



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

**FLEURIANE DANTAS LIRA**

**AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS SOROS COMERCIAIS BRASILEIROS  
FRENTE AO VENENO DA SERPENTE *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923)**

**CAMPINA GRANDE  
2016**

FLEURIANE DANTAS LIRA

**AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS SOROS COMERCIAIS BRASILEIROS  
FRENTE AO VENENO DA SERPENTE *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: 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.

L768a Lira, Fleuriane Dantas.

Avaliação da neutralização dos soros comerciais brasileiros frente ao veneno da serpente *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923) [manuscrito] / Fleuriane Dantas Lira. - 2016.

55 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (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. Soro antiofídico. 2. Soroterapia. 3. Acidente ofídico. 4. Envenenamento. 5. Membrana de nitrocelulose. I. Título.

21. ed. CDD 571.95

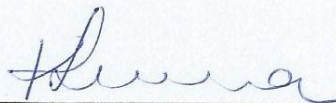
FLEURIANE DANTAS LIRA

AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS SOROS COMERCIAIS BRASILEIROS  
FRENTE AO VENENO DA SERPENTE *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923)

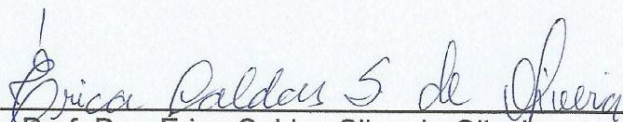
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade  
Estadual da Paraíba, em cumprimento à  
exigência para obtenção de grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 19/10/2016.

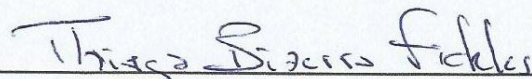
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dra. Érica Caldas Silva de Oliveira  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Thiago Bizerra Fideles  
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

À minha mãe, pela dedicação, companheirismo e amizade, DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Karla Luna pelas leituras sugeridas ao longo dessa orientação, pelo tempo e toda a dedicação;

Às minhas amigas e companheiras de turma, Camila Pimenta, Eliene Silva, Iyvynna Vidal, Mayla Dantas, pela paciência, pelas conversas, pelo apoio às minhas decisões, pela amizade ao longo da vida;

Ao grupo BioG, que me acolheu de forma inimaginável no decorrer desses quatro anos de curso;

À minha amiga e companheira de laboratório, Ellynes Nunes, pelo tempo e conhecimento compartilhado;

À professora da graduação da disciplina de Estágio Obrigatório II do Curso de Ciências Biológicas da UEPB, Roberta Marques, que contribuiu para a construção deste trabalho;

E aos demais que de uma forma ou outra, ajudaram no decorrer deste trabalho;

Obrigada.

“Os maiores avanços da humanidade não estão nas suas descobertas, mas em como essas descobertas serão aplicadas para reduzir a desigualdade.”

*Bill Gates*

## RESUMO

É estimado que cerca de 30.000 pessoas, por ano, sofram acidente ofídico no Brasil. Compreender a especificidade antígeno-anticorpo dos venenos com os soros antiofídicos além de ser um dos primeiros passos para o desenvolvimento de melhores soros com um perfil mais completo na neutralização das toxinas, também promove melhores bases para um desenvolvimento de testes rápidos na detecção do veneno ofídico, podendo vir a ser utilizado como diagnóstico no tratamento de envenenamento ofídico. Este trabalho pretendeu avaliar a eficácia da neutralização dos soros antiofídicos utilizados no Brasil, frente ao veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, propondo desenvolvimento de teste rápido para o diagnóstico de acidentes ofídicos. Os experimentos envolveram a análise de Ouchterlony em gel de agarose e uma adaptação da metodologia de Western Blot (dot-blot). A reatividade do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* foi observada com os soros antiofídico, antiofídico-laquéico e anticrotálico. A neutralização do veneno frente ao soro antiofídico foi melhor visualizada quando a proporção de soro estava de 20:1 em relação ao veneno. Apesar do resultado mostrar uma boa neutralização, uma banda específica desta espécie pode ser utilizada como marcador para envenenamentos provocados pela *B. erythromelas*. A primeira metodologia proposta como suporte sólido na detecção antígeno-anticorpo não gerou uma boa visualização, o que não deu suporte para sua continuidade. A segunda metodologia foi utilizada com a membrana de nitrocelulose, como suporte, onde esta apresentou-se promissora, atingindo os objetivos propostos de identificação do complexo antígeno-anticorpo visível a olho nu, porém em um tempo ainda grande para o esperado de um teste rápido. A serpente *Bothrops erythromelas* apresenta toxinas em seu veneno com alta capacidade coagulante, porém, não está relacionada à produção do soro comercial polivalente antiofídico brasileiro, e portanto, suas toxinas não são neutralizadas totalmente pelo soro, indicando a necessidade na produção de um soro mais eficaz contra essa espécie. Essa espécie acomete todo o bioma Caatinga e está entre as jararacas que mais causam acidente ofídico na região. A maioria destes ocorre em áreas rurais, onde o acesso aos serviços de saúde é precário e não há uma qualificação dos profissionais responsáveis pelo atendimento. Este trabalho pode ser considerado pioneiro no que concerne à fabricação de um teste rápido que consiga fazer a identificação do gênero da serpente causadora do acidente ofídico, o que indica a importância na continuidade destes estudos. Tal teste objetiva acelerar a administração da soroterapia, podendo vir a diminuir a probabilidade de sequelas e óbitos.

**Palavras-Chave:** Membrana de nitrocelulose. Imunoensaio. Envenenamento.



## ABSTRACT

It is estimated that about 30,000 people, per year, suffer from snakebite in Brazil. Understanding the antigen-antibody specificity of poisons with antiophidic sera, as well as being one of the first steps for the development of better sera with a more complete profile in neutralizing the toxins, also promotes better foundation for developing rapid tests for the detection of snake bite venom and may have to be used as a diagnosis in the treatment of snake bite poisoning. This work aimed to evaluate the effectiveness of neutralization of antiophidic sera used in Brazil against the poison of *Bothrops erythromelas* serpent, offering fast test development for the diagnosis of snakebites. The experiments involved the Ouchterlony analysis on agarose gel and an adaptation of the Western Blot method (dot-blot). The reactivity of the poison of *Bothrops erythromelas* snake was observed with the antiothropic, antiothropic-laquétrico and crotalic sera. The neutralization of venom against the antivenom serum was best seen when the whey ratio was 20: 1 in relation to the poison. Although the results show a good neutralizing, a specific band of this species can be used as a marker for poisonings caused by *B. erythromelas*. The first methodology proposed as solid support in antigen-antibody detection did not produce a good display, which has no support for its continuation. The second methodology was used to nitrocellulose membrane as support, where it appeared to be promising, achieving the goals of identifying the visible antigen-antibody complex with the naked eye, but in an even long time to expected from a rapid test. *Bothrops erythromelas* snake has toxins in their venom with high capacity coagulant, however, it is not related to the production of multi-purpose commercial serum Brazilian antivenom, and therefore their toxins are not fully neutralized by this serum, indicating the need to produce a more effective serum against this species. This species affects the entire Caatinga biome and is among the pit vipers that cause most this kind of accidents in the region. Most of these occur in rural areas where access to health services is poor and there isn't a qualification professionals responsible for the care. This work can be considered a pioneer when it comes to making a quick test you can do to identify the gender of the snake cause of snakebite, which indicates the importance of the continuation of these studies. Such test objective the speed up of the administration of antivenom, and may decrease the likelihood of sequelae and death.

Keywords: Nitrocellulose membrane. Immunoassay. Poisoning.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema I aplicado à placa de Petri .....	26
Figura 2	Esquema II aplicado à placa de Petri .....	27
Figura 3	Esquema III aplicado à placa de Petri .....	27
Figura 4	Comportamento das linhas de precipitação do veneno da Bothrops erythromelas com os soros comerciais e solução salina .....	30
Figura 5	Não-reação entre o soro de paciente e os soros comerciais .....	31
Figura 6	Teste de neutralização a partir da incubação (veneno + soro antibotrópico) .....	32
Figura 7	Resultado do teste no eppendorf .....	32
Figura 8	Padrão apresentado na membrana de nitrocelulose .....	33
Figura 9	Resultado da membrana após o teste ac-ag com incubação de 24h ..	33
Figura 10	Resultado da membrana após o teste ag-ac com incubação de 8h ....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ac-ag – anticorpo-antígeno

ag-ac – antígeno-anticorpo

e-SIC – Sistema Eletrônico do Serviço de Informação ao Cidadão

F(ab')<sub>2</sub> – Fração isolada de Imunoglobulina

PBS – Tampão Salina Fosfato

PBS tween – Tampão Salina Fosfato + detergente tween

pool – Mistura das 5 espécies de Bothrops utilizadas na fabricação do soro antiofídico brasileiro

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SAB – Soro antibotrópico

SABC – Soro antibotrópico-crotálico

SABL – Soro antibotrópico-laquélico

SAC – Soro anticrotálico

SAE – Soro antielapídico

SP – Soro de paciente

SS – Solução salina

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

## LISTA DE SÍMBOLOS

g/dL - Grama por decilitro

kDa - Kilodalton

mg - Miligramo

mL - Mililitro

mM - Milimolar

$\mu$ L - Microlitro

$\mu$ m - Micrómetro

% - Por ciento

$^{\circ}$ C – Graus Celsius

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	16
3.1 <i>Evolução das serpentes</i> .....	16
3.2 <i>Componentes Proteicos dos Venenos Ofídicos</i> .....	17
3.3 <i>Componentes do Veneno do Gênero Bothrops</i> .....	17
3.3.1 Metaloproteinases .....	17
3.3.2 Serinoproteases .....	17
3.3.3 Fosfolipases .....	18
3.3.4 Desintegrinas .....	18
3.3.5 Miotoxinas .....	18
3.4 <i>Soroterapia</i> .....	19
3.5 <i>Bothrops erythromelas (Amaral, 1923)</i> .....	20
3.6 <i>Análise de Ouchterlony</i> .....	20
3.7 <i>Metodologia de Western Blotting</i> .....	21
3.7.1 Técnica de Dot-blot .....	22
3.8 <i>Membrana de Nitrocelulose</i> .....	22
3.8.1 A membrana de nitrocelulose como suporte sólido .....	22
3.9 <i>Concentração de Proteínas no Soro Comercial</i> .....	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
4.1 <i>Local</i> .....	25
4.2 <i>Amostra de Pacientes</i> .....	25
4.3 <i>Obtenção do Veneno</i> .....	25
4.4 <i>Obtenção dos Soros Comerciais Brasileiros</i> .....	25
4.5 <i>Imunodifusão Dupla</i> .....	26
4.5.1 Veneno x Soro Comercial .....	26
4.5.2 Soro de Paciente x Soro Comercial .....	26
4.5.3 Incubação do Veneno + Soro Comercial .....	27
4.6 <i>Proposta de Nova Metodologia para a Identificação do Veneno Ofídico em Suporte Sólido (utilizando eppendorf)</i> .....	27

4.7 Adaptação do Método de Western Blotting .....	28
4.8 Aspectos Éticos.....	29
4.9 Reagentes .....	29
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 Veneno x Soro comercial .....	30
5.2 Soro de paciente x Soro comercial .....	30
5.3 Incubação do veneno + Soro comercial .....	31
5.4 Primeira Metodologia Testada para a Fabricação de um Teste Rápido de Diagnóstico de Acidente Ofídico.....	32
5.5 Adaptação do Método de Western Blotting .....	33
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
ANEXOSANEXO A – RESPOSTA DO e-SIC SOBRE OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	53
ANEXO B – PROTOCOLO DE WESTERN BLOTTING QUE INSPIROU A METODOLOGIA UTILIZADA NESTE TRABALHO .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

A epidemiologia dos acidentes ofídicos apresenta um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos no Brasil (BOCHNER & STRUCHINER, 2003). Com várias medidas instituídas pelo Ministério da Saúde, os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação obrigatória no país. Além da troca de informações epidemiológicas entre as Secretarias Estaduais e o Ministério da Saúde, os dados sobre ofidismo foram aprimorados, mostrando características epidemiológicas e clínicas que permitiram o planejamento de ações de controle (LEMOS *et al.*, 2009).

Katsuriatne *et al.* (2008) estimou que no Brasil, ocorriam cerca de 30.000 acidentes ofídicos por ano. Esses dados vão de acordo ao dados epidemiológicos do SINAN (2015), que também mostram um aumento no número de casos notificados de acidentes ofídicos no Brasil durante o período de 2007 a 2014. Informações disponíveis on-line no site do SINAN apontam o predomínio dos acidentes botrópicos no estado da Paraíba, sendo 6 vezes maior que os acidentes crotálicos e 16 vezes maior que os acidentes elapídicos, durante os anos de 2007 a 2015 (SINAN, 2015). Bernarde (2014) ressalta que em todas as regiões brasileiras ocorre o predomínio do acidente botrópico, variando sua incidência de acordo com a região.

Dentre a diversidade de famílias de serpentes encontradas no Brasil, apenas duas apresentam espécies peçonhentas com maior potencial de causar envenenamento nos seres humanos: Viperidae, enfatizando a subfamília Crotalinae na qual os gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias* (Jararacas), *Crotalus* (Cascavéis) e *Lachesis* (Surucucu-pico-de-jaca) estão inclusos; e Elapidae, sendo representada pelas serpentes popularmente conhecidas como corais verdadeiras, enquadradas na subfamília Elapinae, nos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (BERNARDE, 2014; FRANCO, 2009; MELGAREJO, 2009).

As espécies do gênero *Bothrops*, mais significativas para a saúde pública no Brasil, são muito abundantes, com ampla distribuição geográfica e com populações importantes nas diversas regiões do país (MELGAREJO, 2009). Essas serpentes compreendem as mais importantes do ponto de vista médico, sendo seus venenos os mais estudados clínica e imunologicamente (BRASIL, 2001; FRANÇA & MÁLAQUE, 2009).

Envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Crotalus* são caracterizados por ação neurotóxica, miotóxica e coagulante (AZEVEDO-MARQUES *et. al*, 2009; BRASIL, 2001).

O gênero *Lachesis* abriga as serpentes peçonhentas de maiores dimensões das Américas, com espécimes de até quatro metros (BERNARDE, 2014). O veneno laquético apresenta atividades fisiopatológicas semelhantes às do veneno botrópico, sendo proteolítica, coagulante, hemorrágica e inflamatória aguda, neurotóxica (atividade da cininogenase em *L. muta*, trombina com similaridade com a gioxina crotálica e atividade ativadora de plasminogênio), inibição plaquetária e atividade miotóxica local (BERNARDE, 2014; BRASIL, 2001; SOUZA, 2009).

Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* possuem ação neurotóxica e miotóxica (BRASIL, 2001; SILVA JR & BUCARETCHI, 2009).

A completa caracterização dos proteomas dos venenos de serpentes pode contribuir para uma compreensão mais profunda da fisiopatologia dos envenenamentos. Compreender a especificidade antígeno-anticorpo dos venenos com os soros antiofídicos é um dos primeiros passos para o desenvolvimento de melhores soros com um perfil mais completo na neutralização das toxinas (CALVETE *et. al*, 2009).

A avaliação da neutralização dos soros comerciais brasileiros das diferentes espécies do gênero *Bothrops* pode comprovar a diversidade molecular presente nas espécies deste gênero. O nível de neutralização do soro para as toxinas encontradas no veneno da *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923) pode indicar a necessidade de uma terapia mais eficaz para os acidentes ocorridos com esta espécie, visto que o mesmo tratamento apresenta diferentes resultados quando submetidos a venenos de outras espécies que já estão inclusas na produção desses soros comerciais (CAMEY *et. al*, 2002).

Estudos mostram que existe uma banda específica no veneno da *Bothrops erythromelas* que não é neutralizada pelo soro antibotrópico, mesmo após 24 horas a soroterapia, podendo ser utilizado como um biomarcador para envenenamentos ocasionados por esta espécie (LUNA, 2010; LUNA *et al.*, 2010; NUNES, 2016). Frente ao exposto, busca-se com o desenvolvimento dessa pesquisa analisar a ação de neutralização de soros com o veneno desta serpente, além de buscar formas para a fabricação de um teste rápido de diagnóstico.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de neutralização dos soros antiofídicos utilizados no Brasil, frente ao veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, na perspectiva de desenvolver um teste rápido para o diagnóstico de acidentes ofídicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar o grau de neutralização do soro antiofídico comercial utilizado no Brasil quando incubado com o veneno da serpente *Bothrops erythromelas*;
- Comparar a neutralização apresentada pelo soro antiofídico comercial com a neutralização alcançada em outros estudos frente a diferentes espécies do gênero *Bothrops*;
- Elaborar um método rápido para a detecção de veneno ofídico em suporte sólido.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 *Evolução das serpentes*

As serpentes são agrupadas junto aos representantes da subordem Scleroglossa. A remodelação da massa corpórea de um vertebrado em forma serpentina foi acompanhada por especializações dos mecanismos de locomoção, captura de presas e deglutição. Os mais antigos fósseis parecem estar relacionados às jiboias, no Cretáceo. Os representantes mais antigos de Elapidae e Viperidae datam do Mioceno (POUGH, 2008).

A constrição é característica marcante na família Boidae. Seus representantes possuem vértebras e músculos curtos, a contração destes produz dobras pronunciadas no tronco, permitindo uma forte pressão contra a presa ao enrolar-se em volta dela. No entanto, essa morfologia limita a velocidade de locomoção. As serpentes velozes (Colubridae) datam do Mioceno e levavam vantagem sobre as Boidae, envolvendo uma evolução entre a locomoção e a alimentação (POUGH, 2008).

A glândula de Duvernoy produz substâncias tóxicas que imobilizam a presa. A presença desta glândula na maxila superior das espécies atuais de colubrídeos é compreendida como uma característica homóloga às glândulas de veneno dos Viperidae e Elapidae (POUGH, 2008). A capacidade de injetar as substâncias tóxicas é um dos métodos mais especializados de alimentação dentre os vertebrados (FRANCO, 2009). Os aparatos inoculadores das serpentes são caracterizados por quatro variedades de presas: áglifas, opistóglifas, proteróglifas e solenóglifas (POUGH, 2008).

As serpentes de dentição áglifa apresentam um maxilar sem dentes sulcados para a inoculação do veneno. As que contêm dentição opistóglifa possuem um ou mais dentes aumentados na região posterior da maxila superior, com a presença de um sulco na superfície da presa que ajudam na condução do veneno através da capilaridade. Aquelas com a dentição proteróglifa, possuem as presas inoculadoras fixamente eretas na região anterior da boca, geralmente com um canal não completamente fechado que estão conectados à glândula de veneno. As serpentes que portam dentição solenóglifa apresentam o tipo de dentição mais especializado, no qual as presas têm a capacidade de rotação, de modo a dobrar-se contra o teto da boca quando as maxilas estão fechadas. As presas são longas e ocas,

perfeitamente canaliculadas, diretamente ligadas à glândula de veneno, podendo injetá-lo profundamente no tecido da presa (BERNARDE, 2014; FRANCO, 2009; MELGAREJO, 2009; POUGH, 2008).

### 3.2 Componentes Proteicos dos Venenos Ofídicos

Venenos de serpentes contêm diferentes peptídeos e proteínas biologicamente ativas. Um determinado número destas proteínas interage com os componentes do sistema hemostático humano. Os componentes hemostaticamente ativos são amplamente distribuídos nos diferentes tipos de serpentes, como nas famílias Viperidae e as Elapidae, e podem ser agrupados em números diferentes de categorias dependendo de sua função hemostática, como por exemplo: enzimas que causam coágulo, que degradam fibrinogênio, com atividade hemorrágica; ativadores de fator V, X; atividades anticoagulantes; inibidores de enzima; e indutores/inibidores da agregação plaquetária. Embora diversos venenos contenham uma série de componentes ativos hemostaticamente, nenhum veneno contém todos eles juntos (BRAUD *et al.*, 2000; MARKLAND, 1998).

### 3.3 Componentes do Veneno do Gênero *Bothrops*

#### 3.3.1 Metaloproteinases

As metaloproteinases de veneno de serpentes compreendem um grande grupo de proteases dependentes de zinco, e outros elementos, que são responsáveis pela indução de hemorragia, mionecrose, danos na pele e inflamação, ativação de endógenos de metaloproteinases de matriz e liberam uma variedade de mediadores inflamatórios. Além de degradarem os componentes da matriz extracelular e prejudicar a regeneração do músculo esquelético lesado, algumas metaloproteinases também afetam a função plaquetária e degradam fatores de coagulação do sangue, impedindo uma resposta hemostática normal após dano microvascular (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

#### 3.3.2 Serinoproteinases

As serinoproteinases encontradas no veneno de serpentes podem agir sobre os substratos macromoleculares dos sistemas de coagulação, fibrinólise e sistema calicreína-cininas, além da agregação plaquetária e degradação proteolítica

(SERRANO & MAROUN, 2005). Entre as serinoproteases, apenas os ativadores de proteína C exibem efeitos anticoagulantes diretos (KINI, 2006).

### 3.3.3 Fosfolipases

As fosfolipases  $A_2$  encontradas no veneno de serpentes desempenham um papel central importante no metabolismo basal dos fosfolipídios de todas as células. Elas são classificadas em dois grupos de acordo com suas estruturas primárias: no grupo I estão incluídas as fosfolipases  $A_2$  dos venenos das Elapidae e no grupo II estão classificadas as fosfolipases  $A_2$  das Viperidae (DENNIS, 1994; PÁRAMO *et al.*, 1998).

As fosfolipases  $A_2$  desencadeiam uma cascata inflamatória caracterizada pelo aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema, recrutamento de leucócitos para os tecidos e liberação de mediadores inflamatórios, iniciando desordens inflamatórias locais e sistêmicas em humanos (KOH *et al.*, 2006). Essas moléculas exercem os seus efeitos anticoagulantes através da hidrólise e destruição física da superfície de membrana requerida para a formação de complexos de coagulação. A atividade anticoagulante de certas enzimas de fosfolipases  $A_2$  é devido à sua interação com as proteínas de coagulação do sangue e não com as de hidrólise de fosfolipídios (KINI, 2006).

### 3.3.4 Desintegrinas

As desintegrinas encontradas no veneno de serpentes são peptídeos de baixo peso molecular que se ligam às integrinas, proteínas de superfície celular responsáveis pelas interações entre as células. As integrinas são essenciais para a sobrevivência (proliferação, diferenciação e ativação) celular. Assim, as desintegrinas interferem na ligação intercelular, podendo bloquear o principal receptor de fibrinogênio (GPII/IIIa), mediador da agregação plaquetária (CALVETE *et al.*, 2005; ROJNUCKARIN, 2008).

### 3.3.5 Miotoxinas

As miotoxinas são também chamadas de toxinas mionecróticas e são encontradas em venenos de serpentes. Uma das mais conhecidas é a miotoxina-a, que se liga especificamente ao retículo sarcoplasmático dos músculos, causando uma alteração na permeabilidade iônica do retículo sarcoplasmático, levando ao

inchaço e desintegração de ambos os retículos e fibras musculares (KOH *et al.*, 2006). A maior atividade miotóxica do gênero *Bothrops* pertence à espécie *B. jararacussu* (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991).

### 3.4 Soroterapia

O veneno é uma mistura complexa de enzimas, proteínas e peptídeos que tem como função primária ajudar na captura de presas, porém pode ser secundariamente usado como defesa, causando acidentes em seres humanos e animais domésticos (CHIPPAUX *et al.*, 1991; POUGH, 2008; BERNARDE, 2014; MELGAREJO, 2009). A variação na sua composição ocorre em diversos níveis, incluindo interfamília, intergênero, interespecie, intersubspecie e intraespecie (CALVETE *et al.*, 2011; CASEWELL *et al.*, 2014; CHIPPAUX *et al.*, 1991; FURTADO *et al.*, 2010).

A criação da soroterapia específica no Brasil ofereceu à Medicina, pela primeira vez, um produto realmente eficaz no tratamento do acidente ofídico que, sem substituto, permanece salvando centenas de vidas até hoje. O tratamento é feito por meio da aplicação do soro antiofídico específico para cada tipo de acidente e de acordo com a gravidade do envenenamento (BERNARDE, 2014).

Para cada gênero de serpente, há um soro específico: O soro antibotrópico é indicado para acidentes ofídicos envolvendo os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias*; o soro antibotrópico-laquético, para os gêneros *Bothrops* e *Lachesis*, o soro anticrotálico para o gênero *Crotalus* e; o soro antielapídico para os gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*. Há também o soro antibotrópico-crotálico para ser utilizado em casos de não determinação sobre o envenenamento ter sido causado por alguma espécie de *Bothrops* ou *Crotalus* em regiões onde essas espécies estão presentes simultaneamente (BERNARDE, 2014).

A realização da soroterapia o mais rápido possível, com o devido atendimento em um hospital, é o tratamento mais recomendado. Porém, a ineficácia dos antivenenos na neutralização de efeitos locais é limitada, o que abriu espaço para investigações sobre possíveis drogas a serem associadas à soroterapia (WEN, 2009).

Os aspectos clínicos e imunológicos dos envenenamentos ajudam a compreender a evolução do paciente, visando novas terapias (LUNA, 2010). O desenvolvimento da soroterapia específica está relacionado com um conhecimento

detalhado da composição do veneno e do perfil imunológico estabelecido por cada um (CALVETE *et al.*, 2009).

### 3.5 *Bothrops erythromelas* (Amaral, 1923)

A *Bothrops erythromelas*, também conhecida como jararaca-da-seca ou jararaca-avermelhada, apresenta uma ampla distribuição nas áreas de caatinga e é considerada uma das espécies de menor porte do gênero *Bothrops* (MELGAREJO, 2009; REIS *et al.*, 2015). Essa espécie ocorre principalmente no bioma caatinga (REIS *et al.*, 2015), aonde possui ampla abrangência geográfica e alta possibilidade de encontro com a população humana (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009). A mesma é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Nordeste do Brasil e seu veneno não está incluído na produção dos soros antiofídicos (BOECHAT *et al.*, 2001).

O veneno desta espécie possui um dos mais potentes fatores de ativação de coagulação (fator X e protrombina) quando comparado às outras espécies do mesmo gênero (FURTADO *et al.*, 1991; QUEIROZ *et al.*, 2008), além de uma alta atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (FERREIRA *et al.*, 1992b, FLORES *et al.*, 1993). Miotoxinas básicas ainda não foram detectadas no veneno da *Bothrops erythromelas* e de outras três espécies do mesmo gênero (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991). Seu veneno exibe ainda um padrão interessante de coagulação: *in vitro*, há uma elevada ação trombotrófica sobre o plasma e nenhuma ação na coagulação do fibrinogênio, enquanto que *in vivo*, há uma atividade anticoagulante (SANCHEZ *et al.*, 1992).

O primeiro ativador de protrombina clonado, derivado do veneno da *Bothrops erythromelas* foi nomeado "berythraactivase". Este apresenta uma elevada semelhança estrutural com outras metaloproteinases, indicando envolvimento nos efeitos de lesão local e efeitos sistêmicos observados nos acidentados por acidente botrópico (SILVA *et al.*, 2003).

### 3.6 *Análise de Ouchterlony*

No final da década de 40, o biólogo sueco Orjan Ouchterlony inventou um experimento simples com o qual era possível investigar a química da imunidade biológica. O teste envolve o uso de dois tipos complexos de proteína: antígeno e anticorpo. Esse método é interessante, pois pode-se verificar a reação de vários antígenos e anticorpos sem o risco de infecção acidental ou o uso de animais

experimentais. Ouchterlony usou um bloco de ágar com poços no qual colocou algumas gotas de uma solução contendo o antígeno em um poço e uma quantidade de solução de anticorpo no outro. Por meio de uma superfície gelatinosa, é possível ver a reação de neutralização do ag-ac em uma zona intermediária através de um precipitado (uma linha) esbranquiçado (STONG, 1969).

O experimento de Ouchterlony pode ser usado para observar a capacidade do anti-soro para a produção de complexos imunes com o antígeno numa matriz semi-sólida. Este método também pode ser usado para testar a reatividade cruzada do anti-soro para outras proteínas intimamente relacionados com o antígeno (BURNS, 2002).

### 3.7 Metodologia de Western Blotting

A técnica que viria a ser chamada de Western Blotting por Burnette em 1981, foi detalhada, pela primeira vez, por Harry Towbin e seus colegas do Instituto Friedrich Miescher, em Basileia, Suíça, em 1979 (PERKEL, 2015). Foi demonstrado que as proteínas imobilizadas em folhas de nitrocelulose podem ser utilizadas para detectar os seus respectivos anticorpos (TOWBIN *et al.*, 1979). Tal técnica é muito sensível para a visualização dos complexos ag-ac (BURNETTE, 1981). O procedimento foi desenvolvido, primeiramente, para detectar os anti-soros específicos contra proteínas ribossomais, no entanto, é aplicável a qualquer procedimento analítico de acordo com a formação de um complexo ag-ac (TOWBIN *et al.*, 1979).

A técnica é uma simples forma de identificar as proteínas num gel de poliacrilamida, que são separadas por tamanho. Quando transferidas para a membrana de nitrocelulose, as proteínas são incubadas com o "primeiro anticorpo" que é uma proteína de interesse específico, e então é adicionado um "segundo anticorpo" que é capaz de reconhecer o primeiro anticorpo (PERKEL, 2015).

A utilidade do blotting baseia-se na sua capacidade para fornecer resolução simultânea de múltiplos antígenos imunogênicos dentro de uma amostra, o que é um importante diferença da maioria dos métodos imunquímicos atuais (KURIEN & SCOFIELD, 2006).

### 3.7.1 Técnica de Dot-blot

Dot-blot é uma variação dos métodos de northern, southern ou western blot, na qual o antígeno é detectado em amostras diretamente pingadas sobre a membrana, sem que haja uma prévia separação destas. Existem outros tipos de membranas disponíveis comercialmente, como as de nylon catiônicos, as Gene-Screen e as Biodyne B, porém a membrana de nitrocelulose ainda é a mais utilizada em western blotting (STOTT, 1989).

Estudos mostram que o dot-blot é tecnicamente tão confiável quanto uma transferência de Western, que é uma técnica padrão utilizada para a validação de biomarcadores de proteína, para um largo espectro de proteínas diferentes (GUILLEMIN *et al.*, 2009).

Essa técnica apresenta uma sensibilidade até dez vezes maior que a técnica de rádioimunoensaio, além de não necessitar de grandes quantidades de amostra para o experimento (ANDERSON *et al.*, 1985).

### 3.8 Membrana de Nitrocelulose

A membrana de nitrocelulose é constituída geralmente de papel e alterada quimicamente com grupos nitro ligados à celulose, produzindo um suporte com alta afinidade por proteínas, fazendo com que estas permaneçam presas à sua superfície (LENZ, 2004). Ela é uma matriz com alta habilidade de bloqueio e compatível com uma vasta variedade de métodos de detecção, como a quimioluminescência e a fluorescência (GE Healthcare Life Sciences, 2016).

A adsorção das proteínas depende de várias interações físico-químicas entre as moléculas de proteína e da membrana (LOW *et al.*, 2013). Acredita-se que a base dessas interações para a ligação de proteínas na nitrocelulose possa ser em grande parte devido às interações hidrofóbicas, levando em consideração a utilização de tampões de lavagem contendo detergentes, a fim de reduzir as ligações não específicas (HAWKES *et al.*, 1982; STOTT, 1989). A etapa na qual se usa o leite em pó desnatado no experimento tem a finalidade de minimizar a ligação de proteínas não específicas (LENZ, 2004).

#### 3.8.1 A membrana de nitrocelulose como suporte sólido

Desde quando começaram os testes com a membrana de nitrocelulose, seus resultados forneceram considerado conhecimento para o desenvolvimento de novos



diagnósticos sofisticados. Com o passar do tempo, as melhorias nos ensaios impulsionaram-na como uma nova ferramenta para o diagnóstico médico, podendo ser utilizada tanto em hospitais com acesso à altas tecnologias quanto em clínicas rurais, onde os recursos são limitados devido a limitações de infraestrutura (FRIDLEY *et al.*, 2013).

Testes rápidos usados em diagnósticos são utilizados em situações em que os resultados dos testes devem ser fornecidos de volta para indivíduos no local, no mesmo dia. Além de não requererem um profissional altamente qualificado para sua condução, alguns resultados estão disponíveis em até 5 minutos (IWEALA, 2004).

Os testes com a membrana de nitrocelulose apresentam algumas vantagens: (1) A quantidade de antígeno utilizado é bastante reduzida, (2) a nitrocelulose permite que a reação seja vista contra um fundo que deve ser quase branco, tornando mais fácil detectar reações positivas e rejeitar os falsos positivos (HAWKES *et al.*, 1982), (3) a rapidez do teste, (4) a alta sensibilidade do resultado, (5) a reprodutibilidade, não necessitando de equipamentos caros para sua elaboração, (6) a adsorção de proteínas (ANDERSON *et al.*, 1985; FRIDLEY *et al.*, 2013; RODRIGUE *et al.*, 1989; ZEDER-LUTZ *et al.*, 2006), (7) o baixo custo, (8) a fácil fabricação (HU *et al.*, 2014), e (9) a capacidade de permitir que um maior número de amostras possam ser analisadas em um único experimento, quando comparada ao Western Blot (GUILLEMIN *et al.*, 2009).

A técnica do dot-blot foi utilizada para detectar 12 anticorpos ao HIV em indivíduos soropositivos e soronegativos, tendo a sua sensibilidade sido equiparada ao micro ELISA e ao Western blot por (XU *et al.*, 1989). Há testes para o diagnóstico de HIV onde a amostra é absorvida numa “almofada”, onde ele imediatamente combina-se com um reagente de sinal. A combinação reagente sinal amostra migra através de uma membrana de nitrocelulose e se o teste for positivo, uma linha aparece na membrana (IWEALA, 2004).

Um teste promissor "pronto-para-uso", baseado em um antígeno recombinante (rK39) específico para pacientes com leishmaniose visceral, foi desenvolvido como um teste rápido para utilização em condições difíceis de campo, tendo em vista a detecção de anticorpos presentes no sangue, utilizando a membrana de nitrocelulose como suporte, aonde a reação ag-ac aparecia visível a olho nu na tira da membrana (SUNDAR & RAI, 2002).

Experimentos demonstram o dot-blot como uma técnica válida para sua utilização com biomarcadores (GUILLEMIN *et al.*, 2009), podendo ser usado em testes de rotina (ANDERSON *et al.*, 1985).

### 3.9 Concentração de Proteínas no Soro Comercial

A quinta edição da farmacopeia europeia apresenta uma monografia geral para soros antiofídicos na qual recomenda que o teor máximo de proteínas presentes no soro seja de 10g/dL, além de testes de potência biológica, físico-químico específicos e um ensaio para avaliar a formação de agregados. Já a quarta edição da farmacopeia brasileira recomenda um ensaio de potência, enfatizando que a mais importante para a avaliação de pureza é o teor de proteína total, adotando o limite de 15 g/dL (50% maior que o recomendado pela farmacopeia europeia) (SILVA, 2008).

Destaca-se que na farmacopeia brasileira não há recomendação de um ensaio para avaliar quanto da proteína presente no soro corresponde ao fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que é responsável pela proteção contra o efeito tóxico do veneno, assim como também não há uma recomendação da avaliação da formação de agregados (SILVA, 2008).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local

Os experimentos foram realizados no espaço do Laboratório de Mutagênese Ambiental (NUMA), localizado no primeiro andar do prédio das Três Marias (Biologia), na Universidade Estadual da Paraíba, no campus I em Campina Grande – PB, Brasil.

### 4.2 Amostra de Pacientes

As amostras utilizadas nesta pesquisa foram os soros de pacientes envenenados por serpentes da espécie *Bothrops erythromelas*, atendidos no Hospital de Trauma de Campina Grande. Tais amostras já foram catalogadas e utilizadas em experimentos anteriores.

### 4.3 Obtenção do Veneno

O veneno da *B. erythromelas* foi extraído manualmente de espécimes mantidas em cativeiro, provenientes do Centro de Répteis da Caatinga, localizado na zona rural da cidade de Puxinanã, PB. Foram selecionados animais adultos e filhotes de ambos os sexos. O veneno, após liofilização, foi mantido sob refrigeração (-20°C) até o momento de sua utilização.

### 4.4 Obtenção dos Soros Comerciais Brasileiros

Os soros comerciais foram doados pela Secretaria de Saúde do estado de Pernambuco.

Segundo a bula de cada soro antiofídico, também disponíveis on-line, o SAB neutraliza o mínimo de 50mg de veneno a cada 10mL, tendo a *Bothrops jararaca* como referência. O SABL neutraliza o mínimo de 80mg de veneno a cada 10mL, tendo como referência as *Bothrops jararaca* e *Lachesis muta*, sendo 50mg para a *B. jararaca* e 30 mg para a *L. muta* como referência. O SAC neutraliza mínimo de 15mg de veneno a cada 10mL, tendo a *Crotalus durissus terrificus* como referência. O SAE neutraliza mínimo de 15mg de veneno a cada 10mL, tendo a *Micrurus frontalis* como referência.

#### 4.5 Imunodifusão Dupla

Essa metodologia foi inspirada em Paula (1995) que descreve parâmetros específicos para o método de Ouchterlony.

O experimento foi realizado em placas de Petri, contendo gel de agarose a 2% em água destilada com sete orifícios de distância (1,5cm) entre si. As placas foram incubadas por 48h em temperatura ambiente. Depois de lavadas com água destilada e NaCl à 150mM, as placas foram levadas à estufa com 37°C por 24h.

As linhas de precipitação foram reveladas por Coomassie Brilliant Blue 250-R a 0,12% em solução de metanol a 40% e ácido acético glacial a 7% em água destilada durante 15 minutos. O excesso de corante foi retirado por oito lavagens sucessivas de 10 minutos cada, com solução descorante (metanol a 40% e ácido acético glacial a 7% e água destilada). A leitura do resultado foi possível a olho nu.

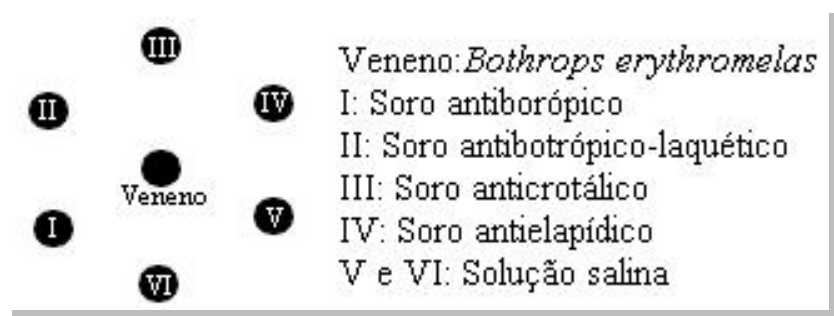
Todos os testes envolvendo essa metodologia foram realizados em duplicata.

##### 4.5.1 Veneno x Soro Comercial

No orifício central colocou-se 10 $\mu$ L do veneno da *Bothrops erythromelas* em uma concentração de 0,5mg/mL. Nos orifícios periféricos foram utilizados 10 $\mu$ L do soro antiofídico (SAB, SABL, SAC, SAE) e controle (SS).

Tendo suas respectivas espécies como referência, o SAB supostamente neutralizaria no mínimo 0,05mg do veneno, enquanto que o SABL neutralizaria 0,08mg, e os SAC e SAE neutralizariam 0,015mg.

Figura 1: Esquema I aplicado à placa de Petri.



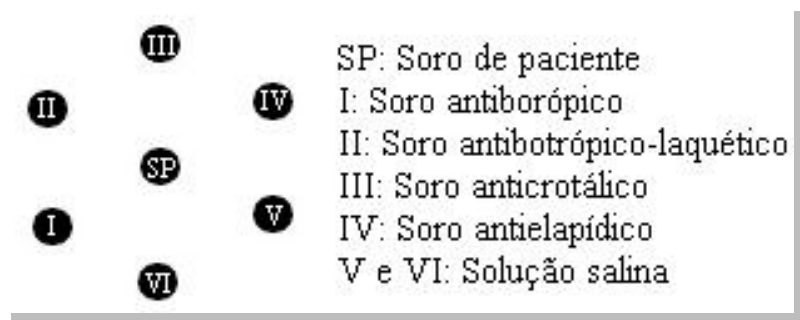
Fonte: Elaborado pela autora

##### 4.5.2 Soro de Paciente x Soro Comercial

No orifício central colocou-se 20 $\mu$ L de soro de paciente. Nos orifícios periféricos foram utilizados 10 $\mu$ L do soro antiofídico (SAB, SABL, SAC, SAE) e

controle (SS). Os soros dos pacientes utilizados neste teste foram coletados logo após a administração do soro antiofídico.

Figura 2: Esquema II aplicado à placa de Petri.

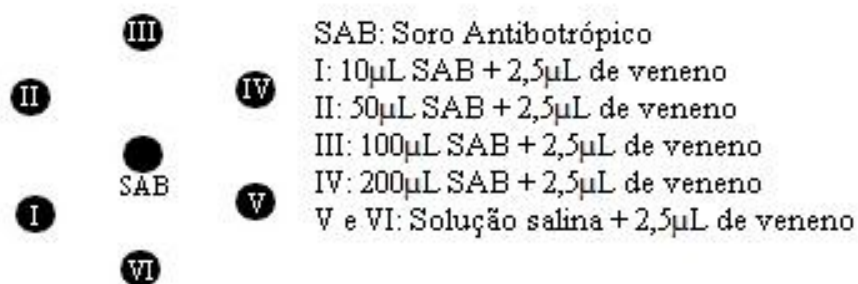


Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.5.3 Incubação do Veneno + Soro Comercial

A incubação do veneno com o soro antibotrópico foi feita em diferentes proporções e permaneceu por 30 minutos em banho Maria a 37°C antes de ser aplicada à placa de Petri. No orifício central colocou-se 10µL do soro comercial antibotrópico. Nos orifícios periféricos, foram aplicados 10µL da incubação do veneno da *Bothrops erythromelas* + o soro antibotrópico.

Figura 3: Esquema III aplicado à placa de Petri.



Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.6 Proposta de Nova Metodologia para a Identificação do Veneno Ofídico em Suporte Sólido (utilizando eppendorf)

Com base em conhecimentos oriundos de trabalhos prévios realizados pelo grupo da Profa. Dra. Karla Luna, e considerando as referências na área, objetivou-se criar uma metodologia rápida e de baixo custo como um método para a identificação

da serpente causadora do acidente, para os locais onde há atendimento de acidentes ofídicos.

Dessa maneira, foram realizados diferentes testes com o único objetivo de identificar a ligação ag-ac em um suporte sólido, que permitisse a identificação dos diferentes tipos de soro antiofídicos fabricados no Brasil.

Seguindo a metodologia de Ouchterlony, inspirada em Paula (1995), em placas de Petri, foi adicionado 1mL de gel de agarose seguido de 10uL de veneno e homogeneizado. Com o gel solidificado, foi feito um halo com uma ponteira de pipeta e adicionado o soro comercial.

#### *4.7 Adaptação do Método de Western Blotting*

Com a finalidade de produzir um método rápido de identificação da serpente causadora do acidente ofídico, foi adaptada a metodologia do Western Blotting (Anexo B), que é eficiente em detectar o complexo de ag-ac formado pelo veneno das serpentes e os soros antiofídicos, porém, não faz o uso da eletricidade e é inteiramente manual/física. A membrana de nitrocelulose é cortada em pequenos pedaços e segue o protocolo (Anexo B) a partir da etapa do bloqueio com o leite desnatado, sendo corada e descorada ao final do procedimento.

Cada pedaço da membrana de nitrocelulose foi cortado com um tamanho aproximado de 1,2cm x 0,7cm, sendo cada pedaço submergido com leite desnatado à 5% em PBS Tween à 0,05%, durante uma hora, em temperatura ambiente, com agitação leve. Após lavadas apenas com o PBS Tween 0,05% por 10 minutos em agitação leve, as membranas foram postas em placas de petri com o lado de dentro (marcado com lápis grafite) virado para cima. Após secar em temperatura ambiente, foi aplicado 5µL do veneno (primeiro anticorpo do protocolo) por 8 horas, numa temperatura entre 6 e 10°C. As membranas foram lavadas novamente duas vezes com o PBS Tween 0,05% por 10 minutos cada vez e após secar em temperatura ambiente, foram aplicados 10µL do soro antiofídico (segundo anticorpo do protocolo), a incubação durou uma hora em temperatura ambiente. Após a incubação do soro, as membranas foram lavadas duas vezes apenas com o PBS Tween 0,05% por 10 minutos cada vez em agitação leve, e uma vez com o Tris-HCl (0,1M; pH 7,5) por 10 minutos. As membranas foram coradas com o Ponceau por 5 minutos e descoradas apenas com água destilada. A leitura do resultado foi possível

a olho nu. A membrana de nitrocelulose utilizada neste experimento apresentava o tamanho do poro de 0,45µm.

Todos os testes envolvendo essa metodologia foram realizados em duplicata.

#### *4.8 Aspectos Éticos*

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.

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).

#### *4.9 Reagentes*

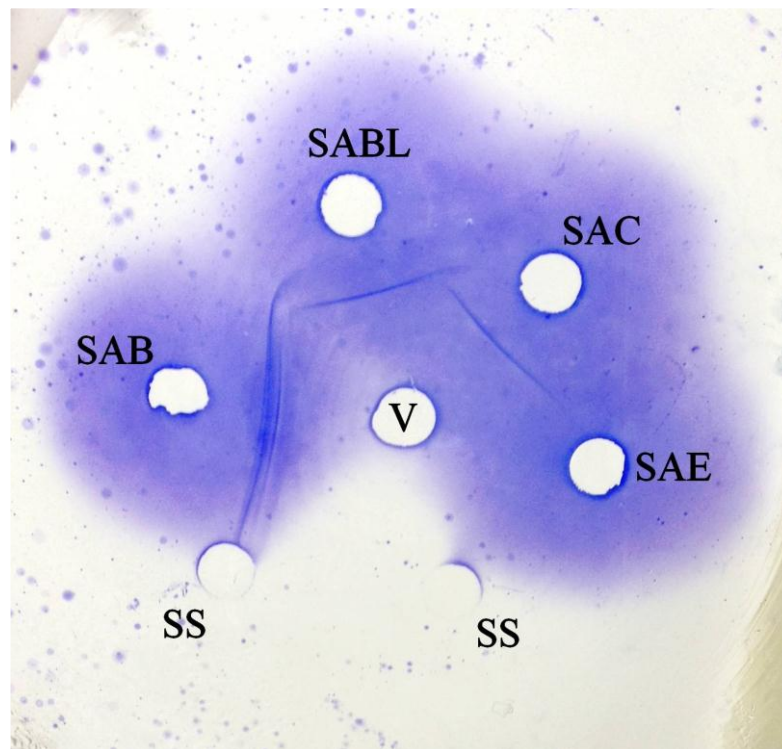
Agarose, coomasie brilliant blue 250-R, metanol, ácido acético glacial, NaCl, água destilada, PBS, tween, leite desnatado (Molico), tris, HCl, ponceau, membrana de nitrocelulose, veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, soro comercial (antibotrópico, antibotrópico-laquétrico, anticrotálico, antielapídico), solução salina e soro de paciente.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Veneno x Soro comercial

Os dados apresentados a seguir evidenciam os resultados da reatividade do veneno com os soros testados. A figura 4, destaca os resultados encontrados nos testes do veneno de *B. erythromelas* com os soros comerciais, cuja finalidade foi observar o comportamento expresso por linhas de precipitação. Os soros utilizados nos orifícios periféricos correspondentes aos soros antitoxinogênico (SAB), antitoxinogênico-laquéutico (SABL) e antitoxinogênico (SAC) apresentaram a formação do complexo ag-ac com diferentes graus. Não foi vista nenhuma reatividade entre o veneno e os poços referentes ao soro antielapídico (SAE) e à solução salina (SS). A linha de precipitação era visível mesmo antes da utilização do corante.

Figura 4: Comportamento das linhas de precipitação do veneno da *Bothrops erythromelas* com os soros comerciais e solução salina.



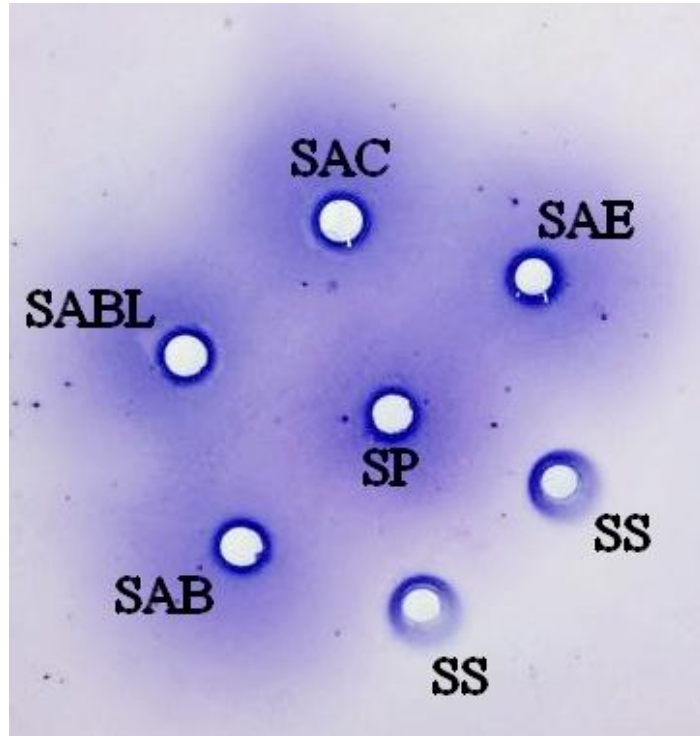
### 5.2 Soro de paciente x Soro comercial

O teste teve como objetivo avaliar a reatividade entre o soro comercial e o veneno contido no sangue de pacientes, com a primeira coleta de sangue antes de



ser administrado o soro antiofídico. A figura 5 mostra que não houve a formação de complexos entre os halos.

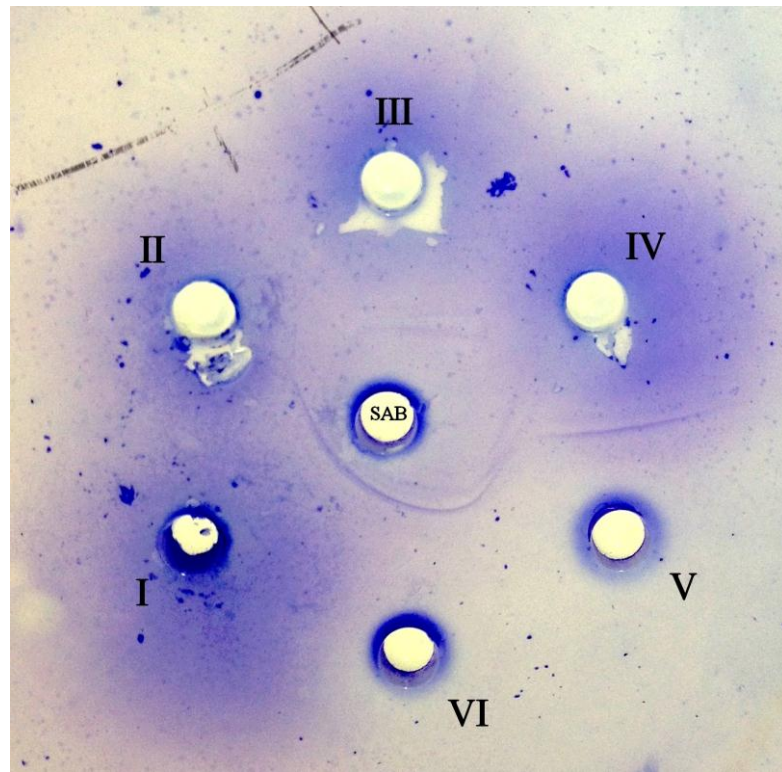
Figura 5: Não-reação entre o soro de paciente e os soros comerciais.



### 5.3 Incubação do veneno + Soro comercial

No experimento onde foi realizada a incubação com o veneno da *Bothrops erythromelas* com diferentes concentrações do soro antiofídico, pôde-se fazer a leitura das linhas de precipitação. No orifício periférico no qual havia 10 $\mu$ L de SAB + 2,5 $\mu$ L de veneno, houve a formação da linha de precipitação indicando que a concentração do soro para a quantidade de veneno foi insuficiente; no local em que foi colocada a incubação de 50 $\mu$ L de SAB + 2,5 $\mu$ L de veneno, a reação de precipitação indica que a concentração de soro para veneno foi ideal para a neutralização; nos orifícios submetidos às concentrações de 100 $\mu$ L de SAB + 2,5 $\mu$ L de veneno e 200 $\mu$ L de SAB + 2,5 $\mu$ L de veneno, a linha de precipitação aponta uma saturação nas concentrações da incubação (Figura 6).

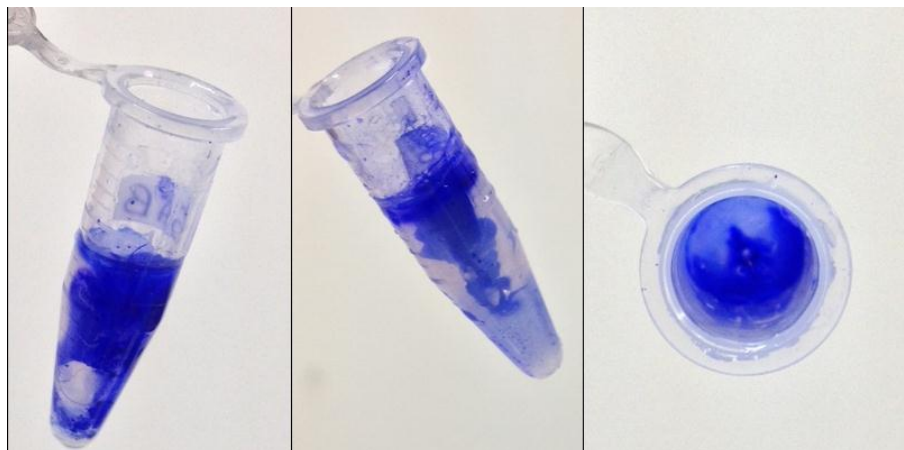
Figura 6: Teste de neutralização a partir da incubação (veneno + soro antitoxínico).



#### 5.4 Primeira Metodologia Testada para a Fabricação de um Teste Rápido de Diagnóstico de Acidente Ofídico

O resultado deste experimento não foi consistente (Figura 7). A impossibilidade de fazer uma leitura na formação de complexos ag-ac e o tempo demasiadamente elevado para obter-se um resultado não forneceu evidências para a continuidade desse procedimento.

Figura 7: Resultado do teste no eppendorf.

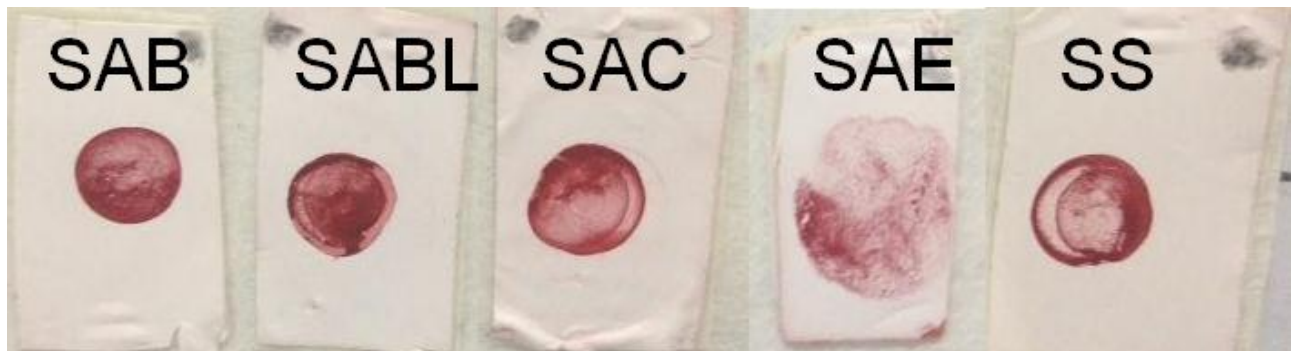


### 5.5 Adaptação do Método de Western Blotting

O protocolo foi seguido (Anexo B) com a incubação de 24 horas, tanto nos testes ag-ac (com a aplicação do veneno primeiro) quanto nos testes ac-ag (com a aplicação do soro comercial primeiro), e com a incubação em 8 horas nos testes de ag-ac.

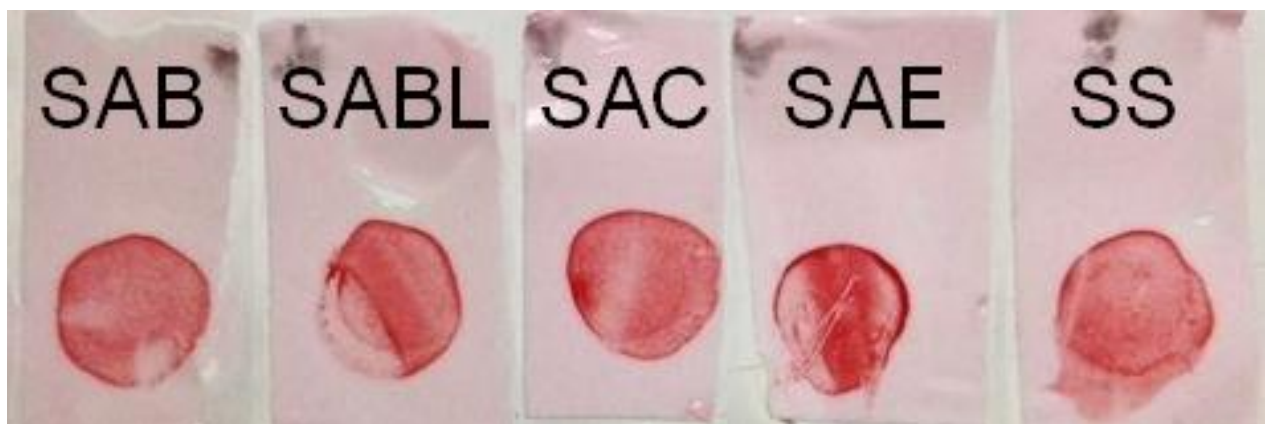
A boa adsorção do veneno na membrana de nitrocelulose resultou em diferentes padrões no reconhecimento dos diferentes tipos de soro utilizados nos teste, resultados expressos na figura 8.

Figura 8: Padrão apresentado na membrana de nitrocelulose.



Quando foi testada a incubação do soro comercial primeiro, a adsorção deste na membrana de nitrocelulose dificultou o reconhecimento de padrões de envenenamento a ponto de excluir um resultado, figura 9.

Figura 9: Resultado da membrana após o teste ac-ag com incubação de 24h.



Quando o tempo de incubação foi diminuído para 8 horas, a padronização no reconhecimento dos envenenamentos não foi conspícua, como apresentado na figura 10.

Figura 10: Resultado da membrana após o teste ag-ac com incubação de 8h.



## 6 DISCUSSÃO

A metodologia de Ouchterlony utilizada no eppendorf teve o fim de testá-lo como um suporte para a detecção gênero específica da serpente causadora do acidente ofídico, porém a impossibilidade de leitura a olho nu e o tempo demasiadamente longo do experimento impediu a continuidade para tal atividade. Contudo, o método de Ouchterlony utilizado nas placas de Petri atingiu seu objetivo ao reconhecer as ligações ag-ac através das linhas de precipitação, que já eram visualizadas antes mesmo da etapa de corar o gel.

A diferenciação do comportamento das linhas formadas no gel de agarose pode ser explicada pela conservação de epítomos nas proteínas principais das atividades em comum entre os gêneros da subfamília Crotalinae, demonstrada pela reatividade do veneno da *Bothrops erythromelas* com os SAC e SABL, apresentando o reconhecimento de algumas toxinas na formação da linha de precipitação (SEGURA *et al.*, 2010; DOS-SANTOS *et al.*, 1992, FERREIRA *et al.*, 1992a).

A não-reatividade do soro de paciente com o soro comercial, nos experimentos com o gel de agarose, pode indicar que (1) as toxinas contidas no sangue já haviam sido desintegradas, visto que o soro vinha sendo guardado há alguns anos. Há estudos (LUNA *et al.*, 2010; NUNES, 2016), que comprovam que o veneno *Bothrops erythromelas* não é totalmente neutralizado pelo soro comercial brasileiro. Outra possível explicação é a de que a concentração de anticorpo no soro do paciente é menor que a concentração no soro comercial, por isso não foi possível ver formação de linhas de precipitação na agarose.

O veneno da *B. erythromelas* quando incubado com o SAB em diferentes quantidades, apresentou um bom grau de neutralização na proporção de 20:1 (50µL do SAB para 2,5µL do veneno bruto) no teste da agarose (Figura 6), sendo evidenciado pela falta de linhas de precipitação entre o poço periférico II e o central. As demais linhas encontradas no resultado do experimento evidenciam que ou o soro antibotrópico incubado com o veneno foi insuficiente, tornando possível a visualização da linha entre o poço periférico (I) e o central; ou que o soro antibotrópico aplicado no poço foi demasiado, tornando possível neutralizar o veneno do poço vizinho (poço IV e V). Nos poços onde foram aplicados a incubação de veneno e solução salina, foi possível a visualização da linha de precipitação pois

o veneno contido nesses poços não foi neutralizado, formando a linha entre eles e o poço central, no qual se encontra o SAB.

Estudos indicam que uma banda de proteína de 29kDa a 31kDa presente no veneno da serpente *Bothrops erythromelas* não é neutralizada pelo soro antiofídico comercializado no Brasil, mesmo depois de 24 horas após a aplicação deste, o que pode vir a ser um bom biomarcador para envenenamentos decorrentes dessa espécie (LUNA, 2010; LUNA *et al.*, 2010; NUNES, 2016). Apesar de a figura 6 indicar que no poço aonde foi aplicado 50 $\mu$ L do SAB com o veneno houve uma neutralização eficaz do veneno, Nunes (2016; dados ainda não publicados) evidencia em seus experimentos que a banda de 29kDa a 31kDa continua a não ser neutralizada, mesmo quando aumentada a quantidade de soro antiobotrópico (como nos poços de 100 $\mu$ L e 200 $\mu$ L).

A banda não neutralizada pelo soro comercial brasileiro pode indicar que esta seja uma boa opção para a determinação de um marcador específico para tal envenenamento, porém também indica que as toxinas (desconhecidas) encontradas nesta banda continuam a agir no organismo dos pacientes envenenados, mesmo quando esses já foram tipicamente tratados, o que leva a ressaltar que é necessário que se façam pesquisas para descobrir que tipo de toxina está contida nesta banda, para melhor entender sua atuação no corpo humano e ajudar a evitar maiores sequelas decorrentes do acidente.

Estudos indicam que o soro antibotrópico contém grandes quantidades de anticorpos que reagem com os antígenos encontrados nos venenos utilizados para a fabricação do soro, e que podem apresentar uma reação cruzada com os componentes presentes em outros venenos que não estão inclusos no pool, como os da *B. erythromelas*, *B. atrox* e *B. leucurus* (CALVETE *et al.*, 2009; CAMEY *et al.*, 2002; GUTIÉRREZ *et al.*, 2013; GUTIÉRREZ *et al.*, 2014).

Um soro produzido pela imunização em coelhos com o veneno da *Bothrops jararaca* foi testado na neutralização de diferentes atividades de nove espécies botrópicas brasileiras. O estudo mostrou uma semelhança antigênica considerável entre todas as espécies utilizadas no experimento, explicando a reação cruzada das atividades hemorrágicas, coagulantes, miotóxicas e necrosantes. Entretanto, alguns antígenos presentes no veneno das *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. erythromelas* e *B. jararaca* não foram reconhecidos pelo soro anti-jararaca (FERREIRA *et al.*, 1992a).

Ferreira *et al.* (1992a) afirmam que a atividade da fosfolipase encontrada no veneno da *B. jararaca* é compartilhada entre poucas espécies botrópicas, e que um antiveneno produzido exclusivamente pelo veneno desta, não foi capaz de neutralizar as fosfolipases presentes nos venenos das *B. alternatus*, *B. atrox* e *B. erythromelas*. Contudo, o veneno da *B. erythromelas* possui uma alta atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> (FERREIRA *et al.*, 1992b), e o soro antibotrópico utilizado comercialmente foi incapaz de reduzir sua atividade (QUEIROZ *et al.*, 2008).

Camey *et al.* (2002) afirmam que o soro antibotrópico é eficaz na neutralização das principais atividades tóxicas do veneno botrópico, podendo ser utilizado no tratamento para os demais acidentes botrópicos provocados pelas espécies não inclusas no pool. Porém, dentre as espécies utilizadas na fabricação do soro antibotrópico, algumas se sobressaem no grau de neutralização de algumas atividades, enquanto que em outras, mostram uma eficácia similar, como as atividades proteolíticas das *B. neuwidi*, *B. moojeni* e *B. jararaca*, melhor neutralizadas pelo soro comercial quando comparadas às *B. jararacussu* e *B. alternatus*. Já as atividades hemorrágicas e necróticas, por sua vez, obtiveram uma neutralização semelhante entre as cinco espécies, com exceção da *B. jararacussu* que apresenta um baixo efeito necrótico (CAMEY *et al.*, 2002).

Estudos apontam que o soro antiofídico comercial brasileiro deveria incluir venenos de outras espécies do gênero *Bothrops*, para a fabricação de um soro universal antibotrópico mais eficaz (BOECHAT *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 1992a).

Além da terapia do SAB frente ao veneno da *Bothrops jararaca* não ser totalmente eficaz na reversão total de efeitos locais (BATTELLINO *et al.*, 2003), o SABC apresenta uma neutralização das atividades miotóxica e letal maior que o SAB, quando testado frente ao veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (DOS-SANTOS *et al.*, 1992), o que indica uma abertura na área de métodos alternativos para melhorar o tratamento dos pacientes (BATTELLINO *et al.*, 2003).

Experimentos em que a heparina foi utilizada junto ao soro antibotrópico mostram que esta foi capaz de neutralizar a atividade coagulante do veneno da *Bothrops erythromelas*, por este atuar no fator X da cascata de coagulação, além de reduzir os níveis de edema em uma média de 28% (BOECHAT *et al.*, 2001).

Na reunião anual da Assembleia Mundial de Saúde em Genebra, Suíça, a crise dos soros antiofídicos foi discutida pela primeira vez, na qual os especialistas

apresentaram-se divididos sobre como resolver tal problema. O método usado para a fabricação do antiveneno pouco mudou desde que foi desenvolvido na década de 1890, e diferentemente do veneno de aranhas e escorpiões, o veneno ofídico pode apresentar até dez vezes mais proteínas tóxicas que nem sempre são totalmente conhecidas (ARNOLD, 2016). Neste debate, foi defendido que agora é o tempo para pesquisar abordagens alternativas que poderiam revolucionar o tratamento de envenenamento ofídico nos próximos 10-15 anos (ARNOLD, 2016), e um teste mais barato em que possa ser utilizado pequenas amostras e que não precise de equipamentos sofisticados de leitura é uma boa escolha para países em desenvolvimento (XU *et al.*, 1989).

Estudar as clínicas locais sobre como cuidar de vítimas de acidentes ofídicos e administrar tratamentos em tempo hábil também significa percorrer um longo caminho para prevenir mortes (ARNOLD, 2016; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). O teste realizado nesse trabalho envolvendo a membrana de nitrocelulose não teve como objetivo apenas o de identificar os envenenamentos ocasionados pela *Bothrops erythromelas*, mas também o de propor um teste rápido para a identificação do gênero da serpente que ocasionou o acidente, a fim de diminuir o tempo de aplicação do tratamento soroterápico, evitando sequelas e óbitos.

Os testes com a nitrocelulose mostraram-se promissores: Quando testado a adsorção do veneno na membrana com uma incubação de 24 horas, a padronização nos resultados indicou um bom caminho a ser seguido para o reconhecimento do antígeno gênero-específico. Porém, no momento em que o tempo de incubação foi diminuído para 8 horas, não foi possível observar uma padronização clara a ponto de diferenciar os resultados obtidos dos diferentes soros antiofídicos

Os diferentes padrões de reconhecimento do veneno bruto da *Bothrops erythromelas* com os soros comerciais, nos testes com a incubação de 24 horas, envolvendo a membrana de nitrocelulose, forneceram indícios de que o procedimento usado poderá ser aplicado em testes de identificação do gênero da serpente, visto que cumpriu o objetivo proposto de visualizar o complexo ag-ac sem a necessidade de equipamentos de leitura. Porém, quando o tempo foi reduzido a 8 horas, os padrões não se tornaram conspícuos a ponto de observar diferenças entre os resultados, o que levou a pensar em que talvez outras modificações na metodologia possam trazer bons resultados na identificação dos diferentes padrões ag-ac.



Nos testes em que os soros antiofídicos foram adicionados antes do veneno, mesmo com a incubação de 24 horas, os resultados não mostraram uma diferenciação clara entre os complexos ag-ac, o que pode ser explicado pela baixa concentração de proteínas (anticorpos) presentes no soro, em comparação com o veneno bruto, que apresenta uma concentração de cerca de 300mg/µl.

A validação tanto biológica quanto da técnica do dot-blot foi apresentada por Guillemin *et al.* (2009) em testes de análise de quantificação proteica para a detecção de anticorpos específicos em músculos bovinos. A técnica neste estudo apresentou um coeficiente de variabilidade entre as réplicas de apenas 10%, o que é um número aceitável quando em comparação com o Western Blot que apresentou uma variação de 9%. O estudo demonstrou que o dot-blot é uma técnica imunológica útil que pode ser usada rotineiramente para as análises de proteínas susceptíveis à biomarcadores. Também é apontada a relevância da técnica sobre o impacto econômico, pois esta utiliza uma menor quantidade de anticorpos, além de ser mais rápida e fácil, quando comparada à metodologia do Western Blot (GUILLEMIN *et al.*, 2009).

A alta sensibilidade do dot-blot foi apresentada em estudos que utilizaram essa técnica na detecção de DNA viral a partir de soro de pacientes, nos quais o antígeno foi detectado pelo anticorpo em todas as amostras testadas dos pacientes verdadeiramente positivos (ANDERSON *et al.*, 1985). Além disso, a rápida detecção da expressão de um receptor de proteína em extrato bruto (ZEDER-LUTZ *et al.*, 2006) mostra o dot-blot como uma técnica adequada ao objetivo de propor um teste rápido na detecção gênero específica da serpente peçonhenta.

A variação entre as espécies de serpentes resulta em uma interação complexa de uma variedade de fatores genéticos que atuam nos genes responsáveis pela toxina, o que ocasiona diferenças significativas na patologia induzida pelo veneno e na letalidade, podendo enfraquecer a eficácia de terapias antiveneno utilizadas para tratar vítimas humanas de acidentes ofídicos (CASEWELL *et al.*, 2014). O reconhecimento da especificidade da toxina ofídica, assim como sua resistência aos inibidores fisiológicos, os tornam extremamente úteis para o desenvolvimento de testes de diagnóstico (BRAUD *et al.*, 2000).

Um teste rápido que detecte o gênero da serpente causadora do acidente é de suma importância em países "em desenvolvimento", principalmente em lugares onde não há atendimento imediato, e quando este também não é de qualidade. Tal

teste, com uma melhoria na sua diferenciação de gêneros, dá a evidência necessária de qual soro antiofídico aplicar na pessoa acidentada, evitando assim, erros na administração do soro.

Um soro antiofídico erroneamente aplicado pode vir a prejudicar ainda mais o paciente, podendo aumentar a probabilidade de morte, através da inserção de anticorpos (soro) não necessários num corpo já fragilizado com o patógeno (antígeno/veneno).

Espera-se que nos próximos estudos dessa pesquisa mais lacunas tenham sido fechadas e a diferenciação detectada nos primeiros testes de ag-ac em 24 horas consiga ser produzida em um tempo menor. Também cabe lembrar que experimentos com diferentes membranas (tamanho do poro) devem ser realizados com o intuito de fabricar um teste que venha não somente a salvar vidas, como também a diminuir as chances de sequelas decorrentes do acidente ofídico.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das mais de vinte espécies de *Bothrops* presentes no Brasil, apenas cinco estão relacionadas à produção do soro comercial polivalente antiofídico. É necessário avaliar a capacidade de neutralização entre o soro comercial e as outras espécies que também são medicamente relevantes em determinadas regiões. Essas cinco espécies botrópicas produzem distintos padrões proteicos, evidenciando que alguns componentes do veneno são distribuídos de forma diferenciada entre as espécies de *Bothrops*, o que induz diferença na intensidade dos efeitos locais e sistêmicos, incentivando um tratamento específico diferenciado para o melhor tratamento dos pacientes.

A caracterização das atividades biológicas dos venenos dessas serpentes é essencial para esclarecer os mecanismos da ação dos venenos, além de buscar novas formas para melhorar o tratamento dos acidentados. A concentração de toxinas encontradas no veneno de uma mesma espécie pode variar de acordo com a região em que ela é encontrada, que podem resultar em diferentes padrões de manifestações clínicas após o envenenamento.

A maioria dos acidentes ofídicos ocorre nas áreas rurais, onde o acesso aos serviços de saúde é precário. É importante ressaltar a necessidade de priorizar a qualificação e atualização das equipes responsáveis pelo atendimento e notificação (GUTIÉRREZ *et. al*, 2009) no estado da Paraíba (ALBUQUERQUE *et. al*, 2004). A falta de profissionais qualificados para o atendimento de pacientes que sofreram o acidente ofídico é algo que precisa ser corrigido, o que aumenta a necessidade da elaboração de um teste rápido de diagnóstico. Visto que o atendimento é feito de acordo com os sintomas clínicos expressos, o rápido reconhecimento do gênero da serpente minimizaria a probabilidade de sequelas permanentes na vítima.

O presente trabalho seguirá com novos estudos utilizando frações purificadas do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*. O objetivo da continuidade desse trabalho dá-se pelo fato de que produtos purificados de um determinado veneno, podem levar a uma identificação específica do tipo de envenenamento, principalmente em áreas onde ocorrem gêneros com clínicas semelhantes. Além disso, o veneno crotálico será submetido aos mesmos procedimentos que o veneno de *B. erythromelas*, para que uma comparação de ambos seja mais completa, e

possa-se verificar - ou não - diferenças entre as respostas desses dois venenos aos mesmos soros comerciais.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, H. N.; COSTA, T. B. G.; CAVALCANTI, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 1, 2004.

ANDERSON, M. J.; JONES, S. E.; MINSON, A. C. Diagnosis of human parvovirus infection by dot-blot hybridization using cloned viral DNA. **Journal of Medical Virology**, v. 15, p. 163-172, 1985.

ARNOLD, C. The snakebite fight: Snakes kill tens of thousands of people each year. But experts can't agree on how best to overcome a desperate shortage of antivenom. **Nature**, v. 537, p. 26-28, set, 2016.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. *In*: Cardoso, J. L. C.; França, O. S. F.; Wen, F. H.; Málaque, C. M. S. & Haddad Jr. V. (Orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2ª edição. 2009. p. 108-115.

BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; SILVA, A. M. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. P. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 41, p. 583-593, 2003.

BERNARDE, P. S. **Serpentes Peçonhentas e Acidentes Ofídicos no Brasil**. 1ª ed. São Paulo: Anolis Books, 2014. v. 1. 223p.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 7-16, jan/fev. 2003.

BOECHAT, A. L. R.; PAIVA, C. S.; FRANÇA, 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 de São Paulo**. v. 43, n. 1, p. 7-14, jan/fev, 2001.

BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde, 2<sup>o</sup> edição, outubro, 2001. 120 p.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A.; Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

BURNETTE, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981.

BURNS, R. Antibody Production. *In*: WALKER, J. M. **The Protein Protocols: Handbook**. New Jersey: Humana Press Inc., 2002. p. 935-940

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, p. 1063-1074, 2005.

CALVETE, J. J.; BORGES, A.; SEGURA, A.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; DIEZ, N.; SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J. G.; ESCOLANO, J. SANZ, L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **Journal of Proteomics**, Oxford, v. 72, p. 227-240, 2009.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, L. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H. V.; FURTADO, M. F. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 510-527, 2011.

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**, v. 40, p. 501-509, 2002.

CASEWELL, N. R.; WAGSTAFF, S. C.; WUSTER, W.; COOK, D. A. N.; BOLTON, F. M. S.; KING, S. I.; PLA, D.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; HARRISON, R. A.; Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. **PNAS**, v. 111, n. 25, p. 9205-9210, 2014.

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

DENNIS, A. E. Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 18, pg. 13057-13060, 1994.

DOS-SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R. C.; FORTES-DIAS, C. L.; 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*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 77-83, 1992.

FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1591-1602, 1992a.

FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.; CARDOSO, J. L.; MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine bothrops species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1603-1608, 1992b.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, n. 12, p. 1551-1559, 1993.

FRANCO, F. L. 2003. Origem e diversidade das serpentes. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. & HADDAD JR. V. (Orgs).

**Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.**

São Paulo: Sarvier, 2ª edição. 2009. p. 22-41.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. & HADDAD JR. V. (Orgs).

**Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.**

São Paulo: Sarvier, 2ª edição. 2009. p. 81-95.

FRIDLEY, G. E.; HOLSTEIN, C. A.; OZA, S. B.; YAGER, P. The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays. **MRS Bulletin**, v. 38, p. 326-330, 2013.

FURTADO, M. F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C.

Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219-226, 1991.

FURTADO, M. F. D.; CARDOSO, S. T.; SOARES, O. E.; PEREIRA, A. P.;

FERNANDES, D. S.; TAMBOURGI, D. V.; SANT'ANNA, O. A. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. **Toxicon**, v. 55, p. 881-887, 2010.

GE Healthcare Life Sciences. **Nitrocellulose Blotting Membranes**. Disponível em: <[http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-br/products/AlternativeProductStructure\\_16756/](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-br/products/AlternativeProductStructure_16756/)>. Acesso em: 04 de set. 2016.

GUILLEMIN, N.; MEUNIER, B.; JURIE, C.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J-F.;

LEVEZIEL, H.; PICARD, B. Validation of a dot-blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 60, p. 91-97, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, set, 2000.



GUTIÉRREZ, J. M.; FAN, H. W.; SILVEIRA, C. L. M.; ANGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, p. 625-630, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; VILLALTA, M.; VARGAS, M.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; CALVETE, J. J.; LEÓN, G. Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: From the lethality neutralization assay to antivenomics. **Toxicon**, v. 69, p. 168-179, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Immunological profile of antivenoms: Preclinical analysis of the efficacy of a polyspecific antivenom through antivenomics and neutralization assays. **Toxicon**, v. 105, p. 340-350, 2014.

HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Analytical Biochemistry**, v. 119, p. 142-147, 1982.

HU, J.; WANG, S.; WANG, L.; LI, F.; PINGGUAN-MURPHY, B.; LU, T. J.; XU, F. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 585-597, 2014.

IWEALA, O. I. HIV diagnostic tests: An overview. **Contraception**, v. 70, p. 141-147, 2004.

JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M. C.; XIMENES, R. M.; BORGES-NOJOSA, D. M.; LUNA, K. P. O.; ZINGALI, R. B.; CORRÊA-NETO, 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. **Journal of Proteomics**, v. 114, p. 93-114, 2015.

KATSURIATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K., PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H.

J. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLOS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591-1604, nov, 2008.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake Venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, p. 3030-3041, 2006.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western blotting. **Methods**, v. 38, p. 283-293, 2006.

LENZ, Guido. Métodos imunológicos. Biofísica, 2004. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/MIMUNO.pdf>>. Acesso em: 04 de set. 2016.

LEMOS, J. C.; ALMEIDA, T. D.; FOOK, S. M. L.; PAIVA, A. A.; SIMÕES, M. O. S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 50-59, 2009.

LIRA-DA-SILVA, R. K.; MISE, Y. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B.; BRAZIL, T. K. Serpentes de importância médica no nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 7-20, 2009.

LOW, S. C., SHAIMI, R.; THANDAITHABANY, Y.; LIM J. K.; AHMAD, A. L.; ISMAIL, A. Electrophoretic interactions between nitrocellulose membranes and proteins: Bointerface analysis and protein adhesion properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 248–253, 2013.

LUNA, K. P. O. **Avaliação da resposta imune relacionada à ação dos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella***. 2010. 233 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Saúde

Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

LUNA, K. P. O.; 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**, v. 43, n. 6, p. 731-732, nov/dez, 2010.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatis system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas no Brasil. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. & HADDAD JR. V. (Orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2ª edição. 2009. p. 42-70.

NUNES, E. A. C. **Avaliação da neutralização de componentes do veneno da serpente *Bothrops erythromelas***. (Monografia). Campina Grande, Paraíba, 2016.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J-A.; GORVEL, J-P. & MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp 49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115–129)-peptide identifies its bactericidal region. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, p. 452-461, 1998.

PAULA, R. A. **Obtenção e avaliação de anticorpos induzidos por veneno crotálico ou crotoxina irradiados em fonte de <sup>60</sup>Co**. 1995. 98 f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1995.

PERKEL, J. M. Western blotting overview: A history of the old West(ern blot). [Editorial]. *Science/AAAS: Western Blotting: A Guide to Current Methods*, p. 04-07, jun, 2015.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu. 4<sup>a</sup> ed., 2008.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

REIS, P. M. A.G.; COELHO, R. D. F.; MENEZES, L. M. N.; RIBEIRO, L. B. Contribution to the reproductive biology of *Bothrops erythromelas* (Squamata: Viperidae) in the semiarid region of Brazil. **Herpetological Review**, v. 46, n. 3, p. 327-331, 2015.

RODRIGUE, L., MARION, D., TRUDEL, L., BARTHE, C.; LAVOIE, M. C. Comparison of methods for evaluation of oral microbiota of mice. **Journal of Microbiological Methods**, v. 10, p. 71-82, 1989.

ROJNUCKARIN, P. Snake Venom and Haemostasis - An Overview. **European Haematology**, v. 2, n. 1, p. 7-11, 2008.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COSTA, G.; DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NÚÑEZ, V.; YAELEQUÉ, A.; GONÇALVES, L. R. C.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, M. Y.; ARAÚJO, H. P.; BOLLER, M. A. A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANOMARTINS, I. S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G. P.; GEOGHEGAN, P.; HIGASHI, H. G.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 980-989, 2010.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, jun, 2005.

SILVA, F. S. Q. **Avaliação da pureza de soros antiofídicos brasileiros e desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade**. 2008. 186 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

SILVA JR., N. J.; BUCARETCHI, F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. & HADDAD JR. V. (Orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2ª edição. 2009. p. 116-124.

SILVA, M. B.; SCHATNER, M.; RAMOS, C. R. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C. A. M.; 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, p. 129-139, 2003.

SINAN. Acidente por animais peçonhentos - **Notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação** - Paraíba. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaispb.def>> Acesso em: 29/07/2016.

SOUZA, R. C. G. Aspectos clínicos do acidente laquétrico. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. & HADDAD JR. V. (Orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2ª edição. 2009. p. 96-107.

STONG, C. L. The amateur scientist: Antigens and antibodies are studied by their diffusion patterns in agar. **Scientific American**, p. 248-258, 1969.

STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 153-187, 1989.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, set, 1979.

WEN, F. H. Soroterapia. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. & HADDAD JR. V. (Orgs). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2ª edição. 2009. p. 432-445.

XU, J. Y., MIROSLAW, K. G.; ZOLLA-PAZNER, S. An immuno-dot blot assay for detection of antibody to HIV. **Journal of Immunological Methods**, v. 120, p. 179-183, 1989

ZEDER-LUTZ, G.; CHEROUATI, N.; REINHART, C.; PATTUS, F.; WAGNER, R. Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 50, p. 118-127, 2006.

## **ANEXOS**

## **ANEXO A – RESPOSTA DO e-SIC SOBRE OS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Prezada Fleuriane Dantas Lira,

Segue, no prazo da Lei de Acesso à Informação, resposta a solicitação de Vossa Senhoria:

“Os dados referentes aos acidentes por animais peçonhentos no Brasil chegam ao Ministério da Saúde por intermédio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o qual tem como objetivo coletar, transmitir e disseminar dados gerados rotineiramente pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica das três esferas de Governo, por meio de uma rede informatizada, para apoiar o processo de investigação e dar subsídios à análise das informações de vigilância epidemiológica das doenças de notificação compulsória.

Segue, abaixo, o link para acesso da população aos dados do SINAN, a partir do ano 2007:

<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>

Após clicar no link acima, selecionar a opção animais peçonhentos e proceder com as tabulações que julgar necessárias.”

Atenciosamente,

Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

Autoridade a ser direcionado eventual recurso de 1ª instância: Secretaria de Vigilância em Saúde



## ANEXO B – PROTOCOLO DE WESTERN BLOTTING QUE INSPIROU A METODOLOGIA UTILIZADA NESTE TRABALHO

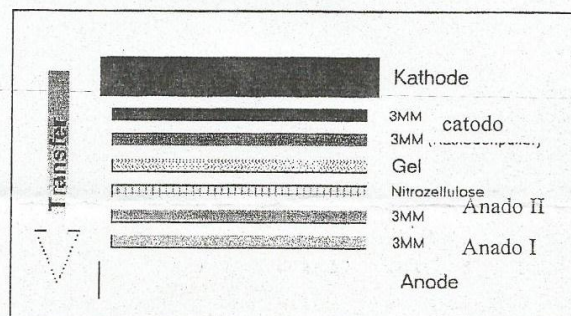
### Western Blot – semi-seco

Transferência das proteínas para a membrana

Os tampões de transferência foram preparados usando os seguintes tampões, indicados abaixo:

Tampão ANADO I (300 mM Tris base , 20 % metanol.	Tampão ANADO II (25 mM Tris base , 20 % metanol.	Tampão CATODO
Tris Base 36,3 g	Tris 3 g	Tris 3 g
Metanol 200 ml	Metanol 200 ml	Ácido capríco 5.2 g
Água p/ l l	Água p/ l l	Metanol 200 ml
		Água p/ l l

1. Após a corrida de eletroforese fazer a transferência das proteínas de acordo com o esquema abaixo.



2. Transferir por cerca de 1:30 no blotador com a voltagem de 45 V ( para 1 gel pequeno)
3. Após a transferência corar a nitrocelulose com Ponceau a 0,2 % e 1% de TCA por cerca de 5 minutos. Em seguida cortar as tiras da nitrocelulose (NCT) e lavar com água destilada ate sair o corante.
4. Bloquear por 2 horas em 5 % de leite desnatado em PBS/Tween 0,05%
5. Incubar a NCT com o primeiro anticorpo ( o anticorpo deve ser diluído em leite desnatado a 1% em PBS/Tween 0,05%) Deixar O/N em câmara fria.
6. Lavar 3 x por 10 minutos cada vez com PBS/Tween 0,05%
7. Incubar a NCT com o segundo anticorpo ( o anticorpo deve ser diluído em leite desnatado a 1% em PBS/Tween 0,05%). Por 1 hora.
8. Lavar 3 x por 10 minutos cada vez com PBS/Tween 0,05%
9. Lavar 1 x por 10 minutos com Tris-HCl a 0,1 M pH 7,5
10. Revelar com Cloro-naftol
 

4-cloro-naftol (4.4 mg/ml) em metanol	-----	2,5 ml
0,1 M de Tris-Hcl, pH 7,5	-----	12,5 ml
H2O2 (30%)	-----	40 µl
11. Deixar reagir por cerca de 5 a 10 minutos e parar a reação com água