L.M.M.; JACINTO, C.N.; JUNIOR, G.B.S.; LIMA, J.B.; VERAS, M.S.B.; DAHER, E.F. Epidemiological profile of snakebite accidents in a metropolitan area of northeast Brazil Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo. V.55, p.295-301, 2013.

BEZERRA, M.M.P. Comparação da capacidade neutralizante dos antisoros botrópicos comercial e monoespecífico frente a peçonha de *Bothrops erythromelas*. 2000. 80f. Dissertação (Mestrado em Biofísica. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.2000)

BOCHNER, R; STRUCHINER, CJ. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. Cadernos de Saúde Pública. 2003.

BOECHAT, A.L.; PAIVA, C.S.; FRANCA, F.O.; DOS SANTOS, M. C.; Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. Revista do Instituto de Medicina Tropical. V. 43. 2001

BRADFORD, M.M. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72. 1976

BRASIL. Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996. Aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília n. 220, p. 23491, 12 nov. 1996 seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Acidentes ofídicos: contribuição ao estudo da morbidade; 2003.

BREITHAUPT H. Neurotoxic and myotoxic effects of *Crotalus phospholipase A* and its complex with crotapotin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1976.

CADLE, J.E. Phylogenetic relationships among vipers: immunological evidence. In: CAMPBELL, J.A. & BRODIE JR., ED. (Eds). Biology of the pitvipers. Texas: Silva, 1992, p.41-48.

CARDOSO, J.L.C. e BRANDO, R.B. Acidentes por animais peçonhentos, clínica e tratamento. Livraria e Editora Santos. 1ª Edição, 1982.

COHEN, S. Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary glands and its neuro-cytotoxic antiserum. Proceedings of the National Academy of Sciences., 46(3). doi:10.1073/pnas.46.3.302. 1960.

COHEN, S. Origins of growth factors: NGF and EGF. Annals of the New York Academy of Sciences, 1038. doi:10.1196/annals.1315.017. 2004.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/repteis>. Acessado em: 20 de maio de 2016.

DOMINGOS MO, CARDOSO JL, MOURA-DA-SILVA AM, MOTA I. The humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). Toxicon 1990.

DOS SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.C.; L. FORTES-DIAS, C.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F.D. A Eficácia do Antiveneno botrópico- crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. Rev. Ist. Med. Trop. São Paulo, 1992.

FAN, H.W. & J.L. CARDOSO. Clinical toxicology of snake bites in South America, 1995. In: J. MEIER & J. WHITE (Eds). Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Boca Raton, CRC Press, 1995.

FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L. e MOTA, I. Toxic activities of venom from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. Toxicon, Vol. 30 (12), 1992.

FNS - Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, 1998.

FRANÇA FOS & MÁLAQUE CMS. Acidente Botrópico. In: CARDOSO JLC, FRANÇA FOS, FAN HW, MÁLAQUE CMS, HADDAD JR. org. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1 ed. Sarvier, São Paulo; 2003. v. .1.

FERNANDES, W.; PESANTES, O.S. Relacionamento entre as espécies do grupo *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) pela eletroforese do plasma. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 26, 1989, João Pessoa. Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Zoologia, João Pessoa: UFPB, 1989, P.75.

FERNANDES, W.; ABE, A.S.; PESANTES, O.S. Sobre as afinidades de *Bothrops brazili*, *B. iglesiassi*, *B. itapetiningae* e *B. marajoensis* estabelecidas através da morfologia do hemipênis (Serpentes; Viperidae) .In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 28, 1991, Salvador. Livro de Resumos XVIII Congresso Brasileiro de Zoologia, Salvador: UFBA, 1991. P.336.

FURTADO, Ma F. D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A S. e ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*, Vol. 29 (2), 1991.

GENÊ, J.A.;ROY,A.; ROJAS, G.;GUTIÉRREZ, J.M.; E CERDAS,L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic, and fibrinogolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M. e LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venom. A review. *Mem. Inst. Butantan*, Vol. 51, 1989.

HOGUE A.R.; HOMANO-HOGUE SARWL. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*, 1978/79.

HOMSI-BRANDEBURGO M.I.; QUEIROZ L.S.; SANTO-NETO H; RODRIGUES-SIMIONI L; GIGLIO J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; CARDOSO, R. P.; ABE, A. S. e SEGURA, O. P. Agrupamento de serpentes do gênero *Bothrops* pelos caracteres do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: XIII CONG. BRAS. ZOOL. CUIABÁ. 1989.

JENNINGS, B.; SPEARMAN, W.; SHERPHARD. E. A novel 25 KDa protein form the venom of *Bitis arietans* with similarity to C-type lectins causes fibrinogen-dependent platelet agglutination. *Toxicon*, Oxford, 2005.

JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. Dose de soro (antiveneno) no tratamento do envenenamento por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. Rev. Ass. Med. Brasil. 1997.

JORGE, R.J.B.; MONTEIRO, H.S.A.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M.C.; XIMENES, R.M.; BORGES-NOJOSA, D.M.; LUNA, K.P.de O.; ZIGALI, R.B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from Five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. Rev. Journal of Proteomics XX. Published by: Elsevier B.V. 2014.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Molecular cloning and expression of functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from *Bothrops insularis* pit viper . A new member of the VEGF family of proteins. J.Biol.Chem, v.256, 2001.

KAMIGUTI, A.S., C.R.M. HAY, R.D.G. THEAKSTON, and M. ZUZEL. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. Toxicon. 1996.

KASTURIRATNE A, WICKREMASINGHE AR, DE SILVA N, GUNAWARDENA NK, PATHMESWARAN A, PREMARATNA R, ET AL. The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. PLoS Medicine 2008.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. Methods. San Diego. v.38, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970.

LEITE, E.S. Avaliação Leucocitária e plaquetária, tempo de coagulação e sangria em indivíduos envenenados por serpentes em Campina Grande, PB. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014).

LICHTMANN, A.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular Abbas. Editora: Elsevier. Ed. 6. 2008.

LUNA, K.P.; XAVIER, E.M.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, V.R.A. Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2010.

MARKLAND FS. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon 1998.

MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; TOMY, S. C.; ANTONIO, L. C.; SUGIKI, M.; MIHARA, H. Prothrombin and factor X –activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Vol. 86, , 1992.

MELGAREJO, A.R. Criação e Manejo de Serpentes; Editora FIOCRUZ, 2002. SciELO Books.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2003.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância Epidemiológica. São Paulo. 2015.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LANG, G.; THEAKSTON, R.D.G.; Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. Toxicon, v.29, n.6, 1991.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. R. Thrombin-like and Factor X-Activator components of *Bothrops* snake venoms. Thrombosis and Haemostasis, Vol. 2, 1979.

NETTO, C.C. Estudo Imunoquímico do Veneno de *Bothrops jararacussu*, Lacerda, 1884 e identificação de moléculas biomarcadoras como ferramenta para o desenvolvimento de diagnóstico. Dissertação de Mestrado, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2007.

PARKINSON, C.L.; CHIPPINDALE, P.; CAMPBELL, J. Multigene analyses of pitviper phylogeny with comments on their biogeographical history. In: SCHUETT, G.W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. (Eds). Biology of the vipers. Utah. Eagle Mountain, 2002, p. 93-110.

PESANTES, O.C.; Relações entre algumas espécies do gênero *Bothrops*, pela eletroforese do plasma e morfologia do hemipênis (Serpentes: Viperidae).

Dissertação (Mestrado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Rio Claro, SP.1989.

PESANTES, O.S.; FERNANDES, W. Afinidade de *Bothrops erythromelas* aferida através da eletroforese do plasma e da morfologia do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 26, 1989, João Pessoa. Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Zoologia, João Pessoa: UFPB, 1989,P.74-75.

PESANTES, O.S.; ABE, A.S.; FERNANDES, W. Afinidades entre *Bothrops ammodytoides*, *B. andianus* e *B. pictus*, aferida pela morfologia do hemipênis. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HERPETOLOGIA, 3, 1993. Campinas. Livro de Resumos do III Congresso Latino-Americano de Herpetologia. Campinas: UNICAMP, 1993. P.173.

POUGH, F.H.et al. A Vida dos Vertebrados. 4ª edição. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

ROCHA E SILVA, M., BERALDO,W. T., & ROSENFELD, G. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. American Journal of Physiology, 156(2).PMid:18127230. 1949.

ROCHA, M.M.T.; D. PAIXÃO-CAVALCANTE; D.V. TAMBOURGI & M.F.D. FURTADO. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas offersii* and *Philodryas patagoniensis* (Colubridae): Neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). Toxicon 47: 2006.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: Soerensen, B., Animais Peçonhentos. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1990.

SALOMÃO, M.G.; WUSTER,W. ;THORPE, R.S.; BBBSP. DNA evolution of South American pitvipers of the genus *Bothrops* (Reptilia: Serpentes: Viperidae). In: THORPE, R.S.; WUSTER,W.; MALHOTRA, A. (Eds.). Venomous Snakes: ecology, evolution and snakebite. Oxford: Oxford University, 1997, p. 89-98.

SALOMÃO, M.G.; WUSTER,W. ;THORPE, R.S.; BBBSP. MtDNA phylogeny of Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Reptilia: Serpentes: Viperidae).Kaupia. V.8, p. 127-14, 1999.

SANCHEZ, E. F. FREITAS, T. V., FERREIRA-ALVES, D. L., VELARDE, D. T., DINIZ, M. R., CORDEIRO, M. N., AGOSTINI-COTTA, G. e DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, Vol. 30. 1992.

SANO-MARTINS I.S. & SANTORO M.L. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos do Brasil. 2004.

SINAN-Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Estatística 2012. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://sinan.saude.gov.br/>. [Acessado em 18 de outubro de 2015].

SPENCER PJ, AIRD SD, BONI-MITAKE M, NASCIMENTO N, ROGERO JR. A single-step purification of bothropstoxin-1. *Braz J Med Biol Res* 1998.

SILVA, M.B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochemical Journal*, v.369, 2003.

STOCKER, K. F. Composition of snake venoms. In: Stcker, K. F., ed. *Medical use of snake proteins*. CRC Press., Boca Ratin, Vol. 2., 1990.

TANJONI, I.; D. BUTERA; P.J. SPENCER; A.H. TAKEHARA; I. FERNANDES & A.M. MOURA-DA-SILVA. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. *Toxicon* 42: 2003.

TAVARES MFM. Eletroforese Capilar: conceitos básicos. *Química Nova* 1996; 19(2):173.

TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979.

BRAZIL, V. (1901) -"Contribuição ao estudo do veneno ofídico"; II. O veneno de algumas espécies brasileiras, Revista Médica de S. Paulo 4: 296- 300,. Ibid.: Coletânea de trabalhos do Instituto Butantan, 1: 12-20 (1901- 1917), 1918.

BRAZIL, V. Farmacologia das peçonhas. In: Corbett, C. E. ed Farmacodinâmica. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1982.

WERMANN, S.D. Phylogenetic relationships of Central and South American pitvipers of the genus *Bothrops* (sensu lato): cladistics analyses of biochemical and anatomical characters. In: CAMPBELL, J.A.; BRODIE. JR.; ED. (Eds.). Biology of the pitvipers. Texas: Selva, 1992, p.21-40.

WILSON & WALKER. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. Page 399, 2010.

WUSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; THORPE, R.S.; WARRELL, D.A. Systematics of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In: THORPE, R.S.; WUSTER, W.; MALHOTRA, A. (Eds.). Venomous Snakes: ecology, evolution and snakebite. Oxford: Oxford University, 1997, p. 99-113.

WUSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; DUCKETT, G.J.; THORPE, R.S.; BBBSP. Mitochondrial DNA phylogeny of *Bothrops atrox* complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). Kaupia, v.8, p. 135-144, 1999.

WUSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; QUIJADAS-MASCAREÑAS, J.A. THORPE, R.S.; BBBSP. Origin and evolution of South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analyses. In: SCHUETT, G.W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. (Eds). Biology of the vipers. Utah. Eagle Mountain, 2002, p. 111-128.

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