



RITA DE CÁSSIA DE OLIVEIRA COLLAÇO

**“ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS PELA
PEÇONHA DE *Bothrops fonsecai* E O USO DO
ANTIVENENO COMERCIAL COMO FERRAMENTA
FARMACOLÓGICA”**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RITA DE CÁSSIA DE OLIVEIRA COLLAÇO

**“ESTUDO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS PELA
PEÇONHA DE *Bothrops fonsecai* E O USO DO
ANTIVENENO COMERCIAL COMO FERRAMENTA
FARMACOLÓGICA”**

Orientadora: Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestra em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA RITA DE CÁSSIA DE OLIVEIRA COLLAÇO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LÉA RODRIGUES SIMIONI.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C683e Collaço, Rita de Cássia de Oliveira, 1989-
Estudo dos efeitos biológicos induzidos pela peçonha de *Bothrops fonsecai* e o uso do antiveneno comercial como ferramenta farmacológica / Rita de Cássia de Oliveira Collaço. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Léa Rodrigues Simioni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bothrops. 2. Antivenenos. 3. Atividade biológica. I. Simioni, Léa Rodrigues, 1942-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Bothrops fonsecai* snake venom biological effects and the use of commercial bothropic antivenom as pharmacological tool

Palavras-chave em inglês:

Bothrops

Antivenins

Biological activity

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Mestra em Farmacologia

Banca examinadora:

Léa Rodrigues Simioni [Orientador]

Elen Cristina Teizem Landucci

Stella Regina Zamuner

Data de defesa: 29-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RITA DE CÁSSIA DE OLIVEIRA COLLAÇO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). LÉA RODRIGUES SIMIONI

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). LÉA RODRIGUES SIMIONI



2. PROF(A). DR(A). ELEN CRISTINA TEIZEM LANDUCCI



3. PROF(A). DR(A). STELLA REGINA ZAMUNER



Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 29 de julho de 2014

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aqueles que dedicaram
suas vidas a minha.
Meus primeiros professores e eternos mestres,
minhas duas metades, minha fortaleza, meus
pais:*

Júlio e Rosalina.

AGRADECIMENTOS

Aos pais

Aqueles que acompanharam meu primeiro choro, meu primeiro sorriso, meus primeiros passos, minhas primeiras palavras, meus primeiros erros.

Aqueles que compartilharam de todos os meus momentos, minhas expectativas, minhas vitórias, minhas dificuldades, minhas dores.

Aqueles que me doaram noites sem dormir, ensinamentos, experiências, alegrias, carinhos, sorrisos, broncas, conversas... e amor incondicional.

Aqueles que apoiaram, encorajaram, sonharam.

Se hoje isso pode ser lido, é por estímulo de vocês.

À família

A Elza Collaço (in memoriam), minha avó paterna, que dedicou toda sua vida ao ensino e sempre apoiou nosso crescimento acadêmico. Tenho certeza que estaria orgulhosa desse momento.

Aos meus avós maternos, José (Zelão) e Eva que sempre me recebem com sorrisos e abraços, palavras de carinho e estímulo, e aqueles deliciosos bolinhos de chuva.

Ao meu irmão Tiago que, independente dos “tapas e beijos”, sempre me arrancou sorrisos e sempre esteve “lá” por mim. Obrigada pelas tantas vezes que me guiou e me levou onde eu precisava ir (literalmente ou não).

Ao meu sobrinho Vitor (Pulga) que, ao me ver, corre de braços abertos e me recebe com os abraços mais sincero e beijos mais gostosos do mundo. Você deixou meus dois últimos anos mais coloridos.

Aos meus tios e primos (que são tantos), minha cunhada Luciana, a minha “irmã” Adriana e meu “sobrinho” Kaique, pelo interesse que sempre demonstraram em meu trabalho, pelo apoio, pelos intensos momentos de descontração e por sempre impulsionarem meus passos.

Vocês fizeram parte dessa história.

Aos mestres

A Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni que com carinho aceitou a tarefa de me orientar. Serei eternamente grata pela oportunidade, confiança e liberdade para realizar esse trabalho, pelas palavras de carinho, pelas frases encorajadoras e pelos conselhos em diversos momentos. Obrigada por apoiar-me incondicionalmente em todos os passos que me levaram a esse momento.

A Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura, minha primeira orientadora, minha “mãe científica”, que esteve ao meu lado durante todo meu processo de amadurecimento científico. Obrigada por não medir esforços para me acompanhar, obrigada pela indiscutível amizade, pelos ensinamentos em todos os sentidos, pelos momentos de descontração, pela preocupação com minha vida acadêmica e pessoal e pelo tempo que se dedicou a esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Charles Gordon Sanny por abrir as portas do seu laboratório, por sempre tentar me deixar o mais confortável e “em casa” possível, pela troca de vivência, pelas palavras sempre ternas e doces, por transmitir tamanho conhecimento que em muito auxiliou para minha construção como cientista e pela confiança que em mim depositara durante meu estágio de pesquisa no exterior.

Aos membros que compuseram a banca de qualificação (Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô, Profa. Dra. Fabíola T. M. Iglesias e Profa. Elen C. T. Landucci) e de defesa pelas críticas e comentários construtivos pertinentes para a finalização desse trabalho.

A todos os professores (em especial a Profa. Sisi, Prof. Edson, Prof. Stephen, Prof. Gabriel e Prof. André) e funcionários (especialmente ao Gildo, Zé Ilton e Seu Miguel) do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas pelo apoio técnico, teórico e prático que possibilitaram minha evolução acadêmica e científica, a construção de conhecimento e a realização dessa pesquisa.

Agradeço a Profa. Kristiani Borscsik pela paciência e ensinamentos durante meu ensino fundamental e médio, assim como interesse durante toda minha graduação e mestrado. Obrigada por gentilmente realizar a revisão deste trabalho.

A todos os professores e demais funcionários de todas as instituições que um dia me abrigaram, sejam eles professores de Educação Infantil, Ensino Fundamental, Ensino Médio ou Graduação, ou ainda aqueles que simplesmente me transmitiram conhecimentos de cunho científico, acadêmico ou cotidiano.

Cada um de vocês teve um papel fundamental para minha formação.

Aos amigos

Aos “brodis” Raphael Schezaro e Mariana Tamascia por me abraçarem quando eu precisei chorar, por me ouvirem quando precisei gritar, por me erguerem quando precisei levantar, por me seguirem quando precisei continuar, por ajudarem a me manter em pé. Obrigada pelo crescimento que me proporcionaram em diversos sentidos.

Ao Igor Rapp, Raquel Lorenzetti e Fabiana Fonseca por terem compartilhado comigo as angústias e tensões, as descobertas e surpresas, os pensamentos, as histórias, os risos.

Àqueles que permanecem ou passaram pelo laboratório, em especial a María Herrera, Delkia Moraes e Rafael Stuani pela companhia durante todo esse trabalho.

Aos demais amigos do departamento, em especial Ana Carolina Naime e Gisele Goulart, por auxiliarem direta e indiretamente na realização desse trabalho, desde em um momento descontraído na “copinha” até o auxílio em um procedimento ou técnica.

A Juliana “Chuchuliana” Asbahr pelas horas de Skype, pelas confidências, pelos abraços de urso, pelas risadas, pelos conselhos, pelo ombro sempre pronto.

As meninas da República Chavascasa (Ivett, Paula, Naty, Júlia, Marcela, Jéssica, Jade, Tami, Débora, e outras) que estiveram comigo nas alegrias e tristezas, na

saúde e na doença, nas festas e estudos, a pelo menos dois anos. Levarei vocês sempre nas lembranças, nas fotos, nas histórias.

Aos amigos que fiz durante o período que estive em Tulsa (OK/EUA), em especial a Shae Claypool, Brett Williams, Rendi Burns, Isabel Rinaldis, Lúcia Rouch, Al Rouch, Lee Stidham e Betty Westerfield que me acolheram, me deram suporte em todos os sentidos, me divertiram, me ensinaram, me mostraram, me distraíram, me ajudaram, me emocionaram, cantaram, dançaram, viajaram, entreteram e me levaram para ver um dos mais belos pôr-do-sol, o mais estrelado céu de inverno e a neve. Não me senti sozinha, vocês estavam comigo. Serei eterna e imensamente grata. I love you all!

Aos amigos da graduação que fizeram parte dos meus dias durante esse trabalho, em especial à Kyl Assaf pelas sessões de terapia do desestresse, pelas aventuras, pelas viagens e pelas crises de riso.

A todos os demais amigos que direta e indiretamente colaboraram seja com um abraço, uma conversa, um sorriso, um momento. Obrigada aqueles que se interessaram e me apoiaram durante parte de todo o processo de elaboração e realização desse trabalho. Perdoem-me não lista-los mas cada um sabe o quanto importante é para mim.

Agradeço também ao CNPq pelo suporte inicial e à FAPESP pelo suporte financeiro que permitiu a continuidade e finalização desse trabalho, incluindo o período sanduíche. A Universidade Estadual de Campinas e a Oklahoma State University pelo suporte técnico/estrutural/acadêmico.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os animais que possibilitaram a realização desse estudo. Tenho em mente a importância de cada vida que esteve em minhas mãos, o que me levou a agir com intenso respeito, planejamento e responsabilidade.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

RESUMO	xxxI
ABSTRACT	xxxv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxxix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xlv
1. INTRODUÇÃO	53
1.1 Venenos Ofídicos: Caracterização Geral	55
1.1.1 Proteases.....	57
1.1.2 Fosfolipases A ₂	58
1.2 Família Viperidae e <i>Bothrops</i> sp.	58
1.3 <i>B. fonsecai</i> , <i>B. alternatus</i> e <i>B. cotiara</i>	60
1.4 <i>Bothrops fonsecai</i>	63
1.5 Interação antígeno:anticorpos.....	64
1.6 Antivenenos e acidentes ofídicos.....	65
1.6.1 Análise das ligações veneno:antiveneno.....	66
2. OBJETIVOS	69
2.1 Objetivos gerais	71
2.2 Objetivos específicos	71
3. MATERIAL E MÉTODOS	73
3.1 Reagentes.....	75
3.2 Animais	75
3.3 Veneno bruto de <i>B. fonsecai</i>	76
3.4 Antiveneno Comercial	76

3.5 Antiveneno Específico.....	77
3.5.1 Imunodifusão dupla de Ouchterlony	78
3.5.2 Purificação do Antiveneno	78
3.6 Ensaio Biológico.....	79
3.6.1 Testes “ <i>ex vivo</i> ”.....	79
Atividade neuromuscular: Músculo extensor longo dos dígitos isolado	79
Determinação e neutralização da atividade coagulante	80
3.6.2 Testes “ <i>in vivo</i> ”.....	80
Determinação e Neutralização da Atividade Hemorrágica	80
Determinação e Neutralização da Atividade Edematogênica	82
Determinação e Neutralização da Atividade miotóxica.....	82
3.6.3 Testes “ <i>in vitro</i> ”	83
Quantificação da atividade da creatinoquinase (CK).....	83
Determinação e Neutralização da atividade fosfolipásica	83
Determinação e neutralização da atividade proteolítica	84
Determinação e neutralização da atividade esterásica	84
Dosagem proteica por Bradford.....	85
Eletroforese Bidimensional (2D) em gel de poliacrilamida	85
3.7 Análise Histopatológica Qualitativa.....	86
3.8 Avaliação das ligações veneno:antiveneno.....	87
3.8.1 Análise por SE-HPLC	87
Perfil “Nulo”.....	88
Cálculo da Δ Área.....	89
Análise utilizando as funções dose-resposta.....	89
Seleção das três regiões	90
Análise da capacidade relativa de ligação (Max_H), EC_{50} e a estequiometria relativa das ligações	91

3.8.2	Análise por Immunoblotting	91
3.9	Análise Estatística	92
4.	RESULTADOS	93
4.1	Composição do veneno.....	95
4.2	Atividades enzimáticas.....	96
4.2.1	Atividade fosfolipásica	96
4.2.2	Atividade proteolítica.....	97
4.2.3	Atividade esterásica.....	98
4.3	Atividades biológicas.....	99
4.3.1	Atividade neuromuscular	99
4.3.2	Atividade miotóxica	102
	<u>Miotoxicidade “in vitro”</u>	102
	<u>Miotoxicidade “in vivo”</u>	106
4.3.3	Atividade hemorrágica	109
4.3.4	Atividade edematogênica.....	110
4.3.5	Atividade coagulante.....	111
4.4	Análise das ligações veneno:antiveneno	112
4.4.1	Avaliação por SE-HPLC.....	112
4.4.2	Avaliação por immunoblotting.....	116
4.5	Comparação das atividades de <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Bothrops fonsecai</i>	118
5.	DISCUSSÃO	119
6.	CONCLUSÃO.....	127
	REFERÊNCIAS.....	131
	ANEXOS	147

RESUMO

Venenos de serpentes botrópicas são caracterizados pela indução de extenso dano local associado a feitos sistêmicos. *Bothrops fonsecai* é uma serpente de distribuição geográfica restrita das regiões montanhosas de Mata Atlântica cujo veneno é pobremente estudado. Recente estudo proteômico identificou que esse veneno possui principalmente metaloproteases, fosfolipases A₂, Lectinas tipo C e serinoproteases. Ensaio experimental utilizando antiveneno botrópico comercial para neutralizar as atividades biológicas de venenos botrópicos possibilitam não somente respostas de cunho clínico (tratamento de acidentes), mas também se constitui em uma valiosa ferramenta farmacológica para avaliar a existência de diferenças na composição dos diversos venenos através da reatividade cruzada entre veneno e antiveneno. Levando em consideração esses fatos, este trabalho teve como objetivo estudar a toxicidade do veneno de *B. fonsecai* através da atividade bloqueadora sobre a junção neuromuscular, atividade miotóxica, hemorrágica, edematogênica e coagulante assim como a sua caracterização bioquímica. A neutralização dessas atividades por antiveneno botrópico comercial e a comparação das ligações antígeno:anticorpo (veneno:antiveneno) entre *B. fonsecai* e os antivenenos botrópico comercial e específico usando SE-HPLC e immunoblotting também foram avaliadas.

O veneno de *B. fonsecai* apresentou atividade fosfolipásica, sendo essa provavelmente a maior responsável pelo bloqueio neuromuscular e miotoxicidade, além de ser uma das mediadoras da atividade edematogênica; a inibição parcial dessa atividade pelo antiveneno comercial corrobora com a neutralização parcial dos efeitos na junção neuromuscular e redução da atividade edematogênica, já a neutralização total da atividade miotóxica demonstra que as PLA₂ catalíticas podem não ser as principais responsáveis pela miotoxicidade. Embora o veneno apresente metaloproteases P-I e P-III, a atividade proteolítica não demonstrou-se marcante *in vitro*, diferente do ensaio de atividade hemorrágica (induzida principalmente por essas enzimas e que foi completamente inibida pelo antiveneno comercial) o que

leva a crer que o ensaio enzimático esteja subestimando essa atividade. O veneno exibiu atividades esterásica e coagulante que são normalmente causadas por serinoproteases e ambas foram inibidas pelo antiveneno botrópico comercial, em menor grau na proporção 5:1 (recomendada pelo fabricante) que a obtida em 5:2.

O antiveneno botrópico comercial apresentou reatividade-cruzada em todas as atividades testadas, porém sua afinidade com o veneno de *B. fonsecai* demonstrou-se baixa ressaltando que o veneno de *B. fonsecai* possui composição diferente do veneno das serpentes utilizadas na produção do antiveneno comercial, em especial as fosfolipases catalíticas, metaloproteinases P-I e serinoproteases.

Palavras-chave: *Bothrops*, antivenenos, atividades biológicas

ABSTRACT

Bothropic snake venoms are characterized for a marked local damage associated to systemic effects. *Bothrops fonsecai* is a Brazilian pit viper of restrict distribution (Atlantic Forest at high altitude regions) and its venom has been poorly studied but is known it has phospholipases A₂, metalloproteases (P-I and P-III) and serine proteases. Experimental assays using commercial bothropic antivenom to neutralize the bothropic venom activities allows clinical responses (snakebites treatment) and also is a pharmacological tool to evaluate different venoms composition through venom:antivenom cross-reactivity. Thinking in all this, the aim of this work were the *B. fonsecai* venom toxicity analysis through the *in vitro* neuromuscular junction action, the myotoxic, hemorrhagic, edema-forming and coagulant activities, as well its biochemical characterization. The neutralization of those activities by the commercial bothropic antivenom and the comparison of venom:antivenom bindings (*Bothrops fonsecai* venom : Commercial and specific antivenoms) by SE-HPLC and immunoblotting were also evaluated.

B. fonsecai venom had a high phospholipasic activity and this probably is the major responsible for neuromuscular blockade and miotoxicity caused by this venom. This activity is also one of edema-forming activity mediator (with metalloproteases P-I). The partial inhibition of this activity with both proportions (5:1 and 5:2) corroborates the partial neuromuscular blockade and edema neutralization; in contrast total the inhibition of miotoxicity allows us to suppose that the catalytic PLA₂ are not the major responsible for the miotoxicity. The venom also showed a low metalloprotease activity (caused principally by P-I once is more abundant on this venom) and was not significantly inhibited by commercial bothropic antivenom at both proportions; these enzymes (especially P-III) also induced hemorrhage totally inhibited by commercial bothropic antivenom. The esterase and coagulant activities of this venom are caused mainly by serine-proteases; the commercial antivenom neutralization was more potent at 5:2 than 5:1 proportion.

The commercial antivenom presented cross-reactivity in all tested activities but its low affinity with *B. fonsecai* venom indicates that the venom composition is quite different than the composition of snake venoms used to produce the commercial antivenom, specially catalytic phospholipases, metalloproteases P-I and serine proteases.

Key-words: *Bothrops*, antivenins, biological activities

LISTA DE ABREVIATURAS

2D	Duas dimensões
μCi	Unidade de atividade para radiação em Curie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Abs	Absorbância
ANOVA	Análise de variância
AVc	Antiveneno botrópico comercial
AVe	Antiveneno específico
<i>B. fonsecai</i>	<i>Bothrops fonsecai</i>
<i>B. cotiara</i>	<i>Bothrops cotiara</i>
<i>B. alternatus</i>	<i>Bothrops alternatus</i>
<i>B. jararaca</i>	<i>Bothrops jararaca</i>
<i>B. jararacussu</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>
<i>B. neuweidi</i>	<i>Bothrops neuweidi</i>
<i>B. moojeni</i>	<i>Bothrops moojeni</i>
<i>C.d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<i>C.d.t.</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose

CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CEN	Centro de Estudos da Natureza
CEUA	Comitê de Ética no Uso de animais
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CK	Creatinoquinase
cm	Centímetros
CRISP	Cysteine-Rich Secretory Protein
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EC ₅₀	Valor onde ~50% do antiveneno reativo encontra-se ligado
EDL	Extensor Longo dos Dígitos (músculo)
EPM	Erro Padrão da Média
g	Gramas
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
H.E.	Hematoxilina e Eosina
IEF	Fitas de focalização isoeletrica
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton

Kg	Quilogramas
L	Litros
m	Metros
M	Molar
Max _H	Ligação máxima ente veneno e antiveneno
<i>M. corallinus</i>	<i>Micrurus corallinus</i>
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHD	Dose mínima hemorrágica
mL	Mililitros
min	Minutos
mM	Milimolar
mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetro
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PLA ₂	Fosfolipase A ₂

RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações Por Minuto
s	Segundos
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SE-HPLC	Size-Exclusion High Performance Liquid Chromatography
SVMP	Snake Venom Metalloprotease
TE	Tampão de Equilíbrio
U	Unidade
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIVAP	Universidade do Vale do Paraíba
V	Volts

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Fig. 1. Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos (Gutiérrez e Lomonte, 2003)	60
Fig. 2. Árvore filogenética das espécies <i>B. cotiara</i>, <i>fonsecai</i> e <i>alternatus</i>. (Fenwich et al., 2009). Note a proximidade filogenética entre as espécies.....	61
Fig. 3. Distribuição geográfica de <i>B. fonsecai</i> e <i>B. cotiara</i> (Tashima et al., 2008)	62
Fig. 4. Ilustração da disposição das amostras no teste de imunodifusão dupla. V: veneno de <i>B. fonsecai</i> ; C: soro controle; A: antiveneno comercial; 1: soro teste coletado na última imunização; 2: soro teste coletado na penúltima imunização	78
Fig. 5. Perfis do veneno de <i>B. fonsecai</i>. A) SDS-PAGE 2D do veneno bruto de <i>B. fonsecai</i> . B) Perfil de eluição por SE-HPLC do veneno de <i>B. fonsecai</i> . Note a presença de regiões onde comumente se encontram Metaloproteínas PI (M-PI) e PIII (M-PIII), assim como serinoproteases (SP), fosfolipases A ₂ (PLA ₂) e CRISPs, corroborando com a literatura	95
Fig. 6. Atividade fosfolipásica do veneno total de <i>B. fonsecai</i>. A) Comparação com <i>Crotalus durissus terrificus</i> , controle positivo; B) Inibição parcial da atividade após pré-incubação do veneno com antiveneno botrópico comercial (AVc), a 37°C por 1h. Os pontos e colunas representam a média ± DP de 5-7 experimentos. *p<0,05 comparado com <i>C.d.terrificus</i> . #p<0,05 comparado com veneno sozinho	96

Fig 7. Atividade proteolítica do veneno de *B. fonsecai*. A) Curva concentração-resposta da atividade proteolítica; B) Pré-incubação do veneno bruto de *B. fonsecai* (30µg) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 a 37°C por 1h. Os pontos e colunas representam a média ± DP de 3 experimentos. Não foi observada neutralização significativa..... 97

Fig. 8. Atividade esterásica do veneno de *B. fonsecai*. A) Curva concentração-resposta; B) Pré-incubação do veneno bruto de *B. fonsecai* (30µg) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 a 37°C por 1h. Os pontos e colunas representam a média ± DP de 3 experimentos. #p<0,05 comparado com veneno sozinho..... 98

Fig. 9. Curva da resposta contrátil da preparação EDL, sob estimulação elétrica indireta, após adição de *B. fonsecai*. A) Bloqueio da contração neuromuscular concentração-dependente; B) Tempo necessário para obtenção de 50 e 90% de bloqueio da resposta contrátil. Cada ponto representa a média ± EPM de 5-7 experimentos. *p<0,05 comparado ao controle Tyrode..... 99

Fig. 10. Curva da resposta contrátil da preparação EDL sob estimulação elétrica indireta, após adição 100µg/mL de veneno de *B. fonsecai* pré-incubados ou não com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2. A) Bloqueio neuromuscular causado por *B. fonsecai* e a proteção parcial pelo antiveneno comercial. B) tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil. Cada ponto representa a média ± EPM de 5-7 experimentos. *p<0,05 comparado com controle Tyrode. AVc: antiveneno botrópico comercial..... 100

Fig. 11. Figura representativa dos registros miográficos da resposta contrátil após a adição do veneno de *B. fonsecai* (3, 10, 30, 100 e 300µg/mL) e pré-incubação com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2. Note que o bloqueio neuromuscular em todas as concentrações e na pré-incubação foi irreversível após lavagem. Observe que a contratatura apresentada com o uso de 100µg/mL foi inibida pelo uso de antiveneno comercial. AC: Antiveneno Comercial 101

Fig. 12. Morfologia do músculo extensor longo dos dígitos de camundongo em corte transversal. Os músculos foram incubados com Solução nutritiva de Tyrode (controle); 3, 10, 30, 100 e 300µg/mL de *B. fonsecai*. N: Células normais; E: células edemaciadas; D: células delta; G: células ghost. Barra = 100 µm 103

Fig. 13. Morfologia do músculo extensor longo dos dígitos de camundongo em corte transversal. Os músculos foram incubados com 100µg/mL sozinho ou pré-incubados com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 respectivamente. C: Células normais; E: células edemaciadas; D: células delta; H: células hipercontraídas; G: células ghost. Barra = 100 µm 104

Fig. 14. Análise da atividade da CK *in vitro*. A) Atividade da CK das preparações EDL mantidas em Tyrode (controle) comparada com a atividade das preparações tratadas com o veneno de *Bothrops fonsecai* (100µg/mL). B) A pré-incubação de *B. fonsecai* (100µg/mL) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 reduziram significativamente a atividade da CK quando comparada ao veneno sozinho. Cada barra representa a média ± DP de 5-7 experimentos. *p<0,05 comparado com controle Tyrode. #p<0,05 comparado com o veneno sozinho. AC: antiveneno botrópico comercial..... 105

Fig. 15. Morfologia do músculo gastrocnêmio de camundongo em corte longitudinal. Os músculos foram isolados 3, 6 e 9 horas após injeção do veneno de *B. fonsecai* (30µg/mL). Note o aumento na presença de lesões nos miócitos, assim como infiltrado inflamatório e hemorragias na área do nas áreas de endomísio e perimísio de forma concentração-dependente. N: células normais; L: células lesionadas; H: Hemorragia; I: Infiltrado inflamatório. Barra = 50 µm..... 106

Fig. 16. Morfologia do músculo gastrocnêmio de camundongo em corte longitudinal. Os músculos foram isolados 6 horas após injeção do controle antiveneno, o veneno bruto de *B. fonsecai* (30µg) sozinho ou pré-incubado com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2. Observa-se a redução das lesões musculares e hemorragia, porém ainda é observada a presença de infiltrado inflamatório. N: células normais; L: células lesionadas; H: Hemorragia; I: Infiltrado inflamatório..... 107

Fig. 17. Análise da atividade da CK plasmática. A) Camundongos que tiveram solução salina injetadas em seus respectivos músculos gastrocnêmios comparada com aqueles que receberam *B. fonsecai* (30µg/mL). Note que a pré-incubação do veneno com antiveneno botrópico comercial reduziu significativamente a atividade de CK após 6 horas de injeção B. Cada barra representa a média ± DP de 5 experimentos. *p<0,05 comparado com controle salina. #p<0,05 comparado com o veneno sozinho. AVc: antiveneno botrópico comercial 108

Fig. 18. Atividade hemorrágica do veneno de *B. fonsecai* na pele dorsal de ratos. A) Curva concentração-resposta; B) Neutralização dessa atividade pela pré-

incubação (30 min a 37 °C) do veneno (30µg) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2; C e D) Figuras representativas dos halos hemorrágicos. As colunas representam a média ± EPM de 5 animais. *p<0,05 comparado com controle negativo (----; solução salina). #p<0,05 comparado com controle positivo (veneno). Barra: 0,3 cm. AVc: Antiveneno botrópico comercial... 109

Fig. 19. Atividade edematogênica do veneno de *B. fonsecai* na pele dorsal de ratos (A) e sua neutralização pelo antiveneno botrópico comercial após pré-incubação (30 min a 37°C) nas proporções 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno) (B). As colunas representam a média ± EPM de 5 animais. *p<0,05 comparado com controle negativo (-----; solução salina). #p<0,05 comparado com controle positivo (veneno de *B. fonsecai*). AVc: Antiveneno botrópico comercial 110

Fig. 20. Atividade coagulante do veneno de *B. fonsecai* (A) e sua neutralização pelo antiveneno botrópico comercial após pré-incubação (30 min a 37°C) nas proporções 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno) (B). As colunas representam a média ± EPM de 5 animais. *p<0,05 comparado com controle negativo (-----; solução salina). #p<0,05 comparado com controle positivo (veneno de *B. fonsecai*). AVc: Antiveneno botrópico comercial 111

Fig. 21. Perfil de eluição das corridas controle (perfil nulo) e reação (na proporção 1:1). Todos os perfis foram divididos em três regiões (...) para análise das alterações da área sob a curva das mesmas. Note um aumento da área sob a curva da reação na região 1 (de alto peso molecular) indicando a formação de complexos (→) 113

Fig. 22. Análise das ligações entre veneno e antiveneno por SE-HPLC. Os perfis de eluição das amostras de *B. fonsecai* pré-incubado com AC (A,C,E,G) e AE (B,D,F,H) foram divididos em 3 regiões: A,B) Região 1, onde predominantemente encontram-se os complexos veneno:antiveneno; C,D) Região 2, onde localizam-se os antivenenos e substâncias reativas; E,F) Região 3, região de componentes com baixo peso molecular 114

Fig. 23. Perfil eletroforético e imunoblotting dos venenos brutos de *B. jararaca* e *B. fonsecai*. A) SDS-PAGE das proteínas dos venenos brutos de *B. jararaca* e *B. fonsecai* coradas por prata. B) Imunoblotting das proteínas dos venenos de *B. jararaca* e *B. fonsecai* utilizando antiveneno comercial como anticorpo primário 117

Tabela 1. Max_H e EC₅₀ da Região 2. Note que AVc apresenta maior Max_H (Ligação máxima entre veneno e antiveneno) demonstrando uma maior reatividade que AVe, porém AVe, como já era esperado, apresenta maior afinidade para com *B. fonsecai* conforme observado pela EC₅₀ (valor onde aproximadamente 50% do antiveneno reativo se encontra ligado). AVc: Antiveneno botrópico comercial. AVe: Antiveneno específico 115

Tabela 2. Atividades biológicas causadas pelo veneno de *Bothrops fonsecai* quando comparadas ao veneno de *Bothrops jararaca*. Atividade neuromuscular realizada com 100µg/mL de veneno; atividades miotóxica, edematogênica, coagulante e esterásica foram realizadas utilizando 30µg de veneno; para a atividade proteolítica em caseína utilizou-se 100µg de veneno. MHD, dose mínima hemorrágica, é a dose que causa um halo de 1cm de hemorragia. U: unidade. 119

I. INTRODUÇÃO

As serpentes são animais vertebrados, pertencentes à classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Ofidia. Acredita-se que estas podem ser derivadas de lagartos subterrâneos (Franco, 2003) e embora tenham surgido no período Cenozóico (135 milhões de anos atrás) (Rage, 1994), seu maior desenvolvimento ocorreu durante o período Cenozóico.

Atualmente, a subordem Ofidia inclui 3.458 espécies distribuídas em 26 famílias (Reptile Database, 2014) e destas, mais de duzentas espécies são venenosas (Matsui, Fujimura e Titani, 2000) cujo aparato produtor de veneno é formado por glândulas exócrinas modificadas.

No Brasil, estão identificadas 381 espécies de serpentes (9 famílias) e destas, 60 são peçonhentas (possuem glândulas ligadas a presas especializadas) divididas em 2 famílias: Viperidae e Elapidae (Bernils e Costa, 2012).

1.1 Venenos Ofídicos: Caracterização Geral

Venenos ofídicos compreendem em um *pool* de substâncias inorgânicas como: cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo e zinco, que estão ligadas a mecanismos catalíticos de componentes enzimáticos (Bjarnason e Fox, 1994); e orgânicas como: carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas e peptídeos. As proteínas constituem a maior parte do veneno (90 a 95% do peso seco) (Markland, 1998) e muitas delas possuem atividade catalítica. Em relação à bioquímica, venenos ofídicos possuem 5 classes de enzimas:

- Oxidoredutases: responsáveis pelas reações de oxidação. Em venenos ofídicos, a principal oxiredutase é a L-aminoácido-oxidase (aproximadamente

130kDa) que converte aminoácidos livres em α -cetoácido produzindo amônia e peróxido de hidrogênio (MEBS, 1970), sendo esta uma das responsáveis pela hipotensão causada pelo veneno (através da ativação da guanilato-ciclase solúvel na presença de superóxido dismutase) (Aird, 2002). Também vem sendo associadas a ativação das plaquetas (Lu et al, 2005) e indução de apoptose (Suhr e Kim, 1996; Torii et al, 1997; Torii et al, 2000; Ali et al, 2000; Izidoro et al, 2006).

- Hidrolases: em venenos de serpentes, as fosfatases (ácida e alcalina), fosfodiesterases e 5-nucleotidases são largamente encontradas. As fosfatases, (peso molecular entre 90 e 100kDa) hidrolisam os mononucleotídeos 3'05'-fosfato, enquanto as fosfodiesterases (peso molecular entre 90 e 150 kDa) atuam sobre os ácidos nucleicos removendo 5'mononucleotídeos sucessivos da cadeia de polinucleotídeos começando pelo terminal 3'hidroxila (Iwanaga e Suzuki, 1979). Já a 5'nucleotidase, de aproximadamente 74kDa, hidrolisa o fosfato monoéster que se liga na posição 5' do DNA ou RNA (Iwanaga e Suzuki, 1979).

- Glicosidases: a hialuronidase por exemplo, catalisa as reações de hidrólise do ácido hialurônico (presente na pele, tecido conjuntivo e tendões) na intenção de facilitar a difusão das toxinas para os tecidos (Mayer, Reichel e Linker, 1960).

E, por fim, as classes com maior importância:

- Proteases: quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. São importantes em diversos processos fisiológicos como na coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos, porém esses efeitos se tornam exacerbados no caso de acidentes ofídicos.

- Lipases: Enzimas digestivas que catalisam a hidrólise de lipídios, atuando sobre as ligações éster presentes em acilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol (Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999). Em venenos ofídicos, as fosfolipases A₂ (PLA₂) são intensamente estudadas.

1.1.1 Proteases

As proteases encontradas em venenos de serpentes são divididas em dois tipos principais: serino e metaloproteases.

- Serinoproteases estão envolvidas em atividades como digestão proteica, regulação da pressão arterial, coagulação sanguínea, ativação do sistema imunológico e inflamação, podendo ser associada a patologias graves como trombose vascular, embolia pulmonar, infarto do miocárdio e isquemia cerebral (Russo, 2006).

- Metaloproteases são enzimas dependentes de zinco associadas às atividades hemorrágicas, fibrinolítica e inibidora da agregação plaquetária (Bjarnason e Fox, 1994; Hite, Bjarnason e Fox, 1994; Rawlings e Barrett, 1995), além de causar mionecrose, danos à pele, edema e outras reações associadas com inflamação (Gutiérrez et al., 1995; Rucavado et al., 1998; Rucavado et al., 2002; Clissa et al., 2001; Costa et al., 2002; Laing et al., 2003).

1.1.2 Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂), hidrolisam os 3-sn-fosfoglicerídeos na posição 2 da ligação acil-éster, liberando ácidos graxos e fosfolipídeos. Estão presentes no pâncreas de mamíferos com a função digestiva (Kini, 1997) sendo essas relacionadas a diversos processos fisiológicos como fertilização (Fry et al, 1992), proliferação celular (Arita et al, 1991), contração da musculatura lisa (Nakajima et al, 1992), hipersensibilização e processos inflamatórios (Vadas et al, 1993), assim como na manutenção de depósito de fosfolipídeos e reparo da membrana plasmática (Dennis et al, 1997). Essas enzimas são também amplamente encontradas em venenos de animais.

As PLA₂ sintetizadas nas glândulas produtoras de venenos de diferentes espécies de serpentes possuem uma gama variada de efeitos farmacológicos diretos ou indiretos como: neurotoxicidade (pré e/ou pós-sináptica), miotoxicidade (mionecrose local e sistêmica), cardiotoxicidade, efeito anticoagulante, iniciador ou inibidor da agregação plaquetária, atividade hemolítica, hemorragia local e sistêmica, atividade anti-hemorrágica, atividade convulsionante, atividade hipotensiva, atividade edematogênica, lesão de órgãos e tecidos (Kaiser et al., 1990; Kini, 1997).

1.2 Família Viperidae e *Bothrops* sp.

A família Viperidae inclui serpentes solenóglifas (cujas presas retráteis são localizadas na região anterior do maxilar superior) e é dividida em 4 subfamílias: Azemiopinae, Causinae, Viperinae e Crotalinae (McDiarmid, Campbell e Touré, 1999), sendo apenas a última encontrada no Brasil. A subfamília Crotalinae inclui

serpentes do gênero *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Crotalus* e *Lachesis* (Bérnils e Costa, 2012) e são causadoras de aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos registrados no país.

Atualmente, no Brasil estão descritas 27 espécies de *Bothrops* sp. (Bérnils e Costa, 2012), sendo essas responsáveis por mais de 73% dos acidentes ofídicos registrados pelo Ministério da Saúde com letalidade de aproximadamente 0,6% nos casos tratados (Zeni et al., 2007). No ano de 2011 foram registrados 30.836 acidentes ofídicos (Brasil, 2012), sendo mais de 22 mil causados por esse grupo.

Acidentes por essas serpentes induzem mais efeitos clínicos locais (hemorragia, dor, edema, equimose, bolhas, necrose, abscesso, gengivorragia, hematúria, hematoma e petéquias) porém em certos casos, os efeitos podem evoluir para sistêmicos (insuficiência renal, choque, epistaxe, septicemia, hematêmese, insuficiência respiratória e hemorragia genital) (Mandelbaum, Assakura e Reichl, 1984; Hofmann e Bom, 1987; Rosenfeld, 1971; Ribeiro e Jorge, 1997). A insuficiência renal e respiratória, o choque e a septicemia embora raros, são apontados como as principais causas de óbitos (Amaral et al., 1986; Cardoso et al., 2003).

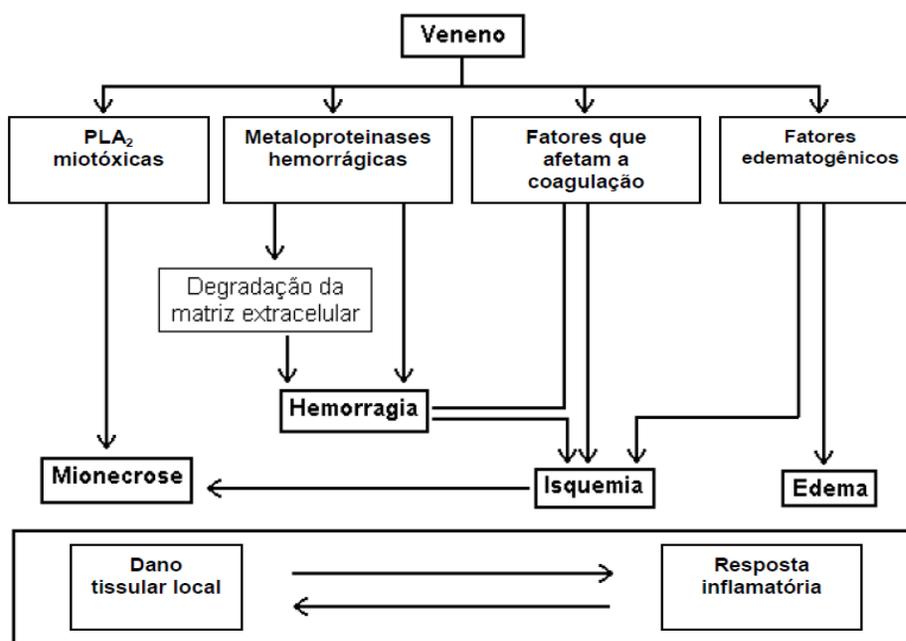


Fig. 1. Hipóteses sobre o desenvolvimento dos efeitos locais induzidos por venenos botrópicos (Gutiérrez e Lomonte, 2003).

1.3 *B. fonsecai*, *B. alternatus* e *B. cotiara*

Hoge e Beluomini (1960/1962) estudaram a alopatricidade (espeiação geográfica) de três espécies de *Bothrops* sp: *B. fonsecai*, *B. alternatus* e *B. cotiara* (Fig. 3) e demonstraram que são espécies afins. A partir deste e outros estudos, pode-se afirmar que essas espécies alimentam-se apenas de mamíferos, ocorre dimorfismo sexual onde as fêmeas são maiores que machos (Sazima e Manzani, 1998), são terrestres, possuem região dorsal com coloração marrom a preta, ventre de coloração predominantemente preto, circunferência moderada a robusta, não possuem cauda preênsil, possuem manchas dorsais em forma de espada e uma mancha prostoorbital na cabeça com distintivo preto (Fenwich et al., 2009).

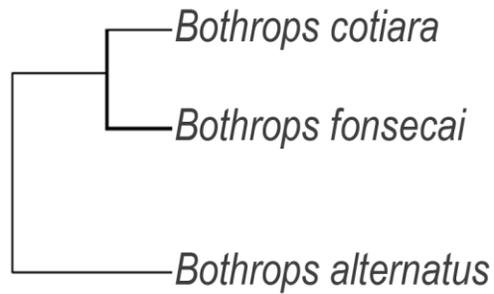


Fig. 2. Árvore filogenética das espécies *B. cotiara*, *fonsecai* e *alternatus*. (Fenwich et al., 2009). Note a proximidade filogenética entre as espécies.

B. cotiara e *B. fonsecai* possuem distribuição geográfica semelhantes, porém não são espécies simpátricas, ou seja, não coabitam a mesma região (Fig. 3). Uma análise comparativa proteômica demonstrou diferenças entre seus venenos, porém a diferença mais eminente é em relação as PLA₂ que não são expressas no veneno de *B. cotiara* porém são abundantes no veneno de *B. fonsecai* (~30% do total de proteínas do veneno) (Tashima et al., 2008).



Fig. 3. Distribuição geográfica de *B. fonsecai* e *B. cotiara* (Tashima et al., 2008).

1.4 *Bothrops fonsecai*

Incluída na lista de espécies “quase ameaçadas” de extinção, *B. fonsecai* é uma serpente continental com distribuição geográfica restrita à Mata Atlântica (entre o nordeste de São Paulo, sul do Rio de Janeiro e extremo sul de Minas Gerais) em áreas de grande altitude (1000 – 1600m) onde encontram-se predominantemente floresta de Araucária (*Araucaria augustifolia*) (Campbell e Lamar, 2004).

Sua distribuição geográfica restrita a ambientes pouco habitados e similaridade morfológica com outras espécies botrópicas (em especial *B. alternatus*, uma das maiores causadoras de acidentes ofídicos no Brasil) pode subestimar a existência de casos ou explicar a ausência de acidentes ofídicos registrados; porém a devastação de seu habitat leva a sugerir o aparecimento de envenenamentos causados por essa serpente, uma vez que a maioria dos acidentes botrópicos ocorre em áreas anteriormente ocupadas por Mata Atlântica (Sazima,1992), reforçado assim , a importância de estudo prévio das atividades biológicas induzidas pelo veneno e a eficácia do antiveneno comercial.

Embora descrita em 1959 (Hoge e Belluomini), poucos são os estudos referidos na literatura especializada sobre o veneno de *B. fonsecai* e quase ausentes aqueles que estudam suas atividades biológicas de modo sistemático usando-se métodos *in vivo* e *in vitro*.

A partir dos poucos estudos publicados, sabe-se que o veneno de *B. fonsecai* tem atividades hialuronidase, proteolítica, fosfolipásica (Pidde-Queiroz et al, 2008), trombina-like ao coagular diretamente o fibrinogênio (Nahas, Kamiguti e Barros, 1979), não interfere na via alternativa (sistema imunológico) (Pidde-Queiroz et al., 2010), possuem metaloproteases tipo 1 e 3 (~42%), fosfolipases A₂ (~30% das proteínas do veneno), serinoproteases (~4,1%), lectina-like tipo C (~9%), além de

desintegrinas, fatores de crescimento, CRISPs, e L-aminoácido oxidase (Tashima et al, 2008), além de apresentar efeito bloqueador neuromuscular e miotóxico em preparações neuromusculares isoladas (Collaço et al, 2012; Fernandes et al., 2014).

1.5 Interação antígeno:anticorpos

Anticorpos são definidos como imunoglobulinas (glicoproteínas), compostos de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas, cada uma contendo uma região variável e uma constante ligadas por ligações dissulfídicas formando uma estrutura similar a uma letra “Y”. São produzidos quando linfócitos-B são expostos a substâncias exógenas (antígenos) e podem ser liberados na corrente sanguínea ou permanecerem na membrana plasmática das células. Esses anticorpos participarão da eliminação do antígeno por meio da resposta imune inativa e adaptativa (Abbas e Lichtman, 2005).

A estrutura química dos anticorpos permite sua ligação a antígenos específicos por ligações reversíveis e não-covalentes e embora esses possuam alta especificidade, anticorpos podem também se ligar a antígenos com estrutura similar ao que induziram sua produção por meio da reatividade-cruzada (Kumagai e Tsumoto, 2001; Abbas e Lichtman, 2005).

O primeiro contato do anticorpo com o antígeno (resposta imune primária) leva a geração de células de memória com grande especificidade que promovem respostas mais rápidas e efetivas caso haja uma segunda exposição ao mesmo antígeno (resposta imune secundária) tornando o organismo imune e resistente a este (Abbas e Lichtman, 2005). Baseado na produção de anticorpos a partir da resposta imune primária e aumento da imunidade a esse antígeno na resposta imune secundária, foram desenvolvidas vacinas, que consistem na indução de uma

resposta imune primária artificialmente pela inoculação/injeção de antígenos atenuados ou inativados. Além das vacinas, anticorpos também podem ser utilizados na terapêutica como, por exemplo, na soroterapia (tratamento utilizado para acidentes ofídicos).

1.6 Antivenenos e acidentes ofídicos

Antivenenos consistem em imunoglobulinas (anticorpos), utilizados no tratamento de acidentes ofídicos causados pelas serpentes (ou no grupo de serpentes) cujos venenos foram utilizados durante o processo de produção do antiveneno. No Brasil, os antivenenos são produzidos em cavalos por meio de sucessivas inoculações de doses não-letais de venenos afim de induzir uma resposta imune/produção de anticorpos. Após a produção de anticorpos, o plasma do animal é coletado e os anticorpos são fracionados e purificados.

Os antivenenos comerciais mais comuns no Brasil são: i) antiveneno botrópico pentavalente produzido através da injeção de um *pool* de veneno de 5 serpentes do gênero *Bothrops* sp. e é indicado para acidentes causadas por serpentes desse gênero; ii) antiveneno crotálico, produzido através da inoculação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e é indicado para acidentes causados por *Crotalus* sp.; iii) antiveneno elapídico bivalente, preparado com venenos de *Micrurus frontalis* e *M. corallinus*, indicado para acidentes causados por *Micrurus* sp.; iv) antiveneno botrópico-crotálico, produzido com o *pool* de venenos utilizados no antiveneno botrópico assim como veneno de *Crotalus durissus*, sendo esse indicado nos casos de acidentes por *Bothrops* sp. e *Crotalus* sp.; e v) antiveneno botrópico-laquétrico produzido com o *pool* de venenos botrópicos e o veneno de *Lachesis muta*, utilizado no tratamento de acidentes causados por *Bothrops* sp. e *Lachesis* sp. (ANVISA,

2010). Embora com diferentes capacidades neutralizantes, venenos de serpentes do mesmo gênero que aquelas utilizadas no protocolo de imunização, apresentam reatividade cruzada com antivenenos permitindo que esses sejam amplamente utilizados na soroterapia (De Roodt et al., 1998).

1.6.1 Análise das ligações veneno:antiveneno

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para o estudo das ligações entre veneno:antiveneno (antígeno:anticorpo) a fim de correlacionar sua afinidade com capacidade neutralizante, como, por exemplo, a avaliação dessas ligações utilizando cromatografia líquida de alta performance por exclusão molecular (SE-HPLC).

O estudo dessas ligações por SE-HPLC é feito através da análise dos perfis de eluição e permite a separação, detecção e quantificação dos complexos veneno:antiveneno quando comparados ao veneno e antiveneno sozinhos (Stevens, 1889; Sanny, 2002) baseando-se nas equações derivadas da lei da ação das massas (Sanny e Price, 2001).

Considerando que SE-HPLC separa as substâncias por seu peso molecular, o surgimento de picos com maior peso molecular (menor tempo de eluição) nas amostras onde veneno:antiveneno foram pré-incubados, quando comparados aos perfis de eluição de veneno e antiveneno sozinhos, indica a formação de complexos (Sanny, 2002). Os principais fatores a serem observados nos perfis de eluição são o tempo de eluição (peso molecular dos componentes) e a área sob a curva (concentração dos componentes); já as principais regiões a serem analisadas são a região de alto peso molecular (onde estão principalmente os complexos veneno:antiveneno) e a região intermediária onde veneno e antiveneno não reagem. Essa técnica nos provém informações sobre a magnitude das reações, afinidade e

valência dos antivenenos e estabilidade, massa molecular relativa e estequiometria dos complexos.

Ensaio experimentais com o uso de antiveneno botrópico comercial na neutralização dos efeitos dos venenos botrópicos têm sido largamente utilizados uma vez que o gênero *Bothrops* não é um grupo homogêneo e alguns componentes são amplamente distribuídos nos venenos no grupo enquanto outros são restritos a algumas espécies. Assim, ensaios experimentais utilizando antiveneno botrópico na neutralização de atividades biológicas de venenos botrópicos por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, possibilitam não somente respostas de cunho clínico (tratamento de acidentes), mas também constituem-se em uma valiosa ferramenta farmacológica para avaliar a existência de diferenças na composição dos diversos venenos através da reatividade cruzada entre veneno e antiveneno (Pla, Gutiérrez e Calvete, 2012).

Levando em consideração os fatos acima citados, este trabalho avaliou a toxicidade do veneno de *B. fonsecai* através da análise dos efeitos já observados nos demais venenos botrópicos como a atividade bloqueadora sobre a junção neuromuscular, atividade miotóxica, hemorrágica, edematogênica e coagulante assim como a sua caracterização bioquímica. A neutralização dessas atividades por antiveneno botrópico comercial e a comparação das ligações antígeno:anticorpo (veneno:antiveneno) entre *B. fonsecai* e os antivenenos botrópico comercial e específico usando SE-HPLC também foram estudadas.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Estudo da toxicidade do veneno de *Bothrops fonsecai* e sua neutralização por antiveneno botrópico comercial.
- Análise das ligações veneno:antiveneno (antígeno:anticorpo).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação dos efeitos bloqueador neuromuscular, miotóxico, hemorrágico, edematogênico e coagulante do veneno de *B. fonsecai*;
- Avaliação das atividades fosfolipásica, proteolítica e esterásica;
- Análise da neutralização dessas atividades por antiveneno botrópico comercial nas proporções de 5:1 (veneno:antiveneno; indicada pelo fabricante) e 5:2.
- Avaliação da afinidade e reatividade das ligações entre *B. fonsecai* e o antivenenos botrópico comercial por SE-HPLC e immunoblotting.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O anestésico inalatório Isoflurano e o Tiopental sódico foram adquiridos da Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (Itapira/SP). O adjuvante completo de Freund foi adquirido da Difco Laboratories, (Detroit, Miami, USA) e o adjuvante incompleto (Óleo Mineral) também foi adquirido da Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (Itapira/SP), ambos utilizados utilizado na produção do antiveneno específico. Os padrões para gel-filtração contendo tiroglobulina (670kDs), IgG bovina (158kDa), ovalbumina (44kDa), mioglobulina equina (17kDa) e vitamina B₁₂ (1,4kDa) foram adquiridas da Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). O Kit para quantificação da atividade da creatinoquinase (CK) foi adquirido da Bioclin (Quibasa Química). Os sais de alto grau de pureza para preparo das soluções nutritivas foram adquiridos da J.T. Baker Chemicals, Sigma-Aldrich Corporation e Merck KGaA.

3.2 Animais

Coelhos machos da linhagem NEW ZEALAND com peso entre 3 a 3,5Kg, adquiridos da "Granja de Coelhos Grota Azul" (Mogi Mirim, SP), ratos machos da linhagem WISTAR pesando entre 300 a 400g e camundongos machos da linhagem SWISS com peso entre 20 a 35g (idade de 8 semanas) obtidos do "Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica" (CEMIB) da UNICAMP (Campinas, SP), foram mantidos em gaiolas abastecidas com água clorada e ração industrial NUVILAB *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12h com luz e 12h sem luz). Todos os experimentos foram realizados de

acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) – protocolo nº 2648-1.

3.3 Veneno bruto de *B. fonsecai*

O lote de veneno dessecado de *B. fonsecai* utilizado neste trabalho foi resultante de um *pool* de 5 espécimes adultas, doado pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo, do Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP - São José dos Campos,SP).

3.4 Antiveneno Comercial

O antiveneno botrópico comercial foi obtido do Instituto Butantan (São Paulo,SP), sendo este produzido em cavalos. A produção do antiveneno é efetuada pela imunização de cavalos com um *pool* de venenos das serpentes *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

Os testes de neutralização das atividades do veneno de *Bothrops fonsecai* utilizando antiveneno botrópico comercial foram realizados utilizando a proporção veneno:antiveneno indicada pelo fabricante (5:1), assim como o dobro dessa proporção. Antes dos ensaios, antiveneno e o veneno foram pré-incubados a 37°C

por 30 minutos, uma vez que este trabalho teve por objetivo observar a neutralização prévia das atividades e não neutralização/tratamento.

3.5 Antiveneno Específico

O antiveneno específico, utilizado na avaliação da ligação entre veneno e antiveneno por SE-HPLC para comparação com o antiveneno botrópico comercial, foi produzido em coelhos após sucessivas inoculações de 420 a 600 μ g de veneno bruto diluído em 500 μ L de solução salina.

A primeira imunização, o desafio, (420 μ g) incluiu o adjuvante completo de Freund. Após três semanas foram realizadas as injeções subsequentes com adjuvante incompleto, tendo intervalo de uma semana entre elas.

Imediatamente antes de cada injeção do veneno, uma amostra de sangue foi coletada da veia marginal da orelha e mantida à temperatura ambiente. Após coagulação, o soro foi separado por centrifugação (500rpm por 5 min) e usado para monitorar a formação de anticorpos por gel de imunodifusão dupla (Ouchterlony, 1949). Após a formação de anticorpos, os coelhos foram anestesiados com isoflurano e exsanguinados (via carótida). O soro foi separado, aliquotado e armazenado a -25°C.

3.5.1 Imunodifusão dupla de Ouchterlony

A técnica constituiu-se em colocar o antígeno e o anticorpo em pontos diferentes de uma camada de gel, onde um difunde-se contra o outro formando um precipitado.

Lâminas de microscopia devidamente desengorduradas foram recobertas com uma camada de gel (3mL de agarose 1% em PBS). Foram feitos orifícios com 3 mm de diâmetro postos na posição horizontal (Fig. 4). No centro foi colocado o antígeno (veneno de *B. fonsecai*, 1mg/mL) e ao lado foi colocado o soro do animal sem qualquer tratamento (controle) e o obtido após imunização (10 μ L). As lâminas foram mantidas em câmara úmida por 48h. A produção de anticorpos foi acompanhada até que a linha de precipitação se tornou intensa.

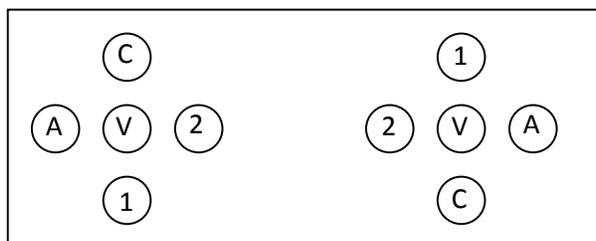


Fig. 4. Ilustração da disposição das amostras no teste de imunodifusão dupla. V: veneno de *B. fonsecai*; C: soro controle; A: antiveneno comercial; 1: soro teste coletado na última imunização; 2: soro teste coletado na penúltima imunização.

3.5.2 Purificação do Antiveneno

A purificação do antiveneno se faz necessária para concentrar e purificar as globulinas presentes no sangue de animais imunizados. Primeiramente, fez-se a digestão com pepsina (adicionando pepsina ao soro com pH ajustado em 3.25 a 20°C por 30 min.) para dividir as γ -globulinas em dois fragmentos: um é estável ao calor e possui a atividade de anticorpo (Fab), enquanto a outra parte é termolábil e

não tem ação imunológica direta (Fc). Posteriormente, separou-se as demais proteínas indesejadas através de sua desnaturação por calor (aquecido a 55 °C por 10 min ou mais, e depois rapidamente arrefecido a 40°C) e centrifugação. Tratou-se o sobrenadante com sulfato de amônio a 15% para precipitar as γ -globulinas até que a concentração desejada fosse atingida. Retirou-se todo sulfato de amônio por filtração.

Os fragmentos foram então purificados através de Cromatografia por afinidade em um sistema de cromatografia ÄKTA Prime (GE Healthcare Life Sciences) utilizando uma coluna de afinidade HiTrap de proteína G de 1mL (GE Healthcare Life Sciences) a um fluxo constante de 1mL/min.

3.6 Ensaios Biológicos

3.6.1 Testes “*ex vivo*”

Atividade neuromuscular: Músculo extensor longo dos dígitos isolado

Os animais foram eutanasiados sob anestesia com isoflurano (via inalatória). Para a dissecação do músculo extensor longo dos dígitos (EDL), uma ampla incisão foi realizada na face ântero-lateral de uma das patas posteriores do animal, com a exposição dos tendões dos músculos EDL e tibial. Seccionou-se o tendão do músculo tibial para sua retirada, causando a exposição total do músculo EDL. Amarrou-se o segmento da parte superior e a extremidade inferior (tendões ligados aos dedos) do músculo, isolando-o do animal. Durante todo o procedimento a preparação foi mantida umedecida com solução nutritiva de Tyrode, com seguinte composição, em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9; e C₆H₁₂O₆ 11,1, em água miliQ.

A extremidade inferior do músculo foi unida ao gancho fixado no fundo da cuba e o segmento superior foi passado por entre as argolas do eletrodo e fixado em um transdutor de força isométrico (LOAD CELL BG-10 GM) submetido a uma tensão de 1g/cm. A preparação foi exposta à estimulação elétrica de campo (estimulador GRASS S48), com pulsos supramaximais de 0,2ms de duração, 0,1Hz de frequência e 20V. As contrações musculares foram registradas por fisiógrafo GOULD RS 3400.

A preparação foi submetida à aeração constante com carbogênio (mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a 37°C. Foram realizados testes controle (apenas com solução nutritiva de Tyrode) e com o veneno de *B. fonsecai* (3, 10, 30, 100 e 300µg/mL), além de 100µg/mL (concentração que causou bloqueio total) pré-incubados (30min a 37 °C) com antiveneno botrópico comercial. As proporções de antiveneno:veneno utilizadas foram: a indicada pelo fabricante (1mL de antiveneno para 5mg de veneno) e o seu dobro. Todos os tratamentos foram adicionados à cuba depois um período de estabilização de 20 min.

Após 120 min de experimento, foi mensurada (em cm) a amplitude contrátil a cada 10 min, sendo calculada a porcentagem de cada ponto em relação ao valor basal. Foi medido também o tempo que leva para que se atinja 50 e 90% de bloqueio da resposta contrátil.

Foram coletadas da cuba onde estavam os músculos durante os experimentos miográficos, alíquotas de 100µL de solução Tyrode cuba nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min com reposição de igual volume de solução de Tyrode para análise da atividade da creatinoquinase (CK) (ver 3.6.3). Todos os músculos foram fixados em formol 10% para posterior análise histológica.

Determinação e neutralização da atividade coagulante

Amostras de sangue (10 mL) de ratos Wistar, retiradas pela aorta abdominal descendente foram adicionadas à 1mL de citrato de sódio a 3,8% e centrifugadas a 2500xg por 15 min (4°C) para obter um plasma rico em plaquetas.

Foram realizadas triplicatas dos controles positivos (20U trombina) e negativos (solução salina ou antiveneno botrópico comercial sozinho) em cada animal, assim como foi testado o veneno total de *B. fonsecai* (1, 3, 10, 30 e 100µg) incubados ou não com antiveneno botrópico comercial nas proporções de 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno).

A atividade coagulante foi determinada pelo tempo de coagulação. Caso a amostra não promova coagulação do plasma em até 600 seg (10 min), considera-se que a mesma não apresento atividade coagulante do plasma.

3.6.2 Testes “*in vivo*”

Determinação e Neutralização da Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica foi medida segundo o método de Theakston e Reid (1983). Ratos foram anestesiados com Tiopental sódico (via intraperitoneal, 30mg/Kg) e doses de manutenção foram administradas. Após a tricotomia do dorso do animal, foram injetados (via intradérmica) os tratamentos controle (NaCl 0,9% e antiveneno sozinho) e o veneno de *B. fonsecai* (3, 10, 30 e 100 µg/sítio) incubados ou não com antiveneno comercial e específico nas proporções 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno) diluídos em 100µL de NaCl 0,9%. Após 24h, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia (isoflurano, via inalatória) e a pele dorsal foi retirada para se medir os halos hemorrágicos observados na parte interna da pele.

Determinação e Neutralização da Atividade Edematogênica

A técnica de edema de pele foi realizada segundo Brain e Williams (1985). Os ratos foram anestesiados com Tiopental sódico (i.p., 50 mg/Kg) e doses de manutenção foram administradas. Após a tricotomia do dorso do animal, albumina marcada com ^{125}I (2,5 $\mu\text{Ci/kg}$) diluída em Azul de Evans (utilizado com marcador visual) foi injetada pela veia peniana. Após 15 min, foram injetados no dorso do animal (via intradérmica) os tratamentos controle (Tyrode e antiveneno comercial sozinhos) e o veneno de *B. fonsecai* (1, 3, 10, 30 $\mu\text{g/sítio}$) incubados ou não com antiveneno comercial e específico nas proporções 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno) diluídos em 100 μL de NaCl_2 0,9%. Após 30 min da inoculação tratamentos, os animais tiveram aproximadamente 3mL de sangue coletados através de punção cardíaca, que foi centrifugado por 15 min a 2500 x g. Posteriormente, os animais foram eutanasiados sob anestesia (Isoflurano, via inalatória) e a pele dorsal foi removida. Os sítios de injeção dos tratamentos foram cortados com instrumento circular cortante (15mm de diâmetro) e a radioatividade presente em cada sítio, bem como as amostras de plasma (obtidos após centrifugação), foi quantificada por contador gama. O edema formado em cada sítio foi calculado a partir da radioatividade presente no plasma e expresso como volume de plasma extravasado (μL).

Determinação e Neutralização da Atividade miotóxica

Camundongos Swiss tiveram injetados em seu músculo gastrocnêmio direito solução salina e antiveneno botrópico comercial (controles), veneno de *B. fonsecai* (30 μg) e o veneno de *B. fonsecai* pré-incubado com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2. Após 1, 3, 6, 9 e 12 horas, após as injeções do controle salina e veneno sozinho, assim como 6 horas após a injeção de controle antiveneno

e amostras pré-incubadas, -os animais foram eutanasiados sob anestesia (isoflurano, via inalatória), uma amostra de sangue foi coletada via punção cardíaca para quantificação da atividade da CK presente no plasma e os gastrocnêmios foram isolados para posterior análise histológica.

3.6.3 Testes “*in vitro*”

Quantificação da atividade da creatinoquinase (CK)

As alíquotas coletadas durante os experimentos miográficos, assim como as amostras de plasma coletadas durante os ensaios de miotoxicidade *in vivo*, foram mantidas a 4°C até o momento da determinação da atividade enzimática, as quais foram analisadas utilizando-se o “kit” comercial conforme orientações do fabricante. Segundo o kit, multiplica-se o $\Delta A/\text{min}$ obtido pelo fator correspondente (8095) aos valores obtidos em espectrofotômetro Beckman DU800 (Beckman&Coulter, Indianapolis, USA), sendo o resultado a atividade enzimática, expressa em U/L.

Determinação e Neutralização da Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi avaliada pelo ensaio colorimétrico descrito por Price (2000), através da degradação de fosfatidilcolina. Amostras de *B. fonsecai* e *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) (3, 10, 30, 100, e 300 μg utilizada como controle positivo, uma vez que possui atividade fosfolipásica bem caracterizada) assim como amostras de veneno de *B. fonsecai* (3 e 10 μg) pré-incubadas (30min a 37 °C) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2, foram adicionadas a 180 μL da solução de reação composta por 0,16mg de fosfatidilcolina (diluídos em 1mL de álcool metílico) em 20mL de tampão de reação (Triton 5mM; Hepes 2mM; Azul de bromatimol 0,124%; água mili-Q 50mL), pH 7.5 a 37°C. Foi realizada curva padrão de

HCl (1.2mM; 0.625mM; 0.312mM, 0.156mM e 0mM) cujas absorvâncias apontarão o range linear de absorvância em que as amostras devem estar afim de não subestimar os resultados. A absorvância das amostras foi avaliada a 620nm após 5 minutos de incubação das amostras com a solução de reação utilizando um leitor de ELISA Spectramax 340. Após subtração do “branco” (0mM HCl), a média das triplicatas foi dividida pelo tempo de incubação (5min) e os valores obtidos foram então multiplicados por -1000. Uma unidade de atividade é equivalente a 1mM HCl/min.

Determinação e neutralização da atividade proteolítica

A atividade sobre a degradação da caseína foi analisada conforme Kunitz, 1946. Uma amostra de 1,9 mL de solução de caseína (1%) dissolvida em Tris-HCl pH 7,8 0,1M, foi incubada com 0,1 mL de cada amostra por 20 min, a 37°C. Após esse tempo, a reação foi interrompida com 2 mL de solução de ácido tricloroacético 5% e mantida em gelo por 30 min. Cada amostra foi centrifugada a 2500 x g por 15 min a temperatura ambiente em centrífuga Avanti J-20 XPI (Beckman&Coulter, Indianapolis, USA) . A absorvância do sobrenadante foi determinada em 280 nm em espectrofotômetro Beckman DU800 (Beckman&Coulter, Indianapolis, USA). Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,001 unidades na absorvância.

Determinação e neutralização da atividade esterásica

A atividade esterásica foi realizada utilizando N α -p-tosyl-L-arginina ester (TAME) conforme Schwert e Takenaka (1955). A mistura da reação consiste em 1,5mL de substrato (1mM TAME em 0,1M de Tris-HCl, pH 7,8), 1,4mL de 0,1M Tris-HCl (pH 7,8) e 0,1mL de amostra (Controle antiveneno, 3 - 30 μ g do veneno de *B. fonsecai*, e 10 μ g do veneno pré-incubado com antiveneno botrópico comercial nas

proporções 5:1 e 5:2). A mistura foi incubada por 10min a 25°C e a absorbância medida a 253nm. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento da absorbância de 0,001/min.

Dosagem proteica por Bradford

A dosagem de proteína foi feita pelo Método de Bradford (Bradford, 1976). O Comassie brilliant blue G-250 ligar-se-á a proteínas em meio ácido. A forma aniônica desse corante forma complexos com as proteínas por atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Tal complexo possui uma coloração azul e a intensidade desta coloração dependerá da concentração de proteínas da amostra.

Foram realizadas curvas padrão de albumina (100 a 800µg/mL), *B. fonsecai* e *Cdt* (0,0625mg/ml, 0,125mg/mL, 0,250mg/mL, 0,5mg/mL). Em cada poço foram pipetados 15µL de amostra e adicionados à 135µL de reativo de Bradford (comassie brilliant blue G-250, ácido ortofosfórico, etanol e água mili-Q). As leituras foram feitas a 595nm utilizando um leitor de ELISA Spectramax 340.

Eletroforese Bidimensional (2D) em gel de poliacrilamida

O veneno de *B. fonsecai* (300µg) foi dissolvido em 250µL de solução de reidratação [7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% tampão de gradiente de pH imobilizado (IPG) (GE Healthcare Life Sciences) e 1% bromofenol blue] e fitas de focalização isoeletrica IPG (IEF) (13cm, pH 3-10 linear) foram encharcados de solução antes da primeira dimensão da eletroforese (IEF) num sistema Multiphor II (GE Heathcare Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante. A primeira dimensão correu a 6°C usando um programa de eletroforese de três fases: 300V por 1min, 3500V por 1,5h e 3500V por 3,5h. Antes de correr a segunda dimensão, as

fitas IPG foram colocadas em tubos de vidro e as proteínas foram reduzidas e alquiladas por incubação sequencial nas seguintes soluções: (a) 0,05M Tris-HCl, pH 8,8, 2% SDS, 30% glicerol, 6M ureia, 0,002% bromofenol blue (tampão de equilíbrio — TE), (b) 10mg de dithiothreitol/mL em TE e então (c) uma solução de iodoacetamida (25 mg/ml) em EB. As fitas foram aplicadas diretamente em um SDS-PAGE de 15% (14 cm × 16 cm) para a eletroforese da segunda dimensão a 300V por 6h. Os géis foram fixados e corados com nitrato de prata.

3.7 Análise Histopatológica Qualitativa

Os músculos EDL assim como os músculos gastrocnêmios foram fixados em formol 10% e processados da seguinte forma: os tecidos foram desidratados em uma série crescente de etanol, em seguida diafanizados e submetidos ao processo de infiltração na parafina para serem emblocados e terem suas regiões medianas cortadas de modo seriado (10 lâminas, 3 cortes cada lâmina) em secções de 5 µm utilizando micrótomo Leica RM2245, montados em lâminas silanizadas e corados com hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico e as imagens capturadas através de microscópio Leica DM5000B, pela câmera Leica DFC 300FX CCD, acoplado a um microcomputador e carregado com um software Leica Q Win Plus c 3.2.0. A análise quantitativa ocorrerá através da contagem de células de todo o corte do material, identificando e qualificando as lesões.

Foram consideradas células lesadas as que apresentaram alterações, como: vacúolos, condensação de miofibrilas, edema e mionecrose; células normais as que

apresentaram: células íntegras, perfil poligonal celular, núcleo periférico e nenhum comprometimento no mecanismo contrátil.

3.8 Avaliação das ligações veneno:antiveneno

3.8.1 Análise por SE-HPLC

A avaliação das ligações entre veneno e antiveneno foi realizada conforme Sanny (2011) por meio de um sistema de SE-HPLC que consiste em: i) 2 bombas Waters modelo 515 (Milford, MA); ii) injetor universal Waters modelo U6K; iii) auto injetor Waters 717plus; iv) detector de arranjo de fotodiodos Waters 2996; v) coluna de exclusão molecular TSKgel G3000SWXL, 7.8mm ID x 30 cm, 5 mm, TOSOH Bioscience; e vi) desgaseificador Waters modelo ILD.

O fluxo de eluição foi mantido constantemente a 1mL/min usando tampão 0,05M de Fosfato de Sódio / 0,15M Cloreto de Sódio (pH 7,0). As respostas do detector de arranjo de fotodiodos foram gravadas por meio de hardware Lab-Pc conectado a um microcomputador Dell Optipler Gx200 munido de software Empower 2. Os resultados foram analisados usando Office Excel (Microsoft) e SigmaPlot (Systat Software Inc, Chicago/IL).

As corridas controles (1mg/mL do veneno de *B. fonsecai* e 1mg/mL de antiveneno comercial ou específico sozinhos) assim como as corridas pré-incubadas (0,156–1mg/mL de *B. fonsecai* pré-incubada com 1mg/mL de antiveneno comercial ou específico por 1h a 37°C) foram realizadas em triplicatas e a média dos valores obtidos a 280nm foi analisada.

Perfil “Nulo”

A partir das corridas controle (veneno e antivenenos sozinhos), o perfil “Nulo” foi calculado, sendo esse a soma das áreas sob a curva do controle veneno e controle antivenenos.

$$\text{Perfil “Nulo”} = \text{Área do antiveneno} + \text{área do veneno}$$

Todas as corridas controle foram realizadas usando a concentração de 1mg/mL de veneno ou antivenenos. Considerando que a curva dose-resposta das amostras pré-incubadas foi realizada a partir de uma concentração constante de antivenenos (1mg/mL) e concentração seriada de veneno (0,156 a 1mg/mL). Nesse caso, os perfis “Nulos” da curva dose-resposta foram matematicamente calculados:

$$\text{Área}_{DR} = \text{Área}_v * \text{Veneno} []$$

$$\text{“Nulo”} = \text{Área}_{DR} + \text{Área}_{av}$$

Onde:

- Área_{DR} = Área da concentração de veneno a ser calculada
- Área_v = Área do veneno (1mg/mL)
- $\text{Veneno} []$ = Concentração de veneno cuja área está sendo calculada
- Área_{av} = Área do antiveneno (1mg/mL)

Cálculo da Δ Área

A Δ Área é o cálculo utilizado para analisar as mudanças das áreas sob a curva que estão associadas com as ligações veneno:antiveneno. Para determiná-la, o perfil “Nulo” foi subtraído das amostras onde houve reação (amostras pré-incubadas).

$$\Delta\text{Área} = \text{Área “Nulo”} - \text{Área da “Reação”}$$

$$\Delta\text{Área} = \text{Área “Reação”} - \text{Área “Nulo”}$$

Análise utilizando as funções dose-resposta

As mudanças concentração-dependentes nas Δ Áreas foram avaliadas utilizando equações hiperbólicas de concentração-resposta para estimar os parâmetros de ligação:

$$\Delta\text{Área} = \frac{\Delta\text{Área}_{\text{max}} \times C}{(EC_{50} + C)}$$

Onde:

- Δ Área: Área do antiveneno e veneno ligado
- $\Delta\text{Área}_{\text{max}}$: Máximo assintótico da Δ Área
- C: Concentração inicial do reagente
- EC_{50} : Concentração inicial do reagente onde $\Delta\text{Área} = 0.5 \times \Delta\text{Área}_{\text{max}}$

Seleção das três regiões

Os perfis de eluição foram inicialmente divididos em três regiões (Sanny, 2011) escolhidas baseadas na interação do perfil “Nulo” e as amostras pré-incubadas (Fig. 5).

- Região 1 é a porção do perfil de eluição onde a área das amostras pré-incubadas é maior do que a área do perfil “nulo”. Essa é a área onde se encontram as substâncias de alto peso molecular. Os complexos devem aparecer nessa região, uma vez que quando o veneno reage com o antiveneno e forma complexos e esses possuem alto peso molecular (peso da substância do veneno adicionado à substância do antiveneno). Essa região equivale dos 250 a 433 segundos da corrida cromatográfica.
- Região 2 é a porção do perfil de eluição onde a área sob a curva das amostras pré-incubadas é menor que do perfil “nulo”. Nesta região se encontram as substâncias que não reagiram e não formaram complexos. Na teoria, a alteração na área sob a curva da Região 1 (aumento da área) deve ser inversamente proporcional a alteração observada na Região 2 (diminuição na área). Essa região equivale dos 434 a 640 segundos da corrida cromatográfica.
- Região 3 é a região onde se encontram as substâncias de baixo peso molecular, substâncias essas que normalmente não reagem com o antiveneno. Essa região equivale dos 641 a 900 segundos.

Análise da capacidade relativa de ligação (Max_H), EC_{50} e a estequiometria relativa das ligações

O Max_H provém informações sobre a capacidade de ligação dos antivenenos. O EC_{50} é o valor onde aproximadamente 50% do antiveneno reativo encontra-se ligado com o veneno. A magnitude do EC_{50} reflete inversamente a afinidade de ligações entre veneno e antiveneno. Ambos os parâmetros foram analisados usando a Região 2, onde se encontra o pico de antiveneno.

3.8.2 Análise por Immunoblotting

Alíquotas de peçonha foram submetidas à eletroforese realizada em sistema eletroforético Hoefer Mighty Small SE260 (Amersham Biosciences), com gel de acrilamida de 12,5% contendo SDS e 100 V constantes. Os marcadores de peso molecular Amersham (GE Healthcare) foram incluídos em cada corrida. Terminada a corrida, as proteínas no gel foram transferidas para membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories) com auxílio de tampão de Towbin, em cuba de transferência Mighty Small TE22 (Hoefer-Pharmacia) com amperagem de 200 mA e voltagem 100 mV por 1:30h. A eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana com Ponceau S.

Após lavagem da membrana com água destilada e tampão de solução basal (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e 0,5% Tween 20), os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de leite 5% por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com antiveneno comercial (1:1000) diluído em solução basal *overnight*. Após este intervalo, as membranas foram expostas a conjugado IgG-peroxidase anti-horse (Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em solução basal por 2 horas. A membrana então foi lavada e as bandas

imunorreativas reveladas por colorimetria utilizando 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich). As imagens foram capturadas para análise qualitativa das bandas.

3.9 Análise Estatística

Todos os resultados foram representados pela média de experimentos \pm erro padrão da média ou desvio padrão da média, dependendo do teste. Os resultados dos ensaios miográficos foram comparados por meio de teste *t-Student*. Para comparar os tratamentos dos demais testes foi utilizado o ANOVA (análise de variância para medidas repetidas). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 Composição do veneno

Através da eletroforese bidimensional, pôde-se observar que o veneno bruto de *Bothrops fonsecai* possui uma grande quantidade de substâncias entre 15 e 70kDa, sendo a maior parte dessas, substâncias com o ponto isoelétrico abaixo de 7 (Fig. 5A). Já o perfil de eluição confirma a presença da maior parte das substâncias presentes no veneno dentre o range de peso molecular acima citado (Fig. 5B).

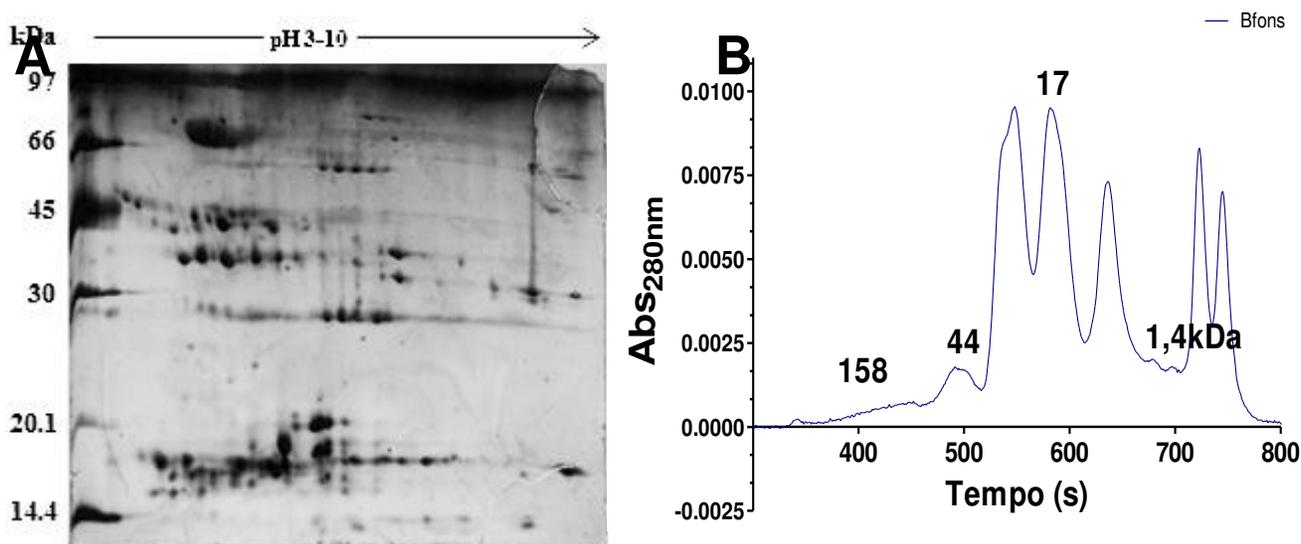


Fig. 5. Perfis do veneno de *B. fonsecai*. A) SDS-PAGE 2D do veneno bruto de *B. fonsecai*. B) Perfil de eluição por SE-HPLC do veneno de *B. fonsecai*. Note a presença de regiões onde comumente se encontram Metaloproteinases PI (M-PI) e PIII (M-PIII), assim como serinoproteases (SP), fosfolipases A₂ (PLA₂) e CRISPs, corroborando com a literatura.

4.2 Atividades enzimáticas

4.2.1 Atividade fosfolipásica

O veneno de *B. fonsecai* demonstrou possuir uma atividade fosfolipásica significativamente maior que a apresentada pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Fig 6A). Essa atividade foi significativamente, porém parcialmente inibida pelo antiveneno botrópico comercial na proporção 5:2 (veneno:antiveneno) (Fig 6B).

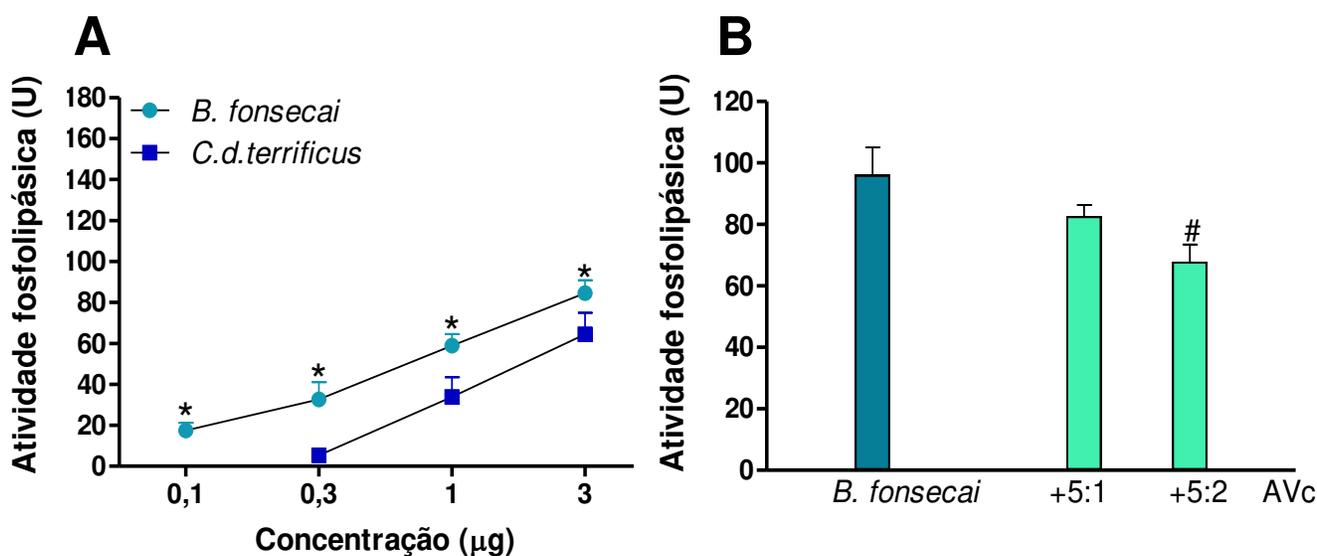


Fig. 6. Atividade fosfolipásica do veneno total de *B. fonsecai*. A) Comparação com *Crotalus durissus terrificus*, controle positivo; B) Inibição parcial da atividade após pré-incubação do veneno com antiveneno botrópico comercial (AVc), a 37°C por 1h. Os pontos e colunas representam a média \pm DP de 5-7 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com *C. d. terrificus*. # $p < 0,05$ comparado com veneno sozinho.

4.2.2 Atividade proteolítica

O veneno de *B. fonsecai* apresentou atividade proteolítica a partir da concentração de 30µg/mL, sendo essa concentração utilizada para a realização dos ensaios com antiveneno botrópico comercial. A pré-incubação do veneno bruto de *B. fonsecai* com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno), não foi capaz de neutralizar a atividade proteolítica causada pelo veneno (Fig 7).

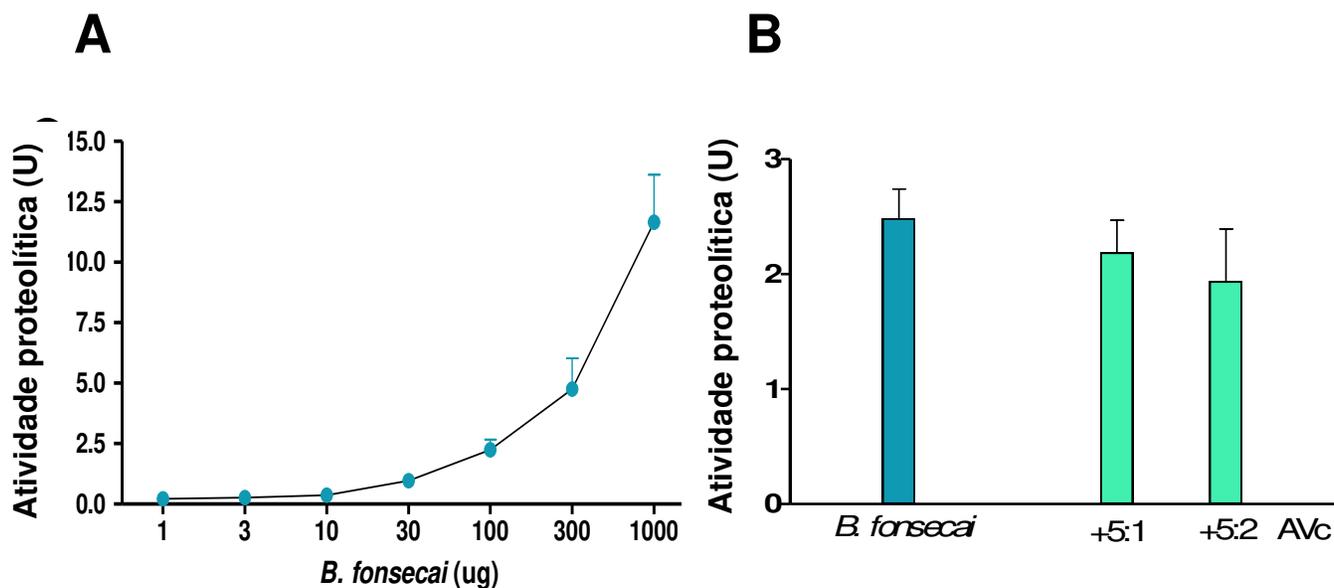


Fig. 7. Atividade proteolítica do veneno de *B. fonsecai*. A) Curva concentração-resposta da atividade proteolítica; B) Pré-incubação do veneno bruto de *B. fonsecai* (30µg) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 a 37°C por 1h. Os pontos e colunas representam a média ± DP de 3 experimentos. Não foi observada neutralização significativa.

4.2.3 Atividade esterásica

A atividade esterásica de *B. fonsecai* demonstrou ser dependente da concentração. A pré-incubação do veneno bruto de *B. fonsecai* com antiveneno botrópico comercial causou neutralização dessa atividade a partir da proporção 5:1 e embora parcial, essa neutralização demonstrou ser significativamente diferente daquela apresentada pelo veneno bruto (Fig. 8).

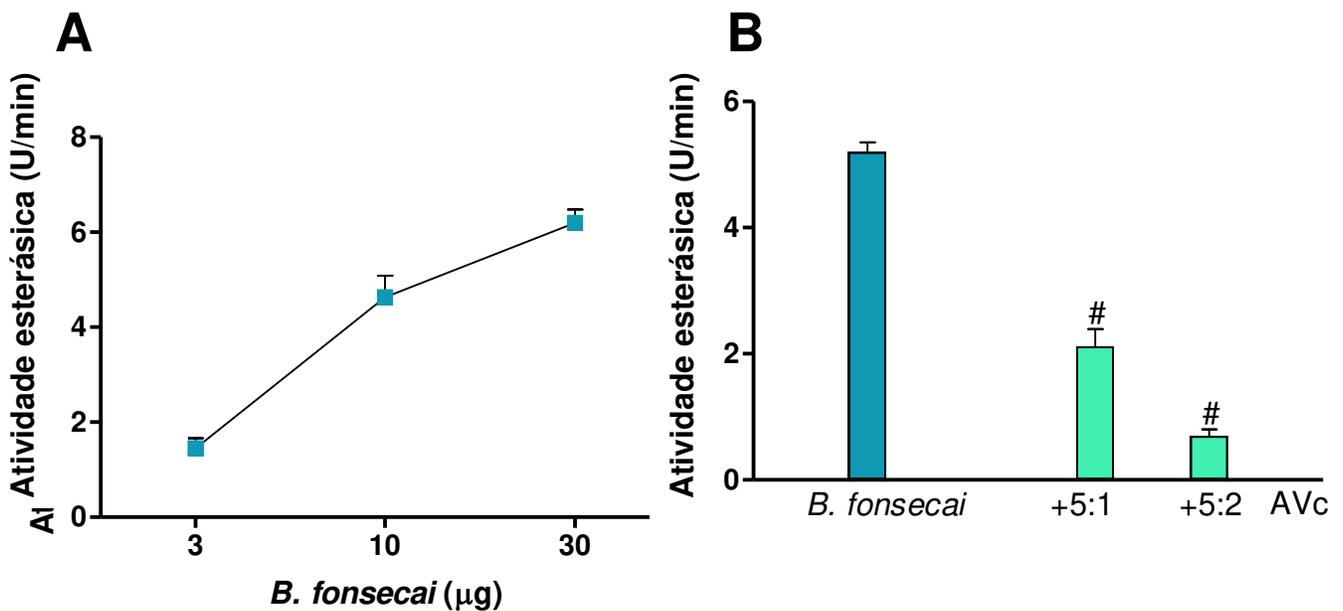


Fig 8. Atividade esterásica do veneno de *B. fonsecai*. A) Curva concentração-resposta; B) Pré-incubação do veneno bruto de *B. fonsecai* ($30\mu\text{g}$) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 a 37°C por 1h. Os pontos e colunas representam a média \pm DP de 3 experimentos. # $p < 0,05$ comparado com veneno sozinho.

4.3 Atividades biológicas

4.3.1 Atividade neuromuscular

O veneno causou um progressivo e irreversível bloqueio neuromuscular concentração-dependente (Fig 9A), cujo tempo para obtenção de 50% da resposta contrátil foi $84,6 \pm 6,5$; $76,7 \pm 11,8$; $65,3 \pm 11,9$; $41,2 \pm 6,4$ e $46,6 \pm 4,2$ min, para 3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (Fig 9B). A partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obteve-se um bloqueio total da contração muscular. As concentrações de 3 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não foram diferentes de 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente (dados não mostrados).

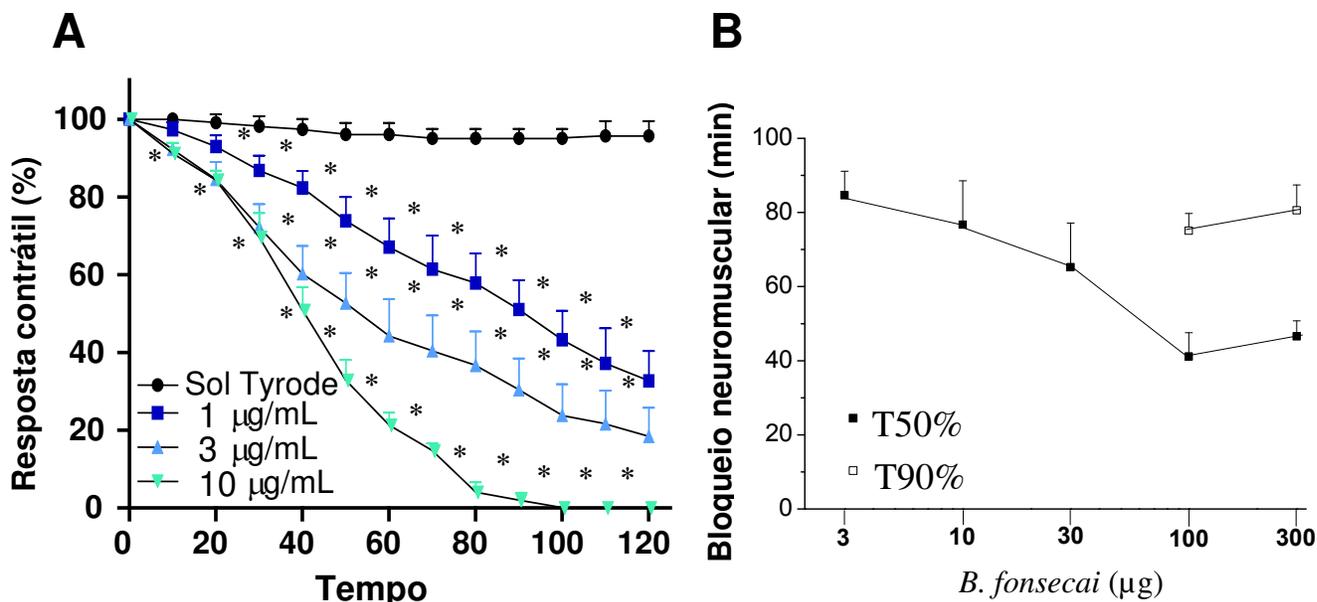


Fig. 9. Curva da resposta contrátil da preparação EDL, sob estimulação elétrica indireta, após adição de *B. fonsecai*. A) Bloqueio da contração neuromuscular concentração-dependente; B) Tempo necessário para obtenção de 50 e 90% de bloqueio da resposta contrátil. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5-7 experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle Tyrode.

A pré-incubação com antiveneno inibiu parcialmente o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno de *B. fonsecai*, tanto na proporção 5:1 ($74,6 \pm 8,6\%$ aos 120min) quanto em 5:2 ($37,5 \pm 5,5\%$ aos 120 min), proporcionando uma proteção média de 25,4% e 62,5%, respectivamente (Fig 10).

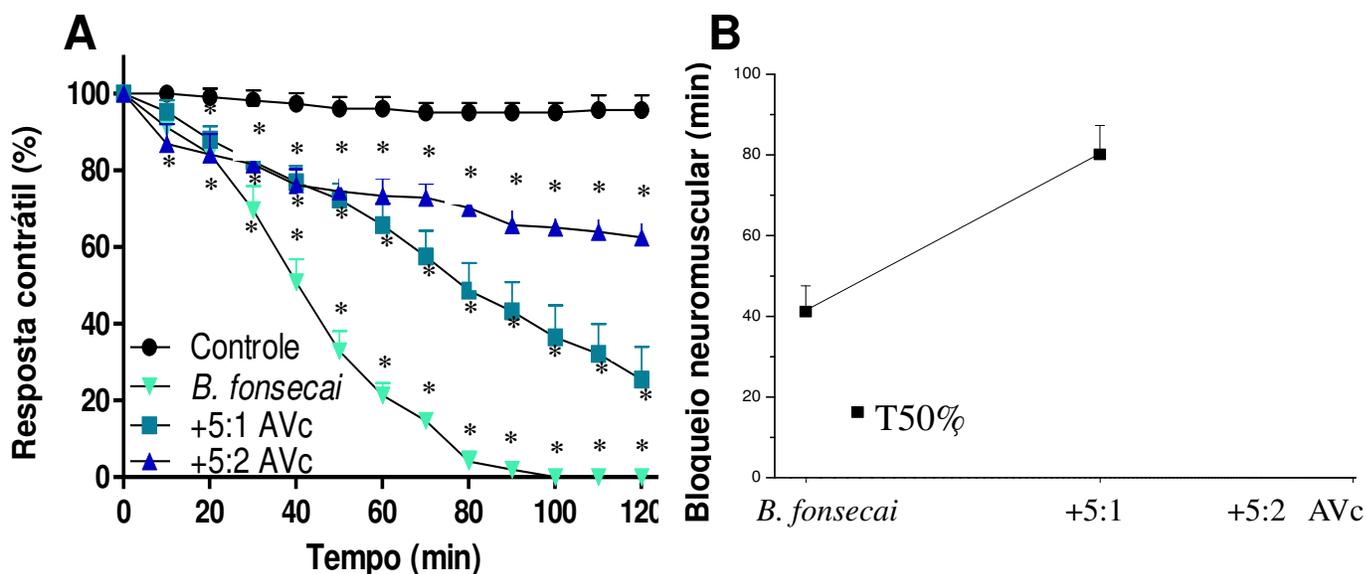


Fig. 10. Curva da resposta contrátil da preparação EDL sob estimulação elétrica indireta, após adição $100\mu\text{g/mL}$ de veneno de *B. fonsecai* pré-incubados ou não com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2. A) Bloqueio neuromuscular causado por *B. fonsecai* ($100\mu\text{g/mL}$) e a proteção parcial pelo antiveneno comercial. B) tempo necessário para obtenção de 50% de bloqueio da resposta contrátil. Cada ponto representa a média \pm EPM de 5-7 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com controle Tyrode. AVc: antiveneno botrópico comercial.

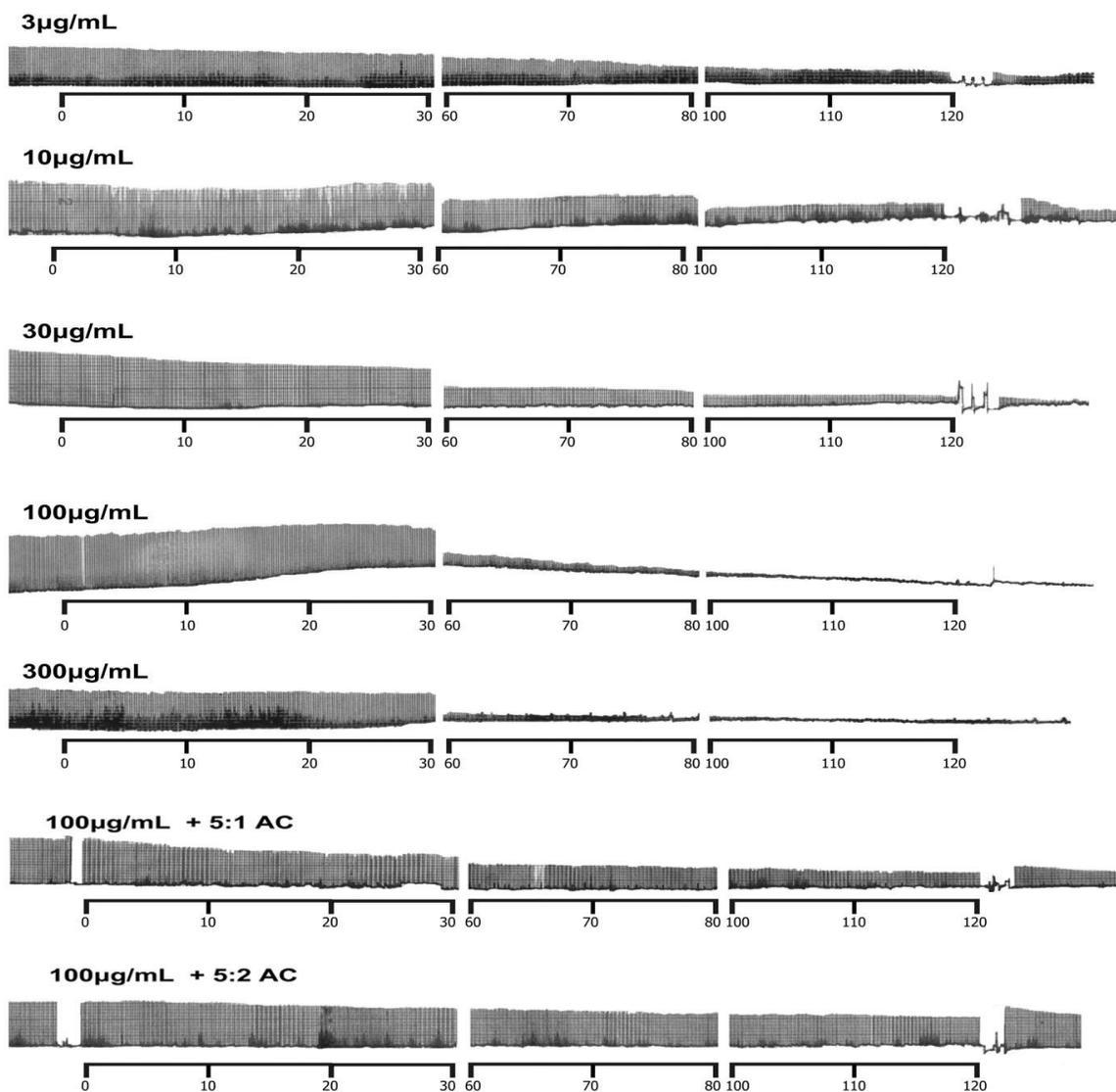


Fig. 11. Figura representativa dos registros miográficos da resposta contrátil após a adição do veneno de *B. fonsecai* (3, 10, 30, 100 e 300 µg/mL) e pré-incubação com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2. Note que o bloqueio neuromuscular em todas as concentrações e na pré-incubação foi irreversível após lavagem. Observe que a contratura apresentada com o uso de 100 µg/mL foi inibida pelo uso de antiveneno comercial. AC: Antiveneno Comercial.

4.3.2 Atividade miotóxica

Miotoxicidade “*in vitro*”

Através da análise histológica qualitativa observou-se o dano muscular causado pelo veneno de *B. fonsecai*. Os músculos submetidos a 3µg/mL de veneno apresentaram a maior parte das células musculares normais com apenas algumas fibras edemaciadas. Já os músculos tratados com 10µg/mL apresentaram os feixes musculares mais espaçados, presença de células edemaciadas, células do tipo delta e células “ghost”, porém estas alterações foram mais evidentes em músculos tratados com 30µg/mL.

As preparações tratadas com 100 e 300µg/mL apresentaram em sua maioria, hipercontração das miofibrilas e células ghost. Nestas concentrações os feixes musculares já não puderam ser identificados (Fig 12).

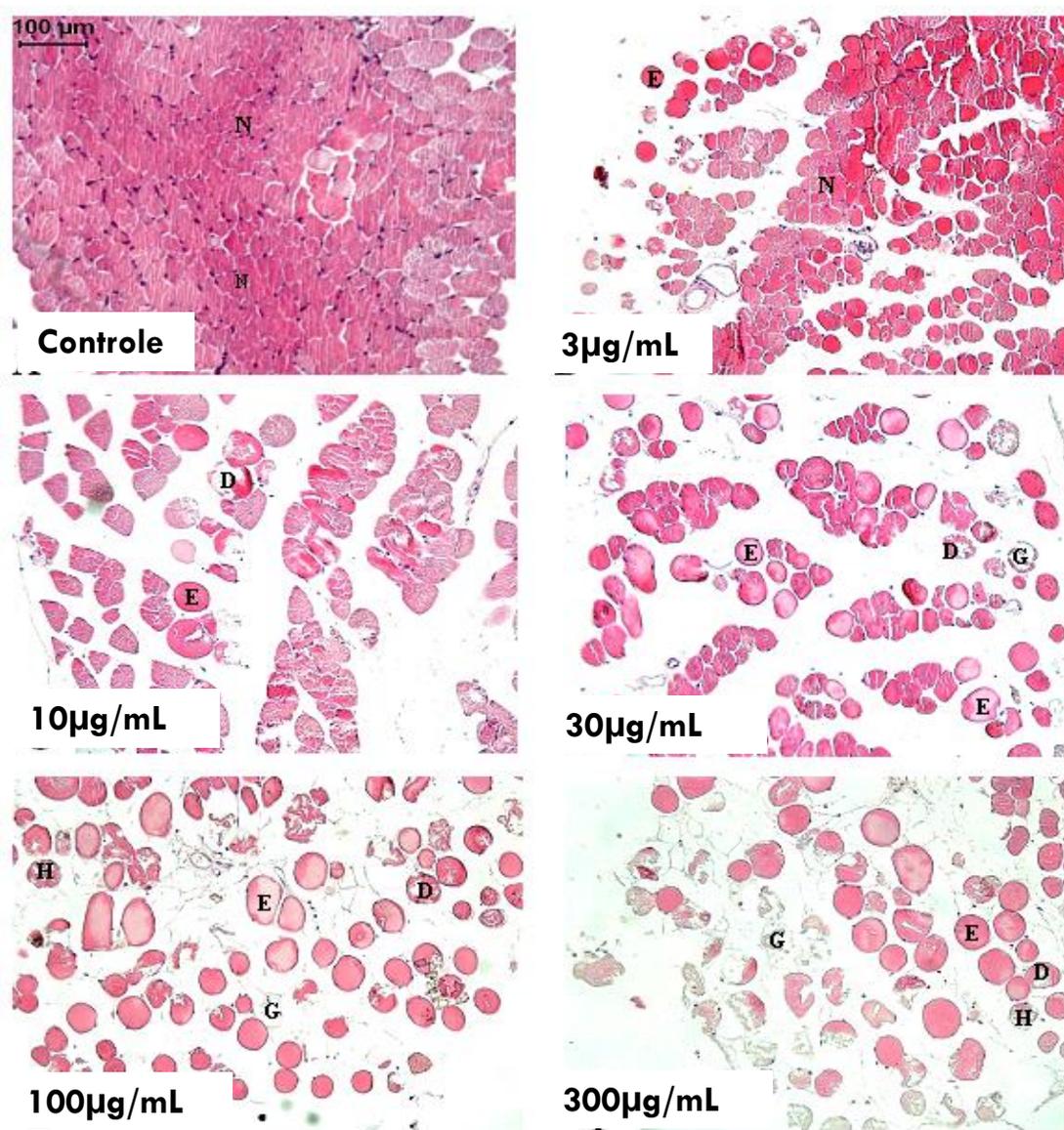


Fig. 12. Morfologia do músculo extensor longo dos dígitos de camundongo em corte transversal. Os músculos foram incubados com Solução nutritiva de Tyrode (controle); 3, 10, 30, 100 e 300µg/mL de *B. fonsecai*. N: Células normais; E: células edemaciadas; D: células delta; G: células ghost. Barra = 100 µm.

A pré-incubação de veneno de *B. fonsecai* (100µg/mL) com antiveneno comercial nas proporções 5:1 e 5:2 diminuíram visivelmente a quantidade de fibras lesadas, sendo essa proteção mais eficaz ao se utilizar a maior proporção, 5:2 (Fig 13).

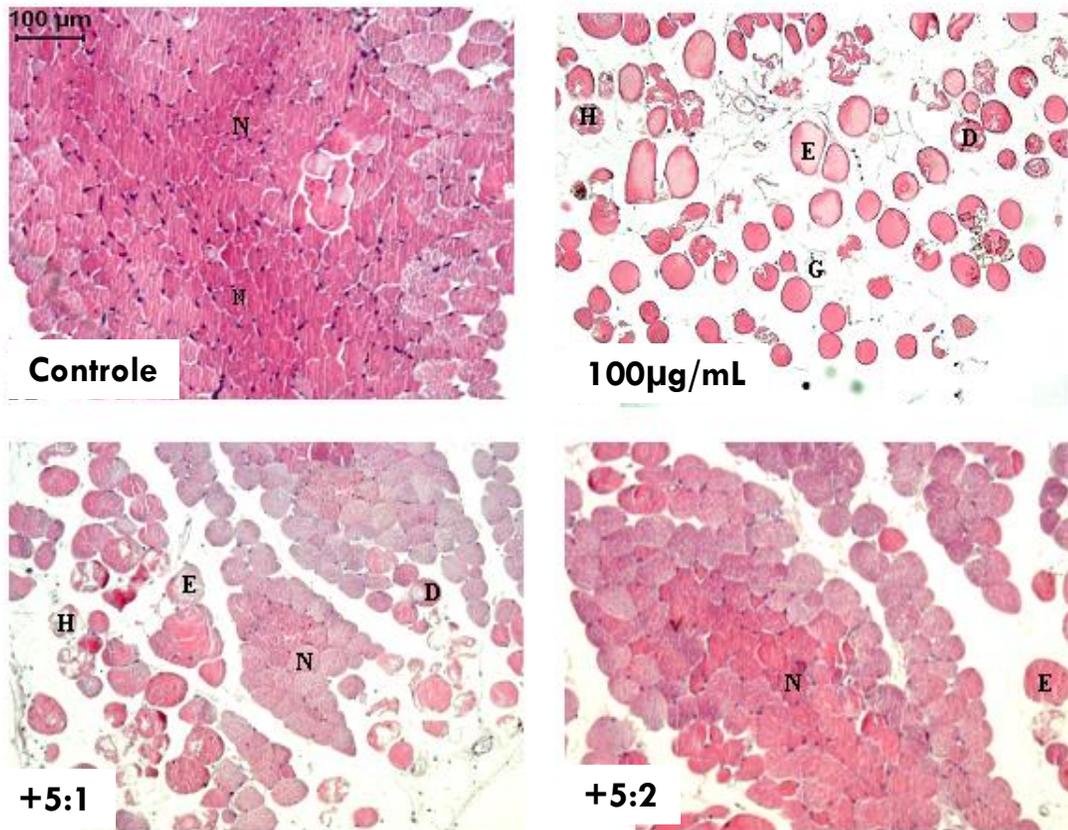


Fig. 13. Morfologia do músculo extensor longo dos dígitos de camundongo em corte transversal. Os músculos foram incubados com 100µg/mL sozinho ou pré-incubados com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 respectivamente. C: Células normais; E: células edemaciadas; D: células delta; H: células hipercontraídas; G: células ghost. Barra = 100 µm.

A análise quantitativa da miotoxicidade foi realizada através da quantificação da atividade da creatinoquinase presente no banho. Ela demonstrou que o veneno possui uma miotoxicidade tempo-dependente, sendo *in vitro* significativamente diferente a partir de 30 minutos de incubação do músculo com o veneno bruto. Essa atividade foi completamente neutralizada pelo antiveneno botrópico comercial em ambas as proporções (Fig 14).

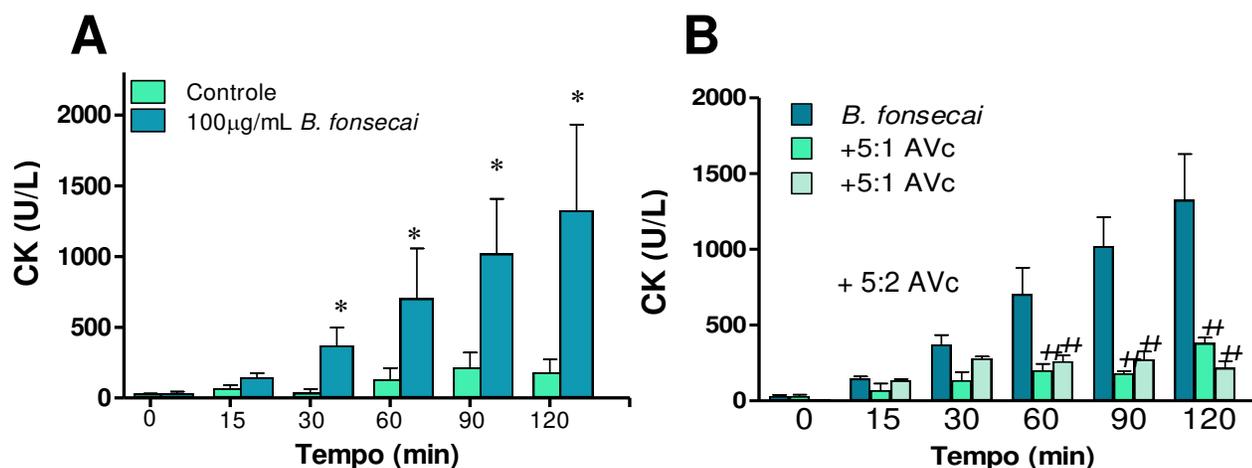


Fig. 14. Análise da atividade da CK *in vitro*. A) Atividade da CK das preparações EDL mantidas em Tyrode (controle) comparada com a atividade das preparações tratadas com o veneno de *Bothrops fonsecai* (100µg/mL). B) A pré-incubação de *B. fonsecai* (100µg/mL) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2 reduziram significativamente a atividade da CK quando comparada ao veneno sozinho. Cada barra representa a média \pm DP de 5-7 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com controle Tyrode. ## $p < 0,05$ comparado com o veneno sozinho. AC: antiveneno botrópico comercial.

Miotoxicidade “in vivo”

A análise histopatológica qualitativa da miotoxicidade *in vivo* demonstrou que o veneno bruto de *B. fonsecai* causou uma miotoxicidade tempo-dependente. Ao ser pré-incubado com o veneno bruto por 3 horas, o músculo gastrocnêmio apresentou alguns miócitos lesionados assim como hemorragia e infiltrado inflamatório nas áreas do endomísio e perimísio. Essa miotoxicidade, hemorragia e processo inflamatório foram maiores conforme aumentou-se o tempo de contato do veneno com o músculo (Fig 15).

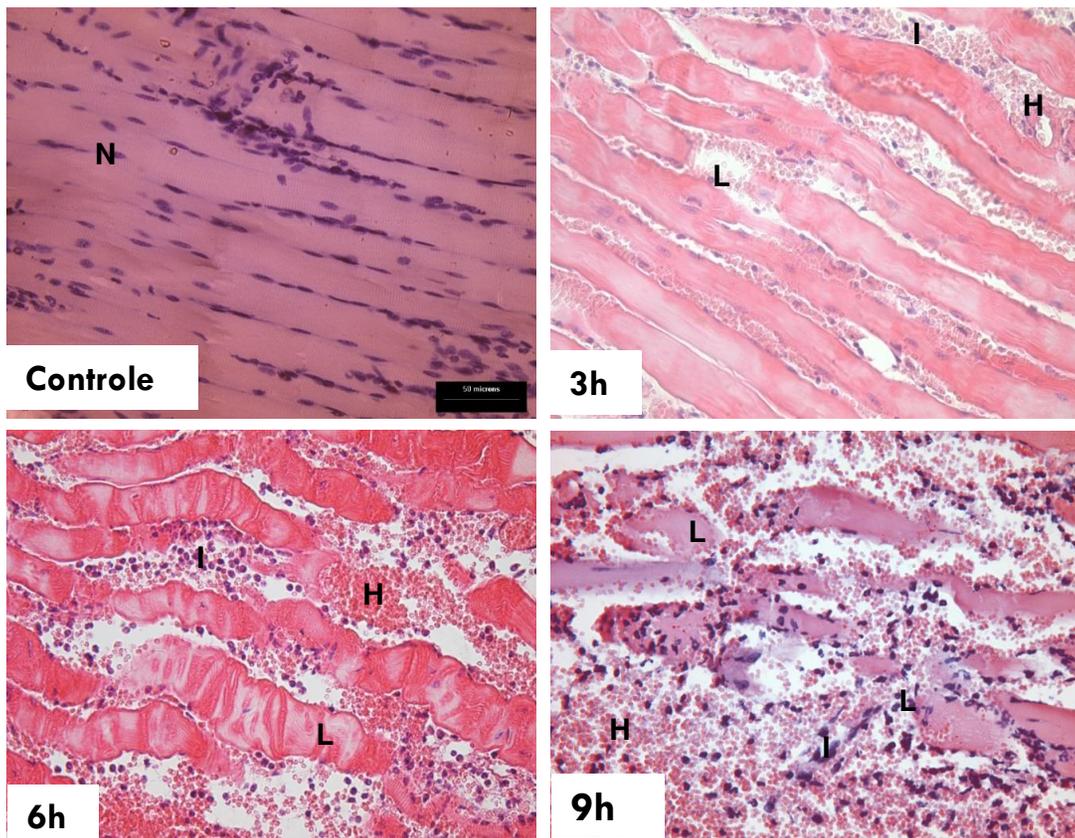


Fig. 15. Morfologia do músculo gastrocnêmio de camundongo em corte longitudinal. Os músculos foram isolados 3, 6 e 9 horas após injeção do veneno de *B. fonsecai* (30µg/mL). Note o aumento na presença de lesões nos miócitos, assim como infiltrado inflamatório e hemorragias na área do nas áreas de endomísio e perimísio de forma concentração-dependente. N: células normais; L: células lesionadas; H: Hemorragia; I: Infiltrado inflamatório. Barra = 50 µm.

Quando pré-incubado com antiveneno botrópico comercial, a miotoxicidade e a hemorragia causadas pelo veneno de *B. fonsecai* foram neutralizadas, porém o antiveneno botrópico não neutralizou a presença de infiltrado inflamatório em nenhuma das proporções testadas (Fig 16).

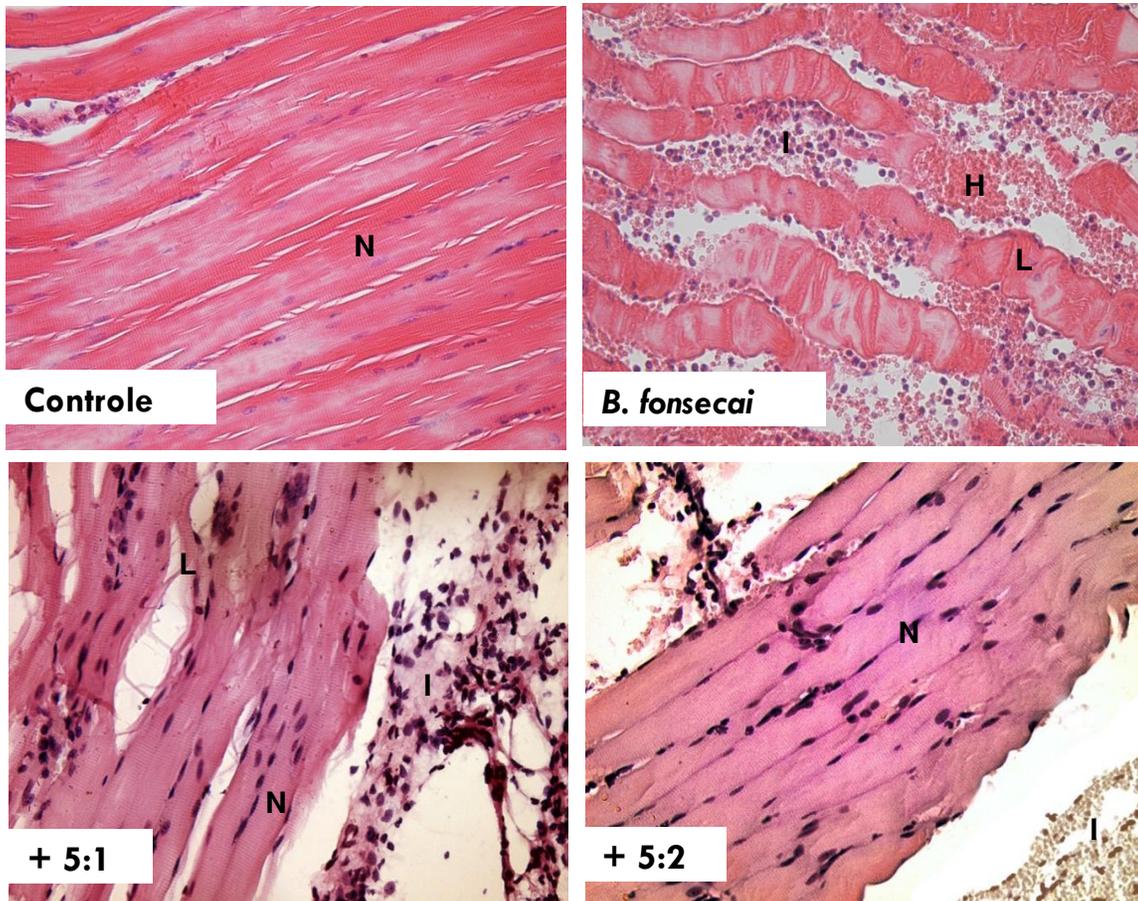


Fig. 16. Morfologia do músculo gastrocnêmio de camundongo em corte longitudinal. Os músculos foram isolados 6 horas após injeção do controle antiveneno, o veneno bruto de *B. fonsecai* (30µg) sozinho ou pré-incubado com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2. Observa-se a redução das lesões musculares e hemorragia, porém ainda é observada a presença de infiltrado inflamatório. N: células normais; L: células lesionadas; H: Hemorragia; I: Infiltrado inflamatório.

A quantificação da atividade da creatinoquinase plasmática demonstrou causar miototoxicidade de forma tempo-dependente, sendo essa significativamente diferente do controle em todos os tempos avaliados. O pico de atividade da creatinoquinase demonstrou ser 6 horas após injeção. Essa atividade foi neutralizada pelo antiveneno botrópico comercial em ambas as proporções (Fig 17).

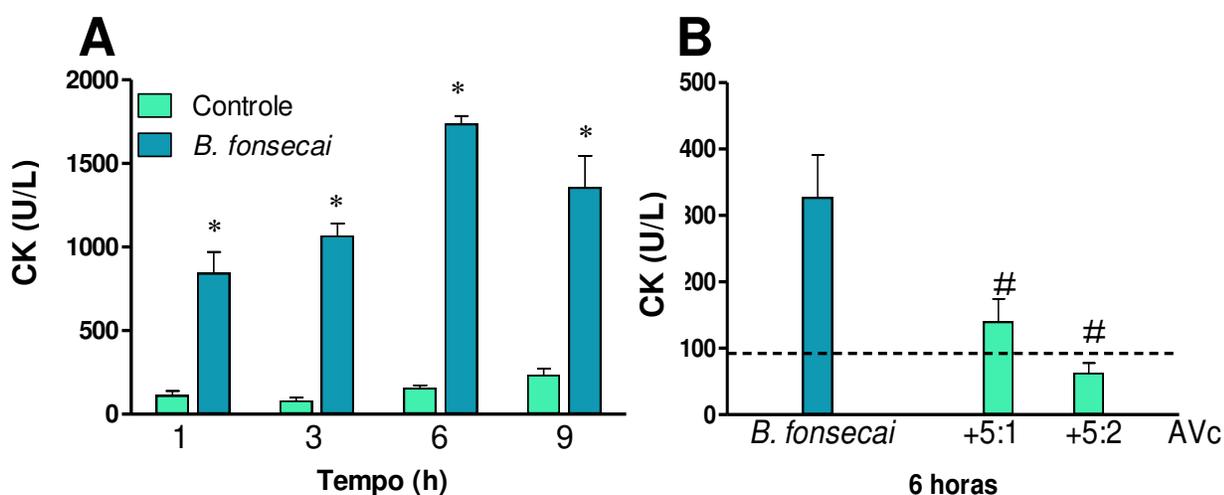


Fig 17. Análise da atividade da CK plasmática. A) Camundongos que tiveram solução salina injetadas em seus respectivos músculos gastrocnêmios comparada com aqueles que receberam *B. fonsecai* (30µg/mL). Note que a pré-incubação do veneno com antiveneno botrópico comercial reduziu significativamente a atividade de CK após 6 horas de injeção do veneno (B). Cada barra representa a média ± DP de 5 experimentos. *p<0,05 comparado com controle salina. #p<0,05 comparado com o veneno sozinho. AVc: antiveneno botrópico comercial.

4.3.3 Atividade hemorrágica

O veneno de *B. fonsecai* causou uma atividade hemorrágica concentração-dependente, sendo essa significativamente diferente do controle a partir da concentração de 10 μ g. Essa atividade foi completamente inibida pelo antiveneno botrópico comercial em ambas as proporções testadas (5:1 e 5:2) (Fig18).

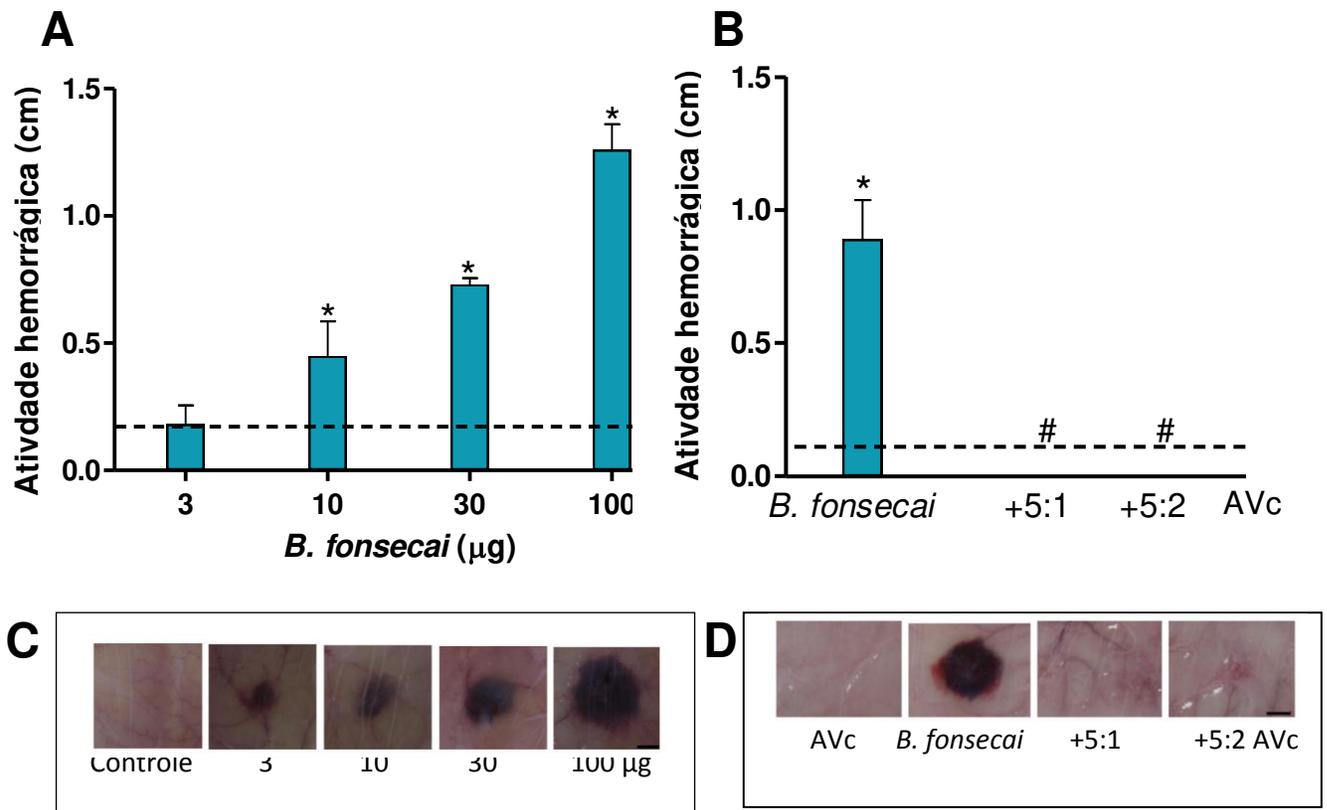


Fig. 18. Atividade hemorrágica do veneno de *B. fonsecai* na pele dorsal de ratos. A) Curva concentração-resposta; B) Neutralização dessa atividade pela pré-incubação (30 min a 37 °C) do veneno (30 μ g) com antiveneno botrópico comercial nas proporções 5:1 e 5:2; C e D) Figuras representativas dos halos hemorrágicos. As colunas representam a média \pm EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com controle negativo (----; solução salina). # $p < 0,05$ comparado com controle positivo (veneno). Barra: 0,3 cm. AVc: Antiveneno botrópico comercial.

4.3.4 Atividade edematogênica

O veneno de *B. fonsecai* causou extravasamento de plasma em pele dorsal de ratos de forma concentração-dependente a partir da injeção de 0,3µg (Fig 19A). Este extravasamento foi neutralizado pela pré-incubação do veneno com antiveneno botrópico comercial significativamente diferente do veneno sozinho em ambas as proporções testadas (5:1 e 5:2), porém apenas as amostras cujas quais são pré-incubadas com o antiveneno na proporção 5:2 não são significativamente diferente do controle negativo (Fig 19B).

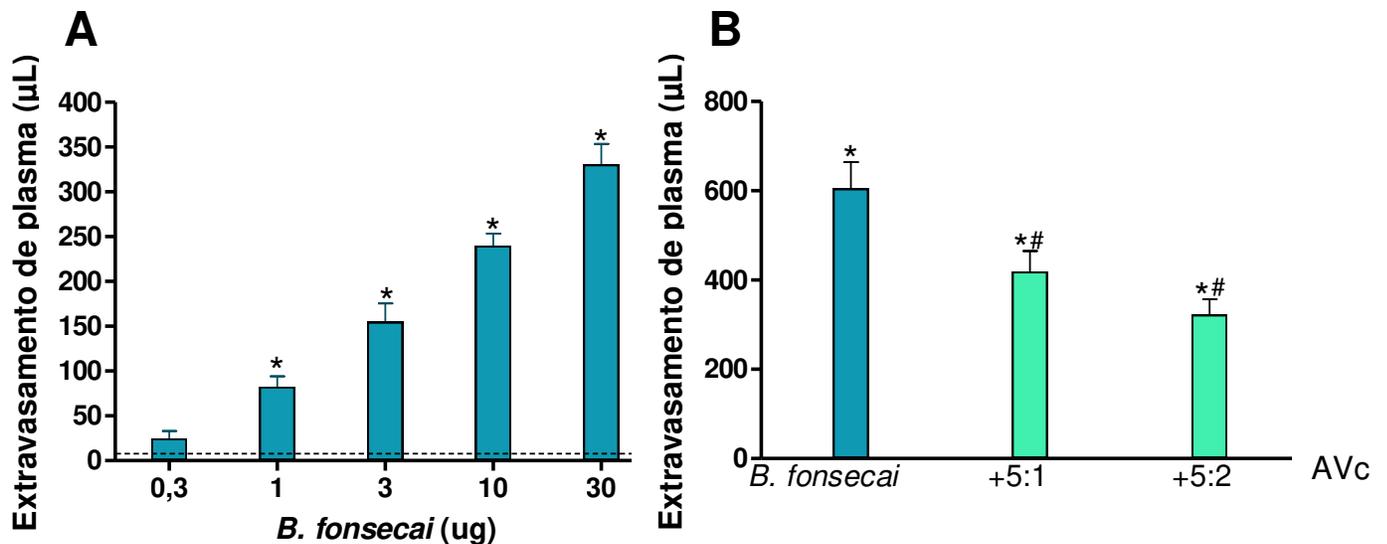


Fig. 19. Atividade edematogênica do veneno de *B. fonsecai* na pele dorsal de ratos (A) e sua neutralização pelo antiveneno botrópico comercial após pré-incubação (30 min a 37°C) nas proporções 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno) (B). As colunas representam a média ± EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com controle negativo (----; solução salina). # $p < 0,05$ comparado com controle positivo (veneno de *B. fonsecai*). AVc: Antiveneno botrópico comercial.

4.3.5 Atividade coagulante

B. fonsecai demonstrou ter atividade coagulante concentração-dependente, havendo coagulação, sendo significativamente diferente do controle negativo em todas as doses testadas (Fig 20A). O veneno chegou a sua máxima atividade a partir de 30 μ g (dados não mostrados). Embora significativamente diferente do veneno sozinho, a pré-incubação do veneno com antiveneno botrópico comercial levou a neutralização parcial da atividade coagulante na proporção 5:1. Já na proporção 5:2 essa neutralização foi completa (Fig 20B).

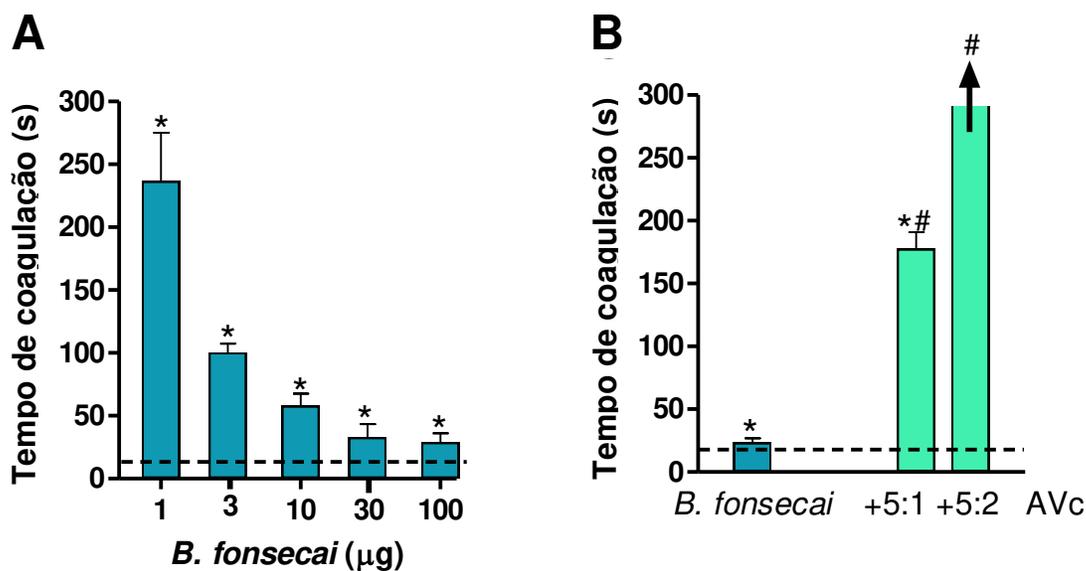


Fig. 20. Atividade coagulante do veneno de *B. fonsecai* (A) e sua neutralização pelo antiveneno botrópico comercial após pré-incubação (30 min a 37°C) nas proporções 5:1 e 5:2 (veneno:antiveneno) (B). As colunas representam a média \pm EPM de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com controle negativo (----; solução salina). # $p < 0,05$ comparado com controle positivo (veneno de *B. fonsecai*). AVc: Antiveneno botrópico comercial.

4.4 Análise das ligações veneno:antiveneno

4.4.1 Avaliação por SE-HPLC

A análise das ligações entre veneno e antiveneno foram realizadas utilizando cromatografia líquida de alta performance e uma coluna de exclusão molecular. A partir dessa análise foi possível avaliar a afinidade e reatividade máxima do veneno:antiveneno de *Bothrops fonsecai* e o antiveneno botrópico comercial ao ser comparado com o antiveneno específico para *B. fonsecai*.

O perfil cromatográfico foi dividido em três regiões e em cada região a área sob a curva dos perfis nulos forma comparadas às áreas sob a curva das reações. A curva dose-resposta da reação foi realizada com diferentes proporções de veneno:antiveneno (1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:12, 1:16, 1:32 e 1:64), já os perfis “nulos” destas proporções foram matematicamente calculados.

Durante a pré-incubação, o veneno e antivenenos reativos formaram complexos de alto peso molecular que foram primeiramente eluídos durante a corrida cromatográfica como representado na Fig. 21.

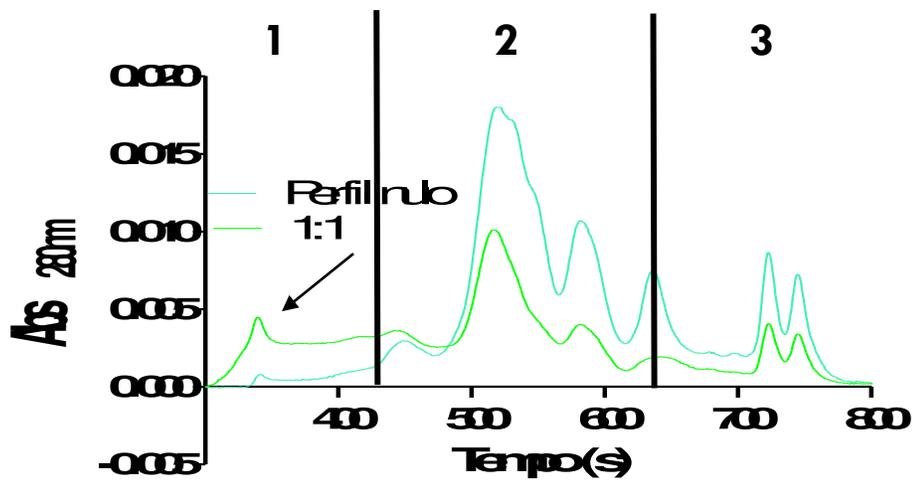


Fig. 21. Perfil de eluição das corridas controle (perfil nulo) e reação (na proporção 1:1). Todos os perfis foram divididos em três regiões (...) para análise das alterações da área sob a curva das mesmas. Note um aumento da área sob a curva da reação na região 1 (de alto peso molecular) indicando a formação de complexos (→).

Tanto as corridas cujo veneno de *B. fonsecai* foi pré-incubado com antiveneno botrópico comercial (AVc) como aquelas onde foi pré-incubado com antiveneno específico para *B. fonsecai* (AVe) apresentaram alteração na região 1 indicando formação de complexos, porém ao comparar ambas curvas dose-resposta, observa-se que AVe tem uma alteração máxima obtida com menores concentrações de veneno do que com AVc (Fig. 21 A,B).

Já na segunda região, como esperado, houve uma redução na área sob a curva das reações quando comparadas aos perfis nulos, uma vez que as substâncias ali antes presentes reagiram e formaram complexos de alto peso molecular. Essa redução demonstrou ser proporcional à concentração de veneno (Fig. 21 C,D).

As substâncias de baixíssimo peso molecular, que se encontram na região 3, demonstraram baixa reatividade (Fig. 21 E,F).

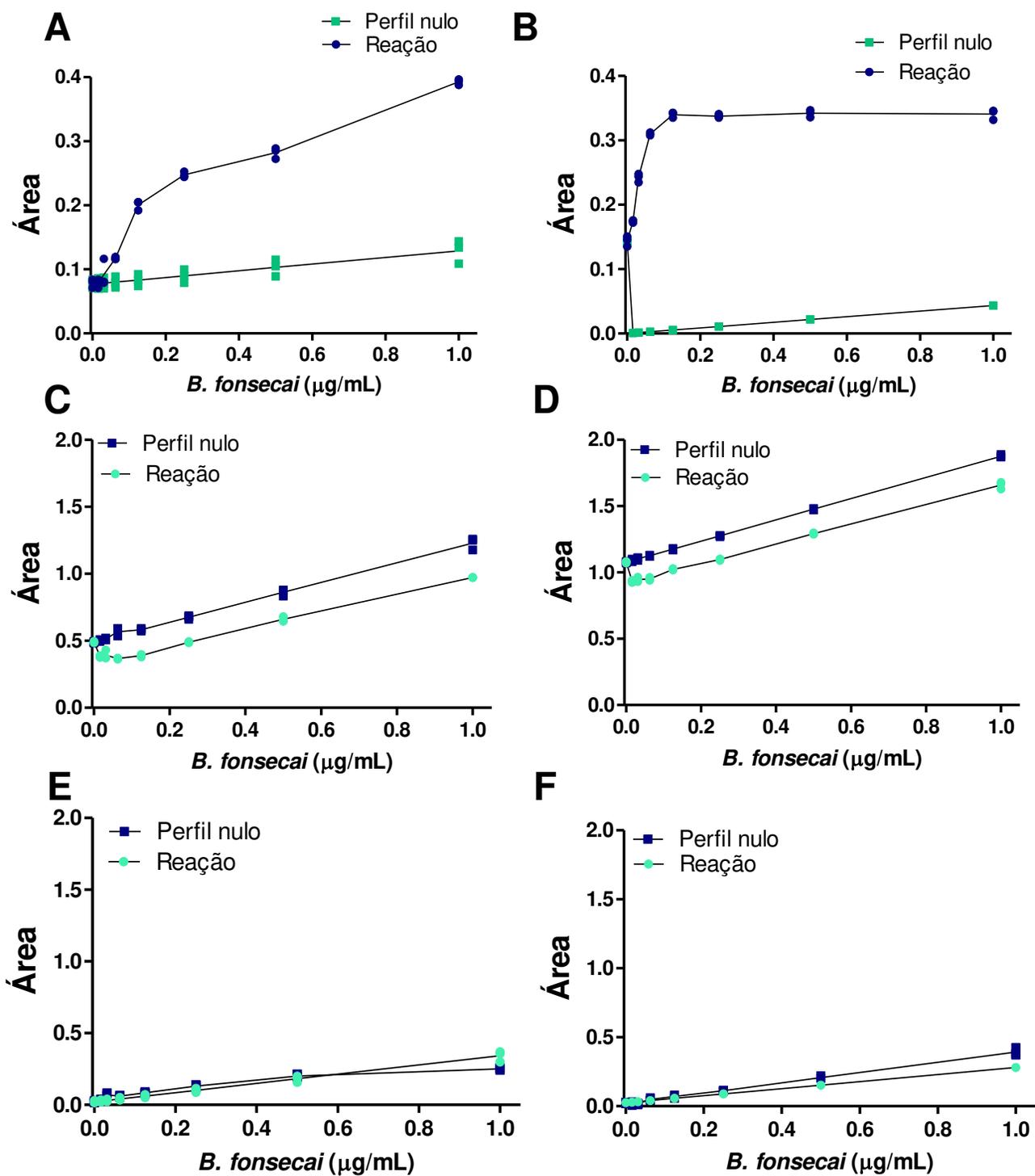


Fig 22. Análise das ligações entre veneno e antiveneno por SE-HPLC. Os perfis de eluição das amostras de *B. fonsecai* pré-incubado com AC (A,C,E,G) e AE (B,D,F,H) foram divididos em 3 regiões:

A,B) Região 1, onde predominantemente encontram-se os complexos veneno:antiveneno; C,D) Região 2, onde localizam-se os antivenenos e substâncias reativas; E,F) Região 3, região de componentes com baixo peso molecular.

A avaliação das ligações através das funções de dose-reposta demonstrou que o antiveneno comercial (AVc) possui um Max_H maior que o antiveneno específico (AVe) demonstrando que AVc é mais reativo do que AVe. Por outro lado, AVe apresentou um menor EC_{50} , ou seja, possui afinidade várias vezes maior ao veneno de *B. fonsecai* (Tabela 1).

Tabela 1. Análise quantitativa das ligações entre veneno e antivenenos através do Max_H e EC_{50} da Região 2. Note que AVc apresenta maior Max_H (Ligação máxima entre veneno e antiveneno) demonstrando uma maior reatividade que AVe, porém AVe, como já era esperado, apresenta maior afinidade para com *B. fonsecai* conforme observado pela EC_{50} (valor onde aproximadamente 50% do antiveneno reativo se encontra ligado). AVc: Antiveneno botrópico comercial. AVe: Antiveneno específico.

	Δ Área/ antiveneno			
	Max_H		EC_{50}	
	Média	DP	Média	DP
<i>B. fonsecai</i> + AVc	0.241	0.017	0.020	0.007
<i>B. fonsecai</i> + AVe	0.182	0.006	0.003	0.001

4.4.2 Avaliação por Immunoblotting

As ligações entre veneno e antiveneno também foram analisadas qualitativamente através da técnica de immunoblotting onde as bandas marcadas indicam reatividade entre o antiveneno comercial e o veneno.

O antiveneno comercial apresentou alta reatividade ao veneno de *B. jararaca* quando comparado ao veneno de *B. fonsecai* nas mesmas concentrações. Isso pode ser observado pela presença de bandas mais marcadas em *B. jararaca*.

O antiveneno botrópico comercial mostrou-se pouco reativo a substâncias com encontradas no veneno de *B. fonsecai* peso molecular abaixo de 30kDa opondo-se à sua reatividade com substâncias na mesma faixa de peso encontradas no veneno de *B. jararaca*. Substâncias entre 30 e 60 kDa foram reativas ao antiveneno comercial em ambos venenos botrópicos. Em relação às substâncias de alto peso molecular (acima dos 66kDa), o antiveneno foi pouco reativo com o veneno de *B. fonsecai* quando comparado a sua reatividade ao veneno de *B. jararaca* (Fig. 23).

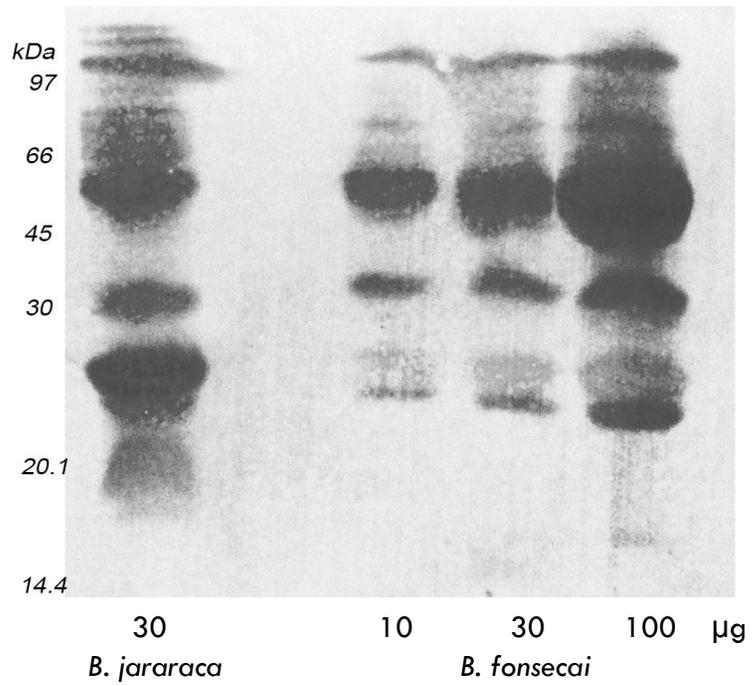


Fig. 23. Immunoblotting dos venenos brutos de *B. jararaca* e *B. fonsecai*. Immunoblotting das proteínas dos venenos de *B. jararaca* e *B. fonsecai* utilizando antiveneno comercial como anticorpo primário.

4.5 Comparação das atividades de *Bothrops jararaca* e *Bothrops fonsecai*

A partir dos resultados obtidos por Da Silva *et al.* (2012), foi realizada a avaliação comparativa das atividades causadas pelo veneno de *Bothrops fonsecai* observadas nesse trabalho com as obtidas pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

O veneno bruto de *Bothrops fonsecai* apresentou as atividades fosfolipásica, miotóxica (avaliada pela atividade da creatinoquinase), edematogênica, coagulante e bloqueadora da junção neuromuscular mais intensas que as observadas com o veneno bruto de *Bothrops jararaca*. Por outro lado, *Bothrops jararaca* apresentou atividade proteolítica, esterásica e hemorrágica mais potentes.

Tabela 2. Atividades biológicas causadas pelo veneno de *Bothrops fonsecai* quando comparadas ao veneno de *Bothrops jararaca*. Atividade neuromuscular realizada com 100µg/mL de veneno; atividades miotóxica, edematogênica, coagulante e esterásica foram realizadas utilizando 30µg de veneno; para a atividade proteolítica em caseína utilizou-se 100µg de veneno. MHD, dose mínima hemorrágica, é a dose que causa um halo de 1cm de hemorragia. U: unidade.

		<i>Bothrops fonsecai</i>	<i>Bothrops jararaca</i>
Atividade	fosfolipásica (U)	103,3 ± 2	92,6 ± 3
	proteolítica (U)	2,5 ± 0,4	15,3 ± 0,5
	esterásica (U)	1,4 ± 0,5	6,2 ± 0,7
	Hemorrágica (MHD)	69,2	5,8
	edematogênica (µL)	330 ± 23	150 ± 56
	coagulante (s)	33 ± 10	42 ± 12
	Miotóxica <i>in vivo</i> (U/L)	1736,8 ± 93,7	981,1 ± 279,6
Bloqueio neuromuscular aos 120min	Total	Parcial	

V. DISCUSSÃO

Trabalhos prévios mostram que o veneno bruto de *B. fonsecai* contém uma grande variedade de classes de componentes que também são encontrados nos venenos de outras serpentes do gênero *Bothrops*, com uma predominância de metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs), serinoproteases e fosfolipases PLA₂ (Tashima et al., 2008). Neste trabalho, observou-se que o veneno bruto de *B. fonsecai* apresenta atividades proteolítica, esterásica e fosfolipásica. A atividade fosfolipásica foi significativamente maior do que a apresentada pelo veneno bruto de *C. d. terrificus* utilizado como controle positivo. Esses achados contrastam com aqueles reportados por Pidde-Queiroz et al. (2008) que indica que a atividade fosfolipásica do veneno de *B. fonsecai* era menor do que o apresentado por *C. d. terrificus*. Essa variação na atividade ocorre provavelmente devido a uma variedade de fatores como idade e sexo do animal cujo veneno foi coletado, distribuição geográfica e método utilizado para quantificação.

Diferente da atividade fosfolipásica, o veneno de *B. fonsecai* não apresentou uma potente atividade proteolítica, onde se necessita de doses altas de veneno para que esta seja aparente. Uma vez que o veneno de *B. fonsecai* contém grande quantidade de SVMPs das classes P-I e P-III ~~class-SVMPs~~ (~47% das proteínas do veneno) (Tashima et al., 2008) e a atividade hemorrágica em pele dorsal de ratos em doses ≤ 30 μ g, a atividade proteolítica pode vir a estar subestimada. Mais ensaios devem ser realizados a fim de quantificar de forma plena essa atividade.

A atividade proteolítica *in vivo* foi provavelmente a maior contribuidora para a hemorragia observada em pele dorsal de ratos, uma vez que as SVMPs são conhecidas por exercerem uma variedade de efeitos na microvasculatura (Gutiérrez et al., 2005; Escalante et al., 2011).

A atividade coagulante do veneno de *B. fonsecai* em plasma pobre em plaquetas concorda com os resultados anteriormente reportados sobre a presença de enzimas tipo-trombina neste veneno (Nahas et al., 1979). A presença desta atividade indica que, como em outros venenos botrópicos, os envenenamentos

sistêmicos podem vir a resultar em coagulopatias (França e Málaque, 2003). Esta atividade é prioritariamente mediada por serinoproteases que equivalem a 2,4% das proteínas do veneno de *B. fonsecai*; a coagulopatia causada por essas enzimas pode ser exacerbada pelas lectinas do tipo-C presentes nesse veneno (~10% das proteínas do veneno) (Tashima et al., 2008) e isso pode responder o motivo pelo qual esse veneno possui atividade esterásica menos potente que *B. jararaca* (Da Silva et al., 2012), porém leva a coagulação do plasma em menor tempo.

Injeções intradérmicas do veneno causaram um extravasamento de plasma dose-dependente e esses achados estão de acordo com a atividade ocasionada pelo veneno de outras espécies do gênero *Bothrops* (Teixeira et al., 2009) que induziram um aumento na permeabilidade vascular mediada por PLA₂ (Teixeira et al., 2003) e SVMs (Teixeira et al., 2005; Da Silva et al., 2012), contribuindo com os efeitos locais observados durante os envenenamentos.

Bothrops fonsecai causou um bloqueio neuromuscular em preparações EDL, achado este que concorda com estudos prévios que demonstraram que venenos botrópicos podem interferir com a neurotransmissão em preparações neuromusculares de vertebrados *in vitro* (Cogo et al., 1993; Costa, et al., 1999; Oshima-Franco et al., 2000; Zamunér et al., 2004; Durigon et al., 2005; Borja-Oliveira et al., 2007), entretanto este veneno, assim como das demais serpentes do gênero, não causou um potente bloqueio, sendo que o bloqueio total da contração muscular foi observado apenas em altas concentrações. As PLA₂ tem sido ligadas ao bloqueio neuromuscular causada por venenos de *Bothrops* sp. (Gallacci e Cavalcante, 2010) e pode também contribuir com os efeitos descritos aqui, uma vez que estas enzimas correspondem a aproximadamente 30% das proteínas do veneno de *B. fonsecai* (Tashima et al., 2008). A atividade PLA₂ do veneno provavelmente também deve ser a maior contribuidora para a miotoxicidade (Gutiérrez e Ownby, 2003) observada nos ensaios *in vivo* e *in vitro*.

O antiveneno botrópico comercial, produzido através de hiperimunização de cavalos utilizando um *pool* de serpentes botrópicas (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*), é indicado para tratamento de acidentes causadas por serpentes do gênero *Bothrops* sp. devido a reatividade-cruzada entre estes venenos e aqueles utilizados no *pool* de imunização (Ferreira et al., 1992). Como demonstrado neste trabalho, o antiveneno botrópico comercial reagiu com o veneno em todas as atividades biológicas testadas, porém com potências diferentes.

Na proporção veneno:antiveneno indicada pelo fabricante (5:1), o antiveneno comercial foi capaz de neutralizar 25,4% o bloqueio neuromuscular causado pelo veneno de *B. fonsecai* e, o dobro desta proporção (5:2) protegeu 62,5%. Esta ineficácia na neutralização do bloqueio neuromuscular também foi observada por Moraes (2011) que demonstrou que a utilização do antiveneno na proporção 5:1 não foi capaz de neutralizar o bloqueio neuromuscular causado por *Bothrops alcatraz*, atingindo neutralização parcial ao aumentar a proporção para 5:3. O antiveneno botrópico comercial também foi incapaz de inibir totalmente o bloqueio neuromuscular causado por *Bothrops jararaca* (65% de proteção), *Bothrops erythromelas* (40% de proteção), *Bothrops jararacussu* (35% de proteção) e *Bothrops neuwiedi* (2,5% de proteção), na proporção 5:1 (Zamunér et al., 2004).

O veneno de *B. fonsecai* apresentou alta atividade fosfolipásica, provavelmente a maior responsável pelas atividades bloqueadora da junção neuromuscular e miotóxica, além de ser uma das mediadoras da atividade edematogênica. A inibição parcial da atividade fosfolipásica pelo antiveneno botrópico comercial em ambas as proporções testadas, porém significativamente diferente do veneno sozinho apenas na proporção 5:2, pode explicar a neutralização parcial dos efeitos na junção neuromuscular. Por outro lado, a atividade miotóxica observada pela análise histológica e determinação da atividade da CK foi completamente inibida, demonstrando que as PLA₂ catalíticas podem não ser as principais responsáveis por esta atividade.

As atividades hemorrágicas local e sistêmica em acidentes ofídicos ocorrem principalmente devido as ações das metaloproteases, que causam ruptura do sistema hemostático, induzindo a proteólise dos microvasos da lâmina basal pela degradação da maioria das proteínas da matriz extracelular (Baramova et al., 1989). O veneno de *B. fonsecai* causou hemorragia concentração-dependente, produzindo halos com tamanho médio de 1,2 cm com 100µg, enquanto o veneno de *B. jararaca* produziu halos hemorrágicos de 1,2 cm com 40µg de veneno (Da-Silva et al., 2012) e a *B. jararacussu* produziu halos de aproximadamente 0,8 cm com 100µg (dados não publicados). O antiveneno comercial neutralizou completamente a atividade hemorrágica em todas as proporções testadas. Isto pode ser explicado pelo fato dos fatores envolvidos em hemorragias dividirem propriedades antigênicas mesmo em serpentes de diferentes gêneros e diferentes regiões geográficas (Mebs et al., 1988; Mandelbaum et al., 1989).

O extravasamento de plasma causado pelo veneno de *B. fonsecai* causou um extravasamento de plasma (330µL com 30µg de veneno) mais potente que o causado pelo veneno bruto de *B. jararaca* (150µL com 30µg) (Da-Silva et al., 2012). Esta atividade, porém, foi parcialmente inibida pelo antiveneno botrópico comercial nas duas proporções testadas.

O veneno de *B. fonsecai* apresentou um tempo de coagulação potente quando comparado a *B. jararaca* (Da Silva et al., 2012). Esta atividade foi inibida pelo antiveneno comercial apenas das proporções 5:2. Sabe-se que alterações na coagulação são causadas principalmente por serinoproteases presentes nos venenos de serpentes. Neste trabalho, tanto a atividade esterásica quanto a atividade coagulante foram inibidas pelo antiveneno botrópico comercial, em menor grau na proporção 5:1 que a obtida em 5:2.

A neutralização dos efeitos do veneno de espécies não presentes no *pool* utilizado na produção do antiveneno é explicada pela reatividade antigênica cruzada, uma vez que venenos de espécies semelhantes se relacionam estruturalmente ou

farmacologicamente, permitindo neutralização por antivenenos não específicos (Ménez, 1985). Esta reatividade cruzada também pode ser observada na análise das ligações entre veneno e antiveneno ao se utilizar antiveneno específico como padrão para comparação: o antiveneno botrópico comercial, embora tenha apresentado alta reatividade-cruzada, possui afinidade muito baixa com o veneno de *B. fonsecai*. Isto demonstra que o veneno de *B. fonsecai* possui poucas substâncias similares as encontradas nos venenos das serpentes utilizadas para produção do antiveneno, em especial serinoproteases e fosfolipases.

VI. CONCLUSÃO

- O veneno de *B. fonsecai* demonstrou-se positivo a todas as atividades típicas de venenos botrópicos;
- O AVc apresentou reatividade-cruzada em todas atividades testadas;
- O grau de neutralização observado, o uso do dobro da proporção indicada (5:2, veneno:antiveneno) e a interação AVc:veneno comparada à AVe:veneno demonstraram que AVc possui baixa afinidade;
- Todos os resultados obtidos demonstraram que o veneno de *B. fonsecai* é composto por substâncias relativamente diferentes das observadas nas serpentes botrópicas utilizadas para a produção do AVc.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. 2005. **Imunologia Celular e Molecular**. 6^o Edição. Elsevier Science Editorial. 564p.
- AIRD, S.D. 2002. Ophidian envenomation strategies and the role of ourines. **Toxicon**, 40: 335 – 393.
- ALI, S.A.; STOEVA, S.; ABBASE, A.; ALAN, J.M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. 2000. Isolation, structural and a functional characterization of a apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from *Leaf-nosed Viper (Eritocophis macmahoni)* snake venom. **Arch Bioch. And Biophys.**, 384 (2): 216 – 226.
- AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; DA SILVA, O.A.; RIBEIRO, M.M.F.; MAGALHÃES, R.A.; DOS-REIS, R.J.; CARNEIRO, J.G.; CASTRO, J.R.S. 1986. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotalítico. Análise de 63 casos. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 28: 220 – 227.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2010. Farmacopéia Brasileira, volume 2, 5^o Edição. 836p. Brasília: ANVISA.
- ARITA, H.; HANASAKI, K.; NAKAMO, T.; OKA, S.; TERAOKA, H.; MATSUMOTO, K. 1991. Novel proliferative effect of phospholipase A2 in Swiss 3T3 cells via specific binding site. **J. Biol. Chem.**, 266: 139-141
- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. 1989. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.** 275(1): 63 – 71.

- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H.C. (org.). 2012. **Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1.** Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessada em 25/10/2012.
- BJARNASON, J.N.; FOX, J.W. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.** 62: 325 – 372.
- BJARNASON, J.B.; TU, A.T. 1978. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. **Biochemistry.** 17(16): 3395 – 3404.
- BORJA-OLIVEIRA, C.R.; KASSAB, B.H.; SOARES, A.M.; TOYAMA, M.H.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; RE, L.; RODRIGUES-SIMIONI, L. 2007. Purification and N-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂, neuwieditoxin-I and neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) venom. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, 13: 103 - 121.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** 72: 248 - 254.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. 1985. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, 86: 855 - 860.
- BRASIL. 2012. Secretaria da Vigilância em Saúde/MS. **Guia da vigilância epidemiológica.** Caderno 14. 24p. Acesso em: 18 de janeiro de 2012.

Disponível

em:

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **J. Proteomics**, 74: 1781 - 1794.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. 2004. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca: Comstock Publishing Associates.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H. MALAQUE,, C.M.S.; HADDAD, J.V. 2003. **Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapeutica dos acidentes**. Editora Savier, 2003.

CLISSA, P.B.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DA-SILVA, A.M. 2001. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**. 39: 1567-1573.

COSTA, E.P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C.F.; MOURA-DA-SILVA, A.M. 2002. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**. 26: 13-17.

COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M.A., CORRADO, A.P.; RODRIGUES-SIMIONI, L. 1993. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**. 31 (10): 1237 – 1247.

- COSTA, P.D.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A. 1999. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**. 37 (8): 1143 – 1153.
- DA-SILVA, I.R.F.; LORENZETTI, R.; RENNÓ, A.L.; BALDISSERA, L.; ZELANIS, A.; SERRANO, S.M.; HYSLOP, S. 2012. BJ-PI2, A non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. **Biochem. Biophys. Acta**. 1820 (11): 1809 – 1821.
- DENNIS, E.A. 1997. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochem. Sci.**, 22(1): 1-2.
- DE ROODT, A.R.; DOLAB, J.A.; FERNÁNDEZ, T.; SEGRE, L.; HAJOS, S.E. 1998. Cross reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. **Toxicon**, 36: 1025 – 1038.
- DURIGON, A.M.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; DAL BELO, C.A.; OSHIMA-FRANCO, Y.; COGO, J.C.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; RODRIGUES-SIMIONI, L. 2005. Neuromuscular activity of *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom in mouse nerve-muscle preparations. **J. Venom. Anim. Toxins includ. Trop. Dis.** 11 (1): 22 – 33.
- FENWICH, A.M.; GUTBERLET-JR, R.L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South America pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 156: 617 – 640.

- FERREIRA, M.L.; MOURA-DA-SILVA, A.M., MOTA. I. 1992. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon**. 30(12): 1591 – 1602.
- FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. 2003. Acidente botrópico. In: J.L.C. CARDOSO, F.O.S. FRANÇA, F.H. WEN, C.M.S. MÁLAQUE, V. HADDAD JR. (Eds.), *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, Sarvier/FAPESP: São Paulo. pp. 72-86.
- FRANCO, F.L. 2003. **Origem e diversidade das serpentes**. In: *Animais Peçonhentos no Brasil*, JCL ET AL, Sarvier, 33 – 61. São Paulo.
- FRY, M.R.; GHOSH, S.S.; EAST, J.M.; FRNCSON, R.C. 1992. Role of human sperm phospholipase A2 in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A2 activity on membrane perturbations and oocyte penetration. **Biol. Reprod.**, 47: 751-759
- GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W.L. 2010. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. **Toxicon**, 55: 1 - 11.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**. 33 (11): 1405 – 1424.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. 2003. **Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina**. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O., Wen, F.H., Málaque, C.M., Haddad-Jr, V. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Editora Savier.

- GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, 42: 915 - 931.
- GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, 45: 997 - 1011.
- HAMES, B.D. 1990. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In Hames, B.D. and Rickwood, D. eds, **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**, Ed 2. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 1-147.
- HITE, L.A.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. 1994. cDNA sequences for four snakes venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** 38: 182 – 191.
- HOGUE, A.R.; BELLUOMINI, H.E. 1959. Uma nova espécie de *Bothrops* do Brasil (Serpentes). **Mem. Inst. Butantan**, 28 [1957/1958]: 195-206.
- HOGUE, A. R.; BELLUOMINI, H. E., 1960/62. Notas sobre *Bothrops fonsecai* Hoge e Belluomini, *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron et Duméril e *Bothrops cotiara* Gomes. **Mem. Inst. Butantan.** 30: 97 - 102.
- HOLFMANN, H.; BON, C. 1987. Blood coagulation induced by venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. **Biochemistry.** 26: 780 – 787.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. 1979. **Enzymes in snake venom**. In: Lee, C.Y. (Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Springer-Verlag. 112p.

IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** 14 (20): 7034 – 7043.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETS, M.Y. 1999. Bacterial biocatalysis: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu Rev Microbiol**, 53: 315 – 351.

KAISER, I.I.; GUTIÉRREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRDS, S.D.; ODELL, G.V. 1990. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.** 278: 319 – 325.

KINI, R.M. 1997. **Phospholipase A2: a complex multifunctional protein puzzle**. In: Ed. KINI, R.M., Venom Phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism. Wiley, Chichester.. p 1 – 28.

KUMAGAI, I.; TSUMOTO, K. 2001. Antigen-Antibody bindings. Introductory article. Encyclopedia of life sciences. **Nature Publishing Group**. Disponível em: <http://immuneweb.xmu.edu.cn/reading/adative/12.pdf>

KUNITZ, M. 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol.** 29 (1946): 149 – 154.

- LAING, G.D.; CLISSA, P.B.; THEAKSTON, R.D.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; TAYLOR, M.J. 2003. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol**; 33: 3458-3463.
- LU, Q.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J.M.; CLEMENTSON, K.J. 2005. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationship and effects on haemostasis. **Toxicon**, 45: 1089 – 1098.
- MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T.; REICHEK, A.P. 1984. Characterization of two hemorrhagic factor from the venom of *Bothrops neuwied* (jararaca pintada). **Toxicon**; 22: 193 – 206.
- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. 1976. **Some physical and biochemical characteristics of HF2, one hemorrhagic factor in the venom of *Bothrops jararaca***. In: Ohsaka, A., Hayashi, K., Sawai, Y. (Eds.). Animal, Plants and Microbial Toxins, vol 1 Plenum Press, New York.
- MANDELBAUM, F.R.; SERRANO, S.M.T.; SAKURADA, J.K.; RANGEL, H.A.; ASSAKURA, M.T., 1989. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the crotalinae and viperinae subfamilies. **Toxicon**. 27 (2): 169–177.
- MARKLAND, F.S. 1998. Snake venoms and the homostatic system. **Toxicon**. 36: 1749 – 1800
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. 2000. Snake venom proteases affecting homeostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**. 1477: 146 – 156

- MAYER, F.; REICHEL, A.P.; LINKER, A. 1960. Hialuronidase. In: Bouer, P.D.; Lardy, H.; Myrback, K. (Ed.). **The Enzymes**, Vol 4. Academic Press.
- MCDIARMID, R.W.; CAMPBELL, J.A.; TOURÉ, T.A. 1999. **Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographical Reference**, Vol. 1. The Herpetologists' League, Washington, D.C.
- MEBS, D. 1978. **Pharmacology of reptilian venoms**. In: Biology of the Reptilia, vol. 8, p. 437-560. Gans, C., Gans, K.A., Eds, New York, Academic Press.
- MEBS, D.; POHLMANN, S.; VON-TENSPOLDE, W. 1988. Snake venom hemorrhagins: neutralization by commercial antivenoms. **Toxicon**. 26: 453 – 458.
- MENEZ, A. 1985. Molecular immunology of snake toxins. **Pharmacol. Ther.** 30 (1): 91 – 113.
- MORAES, D.S.; ABREU, V.A.; ROSTELATO-FERREIRA, S.; LEITE, G.B.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. 2012. Neuromuscular activity of *Bothrops alcatraz* snake venom in chick biventer cervicis preparations. **Toxicon**. 59 (2): 294 – 299.
- NAHAS, L. KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A.R. 1979. Thrombin,like and factor X-ativator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haem.** 42(2): 314 – 328.
- NAKAJIMA, M.; HANASAKI, K.; UEDA, M.; ARITA, H. 1992. Effect of pancreatic type phospholipase A2 on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites. **FEBS Lett.**, 309: 261 – 264.

- OUCHTERNOLY, O. 1949. Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Path. Microbiol. Scandi.** 26: 507 - 515.
- OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; CINTRA, A.C.; GIGLIO, J.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; RODRIGUES-SIMIONI L. 2000. Neutralizing capacity of commercial bothropic antivenom against *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin-I. **Muscle Nerve.** 23(12): 1832 – 1839.
- PIDDE-QUEIROZ, G.; FURTADO, M.F.; FILGUEIRAS, C.F.; PESSOA, L.A.; SPADAFORA-FERREIRA, M.; VAN-DEN-BERG, C.M.; TAMBOURGI, D.V. 2010. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Molecular Immunology.** 47(16): 2537 – 2544.
- PIDDE-QUEIROZ, G. PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.V.; FURTADO, M.F.D.; TAMBOURGI, D.V. 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon.** 52: 842 – 851.
- PLA, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. 2012. Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. **Toxicon,** 60: 688 – 699.
- PRICE, J.A. 2007. A colorimetric assay for measuring phospholipase A₂ degradation on phosphatidylcholine at physiological pH. **J. Biochem. Biophys. Methods.** 70 (3): 441 – 444.

- RAGE, J.C. 1994. La diversité dês Serpents. In: Bauchot, R. (Ed.). **Les Serpents**. Bordas: Paris, 34 – 45.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. 1995. **Methods in Enzymology** (ed. BARRETT, A.J.) vol 248, part E. Academic Press. San Diego, CA.
- REPTILE DATABASE. 2014. **Species Numbers (as of February 2014)**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 10 de março de 2014.
- RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. 1997. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 30 (6): 475 – 480.
- ROSENFELD, G. 1971. Symptomatology, pathology na treatment of snakes bites in South America. In: BÜCHERL, W. e BUCKLEY, E.E. (Eds). **Venomous animals and their venoms**, New York: Academic Press. P 395 – 362. Vol 2.
- RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C.F.; FERNANDES, C.M.; DIAZ, C.; GUTIERREZ, J.M. 2002. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators. Inflamm.** 11: 121-128.
- RUCAVADO, A.; NUNEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. 1998. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int. J. Exp. Pathol.** 79: 245-254.
- RUSSO, C.C. 2006. **Modelagem de serino-proteases e inibidores com emprego de ferramentas de bioinformática**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto alegre: 66pg.

- SANNY, S.G., PRICE, J.A. 2001. Analysis of antibody-Antigen Interactions in Mixture Containing Reactive and Non-reactive Components Using Size-exclusion High-Performance (Pressure) Liquid Chromatography; **Analytical Biochemistry**, 295: 57 – 65.
- SANNY, C.G. 2002. Antibody-antigen binding study using size-exclusion liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, 768: 75 – 80.
- SANNY, C.G. 2011. In vitro evaluation of total venom-antivenom immune complex formation and binding parameters relevant to antivenom protection against venom toxicity and lethality based on size-exclusion high-performance liquid chromatography. **Toxicon**, 57: 871 – 881.
- SAZIMA I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in Southeastern Brazil. In: Campbell JA, Brodie ED (eds) **Biology of the pitvipers**. Selva Publ,Tyler,Texas, p.199-216, 1992.
- SAZIMA, I.; MANZANI, P.R. 1998. *Bothrops fonsecai* (Fonsecas's Lancehead). Reproduction and size. **Herp. Rev.**, 29 :102 – 103.
- SCHWERT, G.W.; TAKENAKA, Y. 1955. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. **Biochim Biophys Acta.**, 16 (4): 570 - 574.
- STEVENS, F.J. 1989. Size-exclusion high-performance liquid chromatography in analysis of protein and peptide epitopes. **Methods Enzymol.** 178: 107 – 138.

- SUHR, S.M.; KIM, D.S. 1999. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxidase. **J. Biochem.**, 125: 305 – 309.
- TASHIMA, A.K.; SANZ, L.; CAMARGO, A.C.M.; SERRANO, S.M.T.; CALVETE, J.J. 2008. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **J. Proteomic.** 71:473–85
- TEIXEIRA, C.F.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. 2009. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, 54: 67 - 76.
- TEIXEIRA, C.F.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F. 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 100(Suppl 1): 181 - 184.
- TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, 42: 947 - 962.
- THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bull. World. Health. Organ.** 61 (6): 949 – 956.
- TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. 1997. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-aminoacid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol Chem.**, 272: 9539 – 9542.
- TORII, S.; YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J.W.; NAITO, M. TSURUO, T. 2000. Molecular cloning and functional analysis of apoxin

I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor L-amino oxidase activity. **Biochemistry**, 12: 3197 – 9205.

VADAS, P; BROWNING, J; EDELSON, J; PRUZANSKI, W. 1993. Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: the relationship with associated diseases states. **J. Lipid. Mediat.**, 8: 1-30.

ZAMUNÉR, S.R.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. 2004. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**. 44 (3): 259 – 271.

ZENI, A. L. B; BECKER, A; KRUG, M; ALBUQUERQUE, C. A. C. 2007. Histological and biochemical effects induced by sublethal doses of *Bothrops jararacussu* venom in mice. **J. venom. anim. toxins incl. trop. dis**;13 (3): 664 – 676.

ANEXOS



UNICAMP



CEUA/Unicamp

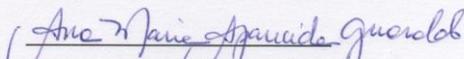
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

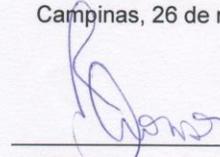
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Estudo dos efeitos biológicos induzidos pela peçonha de *Rinocerothis fonsecai* (*Bothrops fonsecai*) e sua neutralização com antiveneno comercial e antisoro específico (estudo em coelhos, camundongos e ratos)" (protocolo nº 2648-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni / Rita de Cássia de Oliveira Collaço, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 26 de março de 2012.

Campinas, 26 de março de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Aleriso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>