

FERNANDA MIRIANE BRUNI SOLIANI

**AVALIAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DE IMPORTANTES ATIVIDADES
TÓXICAS INDUZIDAS PELOS PRINCIPAIS PEIXES PEÇONHENTOS
BRASILEIROS POR UM SORO POLIESPECÍFICO PRODUZIDO EM
MURINOS**

Dissertação apresentada ao departamento
de Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Imunologia.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dra. Mônica Lopes Ferreira

São Paulo

2008

RESUMO

BRUNI, F.M. **Avaliação da neutralização de importantes atividades tóxicas induzidas pelos principais peixes peçonhentos brasileiros por um soro poliespecífico produzido em murinos**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

No Brasil acidentes por peixes peçonhentos como niquim (*Thalassophryne nattereri*), bagre (*Cathorops spixii*), peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*) e arraia (*Potamotrygon gr orbygnyi*) vêm sendo relatados ao longo de toda costa. O quadro clínico é caracterizado principalmente por efeitos tóxicos locais e sistêmicos. Para esses acidentes não existe até o momento tratamento adequado e comprovadamente eficiente, o que os tornam um problema de ordem médica, econômica e social. A soroterapia é considerada um eficiente tratamento para reverter os efeitos patológicos causados por diversos animais peçonhentos (serpentes, aranhas, escorpião, lagartas) e é o tratamento utilizado para acidentes provocados por peixes do oceano Indo-Pacífico. Desta forma esse trabalho tem como principal objetivo obter um soro poliespecífico através da junção de soros monoespecíficos produzidos em camundongos e avaliar a sua capacidade de neutralização das atividades tóxicas induzidas pelos principais peixes peçonhentos brasileiros. O protocolo de imunização de camundongos padronizado com o uso ou não de adjuvante possibilitou a obtenção de soros monoespecíficos com títulos satisfatórios de anticorpos e com especificidade para os venenos que os geraram e para os venenos de outros peixes. O soro poliespecífico foi obtido pela junção de 1 mg de IgG veneno-específica de cada soro monoespecífico. As atividades induzidas pelos venenos na microcirculação foram totalmente neutralizadas pelo soro tanto na pré-incubação quanto no tratamento imediato. Os danos em fibra muscular induzido pelo veneno de *C. spixii* somente foi neutralizado na proporção 1:2. O soro poliespecífico controlou parcialmente os efeitos de nocicepção e edema induzidos pelos venenos, sendo mais eficiente no controle da nocicepção induzida pelo veneno de *P. gr orbygnyi* e no edema induzido pelo veneno de *S. plumieri*. Além da neutralização dos principais efeitos locais, o soro poliespecífico foi capaz de neutralizar a inflamação sistêmica pulmonar induzida pelo veneno de *S. plumieri*. Os dados obtidos nos permitem sugerir o uso de soro poliespecífico no controle dos envenenamentos

causados pelos peixes *T. nattereri*, *S. plumieri*, *C. spixii* e *P. gr orbygnyi*, uma vez que para eles não existe terapia apropriada.

Palavras-chave: *Thalassophryne nattereri*; *Scorpaena plumieri*; *Potamotrygon gr orbygnyi*; *Cathrops spixii*; Venenos de peixes; Soroterapia; Atividades tóxicas; Soro poliespecífico.

ABSTRACT

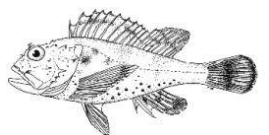
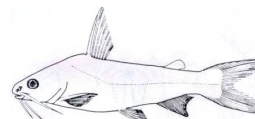
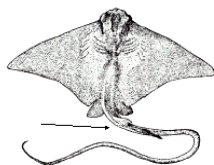
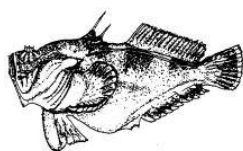
BRUNI, F.M. **Evaluation of the neutralization of important toxic activities induced by brazilian fish venoms by murine polyspecific antiserum.** 2008. 107 f. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Envenoming induced by venomous fish represents a great cost Brazilian communities. Victims rapidly develop local symptoms as pain, swelling, and necrosis that persist for long days, and in some cases systemic effects are noted. The most frequent venomous fish founded on the Brazilian coast are *Thalassophryne nattereri* (niquim), *Cathorops spixii* (bagre), *Scorpaena plumieri* (peixe-escorpião) and *Potamotrygon gr orbygnyi* (arraia). The anti-inflammatory drugs used (dexamethasone and indomethacin) are not efficient in reducing the clinical symptoms. After bits of venomous animals, the passive transfer of heterologous specific antibodies allows that immediate toxic effect can be neutralized in the victims. Recently, anti-venom for accidents caused by stonefish of the Indo-Pacific Ocean has been used. The aim of this work was to produce in mice polyspecific antivenom for neutralization of the main toxic effects induced by the Brazilian venomous fish. Independent groups of Swiss mice were immunized at days 0, 14, and 28 with 10 µg of each venom or at days 0 and 14 with 10 µg of each venom adsorbed in Al(OH)₃. The animals were bled at days 35 or 28, respectively for monospecific antibody levels determination by ELISA. The polyspecific antiserum achieved by the addition of 1 mg of IgG from each monospecific antiserum was used for neutralizations assays for two methods of evaluation, for preincubation and independent injection (immediate and after 15 minutes). Initially, we observed a full recognition of all antigenic bands of the four venoms by polyspecific antiserum. The effects induced by all venoms in the microcirculation were abolished by the polyspecific antiserum, except for the effects caused by *C. spixii* in muscular fibers where was necessary a proportion of 1:2 for abolish the effect. The polyspecific antiserum controlled the edematogenic and nociceptive activities caused by all venoms, being more efficient in controlling the nociception induced by the *P. gr orbygnyi* venom and the airway inflammation induced by the *S. plumieri* venom. These data allow us to suggest the use of

polyspecific antiserum in the treatment of the pathological effects provoked by the most frequent Brazilian venomous fish.

Key Words: *Thalassophryne nattereri*; *Scorpaena plumieri*; *Potamotrygon* *gr orbygnyi*; *Cathrops spixii*; Fish venom; Serumtherapic; Toxic activities; Polyspecific antivenom.

Introdução



1 INTRODUÇÃO

O estudo de venenos animais vem sendo realizado principalmente no sentido de compreender suas ações deletérias em humanos, possibilitando desta maneira o desenvolvimento de tratamentos específicos. Além disso, estudos recentes também demonstram a presença em venenos de substâncias com potencial terapêutico ou ferramentas farmacológicas. Dentre esses venenos pode-se destacar os de animais aquáticos.

A produção de toxinas por animais aquáticos é uma estratégia importante que garante sua sobrevivência em um ecossistema altamente competitivo. Assim, para defender-se ou defender seu território, estes animais produzem um número enorme de metabólitos, cujas combinações resultam em uma grande variedade de estruturas químicas e moléculas complexas como peptídeos e proteínas com propriedades químicas e farmacológicas diferentes das apresentadas pelos venenos de animais terrestres (RUSSELL et al., 1971). Trabalhos realizados com toxinas oriundas de animais aquáticos vem demonstrando que elas representam uma vasta fonte de substâncias com distintas atividades farmacológicas (OLIVEIRA et al., 1990; NUIJEN et al., 1999; RINEHART et al., 2000; CVETKOVIC et al., 2002; VAN-KESTEREN et al., 2002).

O Brasil possui uma extensa linha costeira (aproximadamente 7.400 Km) de águas temperadas e tropicais, propiciando a existência de grande número de animais potencialmente perigosos que associados a fatores como o grande afluxo de banhistas às praias, o incremento à pesca comercial e esportiva, atividades como mergulho autônomo e pesca submarina favorecem a ocorrência de muitos acidentes em humanos, sendo grande parte destes provocados por peixes peçonhentos. Por esses motivos nos últimos anos acidentes causados por esses animais vêm sendo relatados ao longo de toda a costa litorânea e fluvial. De acordo com o Ministério da Saúde foram notificados 367 casos de acidentes causados por peixes peçonhentos em 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Peixes peçonhentos possuem glândulas cutâneas especializadas na produção de veneno conectadas a dutos excretores (espinhos ou ferrões). Possuem importância médica pelos acidentes que provocam em humanos, uma vez que são incapacitantes e mantêm a vítima afastada do trabalho por semanas

ou mesmo meses, provocando enorme morbidade além de acarretar importantes seqüelas pela ausência de uma terapia cientificamente comprovada. Sabe-se que são capazes de provocar principalmente efeitos locais como dor, edema, necrose e em alguns casos são relatados efeitos sistêmicos. Infelizmente, a casuística de envenenamento por peixes peçonhentos é subestimada no Brasil, pois poucos são os centros médicos que realizam corretamente os registros.

Praticamente todas as famílias e gêneros de peixes peçonhentos têm representantes nos mares e rios do Brasil (HADDAD JR et al., 2002), entretanto os que mais causam acidentes são arraias (HADDAD JR., 2000), bagres (HADDAD JR., 2000), peixes-escorpião (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978; 1980; HADDAD JR. et al., 2003) e niquins (ALMEIDA; ROCHA, 1989; FONSECA; LOPES-FERREIRA, 2000; AUTO, 1992; HADDAD JR et al., 2003; FACÓ et al., 2005).

As arraias pertencem à ordem Rajiformes e podem ser marinhas ou fluviais. São encontradas em todo litoral brasileiro sendo que as de água doce são encontradas com mais freqüência em rios das regiões norte e centro-oeste. Habitam o fundo de rios ou mares (bentônicas) e possuem um longo apêndice caudal semelhante a um chicote onde estão localizados de um a quatro ferrões ósseos serrilhados, recobertos por glândulas de veneno. Estas não são individualizadas, mas encontram-se dispersas sobre os ferrões (HALSTEAD, 1970). As arraias podem acidentar banhistas por serem pisadas ou pescadores quando estes as manipulam presas em anzóis ou em redes de pesca. As lesões provocadas pelo ferrão são lacerantes, muitas vezes profundas e ocorrem na maioria das vezes nos membros inferiores, pés e tornozelos. O envenenamento causa imediatamente intensa dor, edema e em alguns casos hemorragia. Sintomas como náusea, vômito, salivação, hipotensão arterial, sudorese e paralisia muscular são raramente relatados. No entanto, a dor é o sintoma mais comum seguido do aparecimento de necrose (SUTHERLANDS 1983; EDMONDS, 1989, HADDAD JR et al., 2004).

Dentre as espécies de arraias brasileiras destacam-se as do gênero *Potamotrygon* por causarem grande número de acidentes na região Norte. Haddad Jr. e colaboradores (2004) descreveram que o veneno de *Potamotrygon*

falkneri apresenta um perfil eletroforético com bandas protéicas de 12 a 130 kDa. Por eletroforese com substratos específicos, os autores detectaram no veneno atividades gelatinolítica, caseinolítica e hialuronidásica e as relacionaram a proteínas de 80, 100 e 84 kDa, respectivamente.

A caracterização das principais atividades tóxicas de outras duas arraias brasileiras *Potamotrygon cf scobina* e *Potamotrygon gr orbigny* também foi descrita por nosso grupo. Demonstramos que a injeção destes venenos na pata de camundongos induz significativa atividade edematogênica e nociceptiva de forma dose-dependente. Utilizando a técnica de microscopia intravital observamos que os venenos destas arraias induzem aumento de cerca de 70% no número de leucócitos rolantes e aderidos na parede de vênulas pós-capilares em microcirculação de cremaster de camundongos. Além disso, esses venenos apresentam atividade necrosante de pouca intensidade (até 1,5 mm²) e somente em altas concentrações (100 µg/dorso). Baixos níveis de atividade proteolítica foram detectados e os venenos não induzem hemorragia. Análise de SDS-PAGE mostrou que os venenos têm um perfil eletroforético semelhante entre si com exceção de duas bandas exclusivas no veneno de *P. gr orbigny*, uma de 66,2 e outra de 25 kDa. No entanto, quando submetidos à cromatografia de gel filtração ambos os venenos apresentam igualmente 5 frações protéicas (MAGALHÃES et al., 2006).

Recentemente, Conceição e colaboradores (2006) determinaram a seqüência de um peptídeo denominado Orpotrin no veneno da arraia *P. gr orbigny*. Através de microscopia intravital foi registrado um intenso efeito vasoconstritor em arteríolas quando o peptídeo foi aplicado topicamente no tecido cremaster de camundongos.

Os bagres destacam-se pela larga distribuição nos mares e rios do mundo inteiro, são peixes de couro e vivem em locais rasos e de fundo lodoso. São encontrados em ecossistemas de água salobra e água doce. Em geral, procuram a desembocadura dos rios e regiões lagunares na época de desova. Apresentam longos e robustos ferrões serrilhados à frente das nadadeiras, dorsal (um espinho) e peitoral (dois em cada nadadeira), todos revestidos por tecido glandular. No peixe encontramos além das glândulas que revestem os espinhos outras duas fontes de veneno: a secreção encontrada nos poros glandulares axilares e o veneno da pele que consiste em um material protéico gelatinoso

produzido por células produtoras de proteínas denominadas “células-club” (THULESIUS et al., 1983; CHURCH; HODSON, 2002). Dos peixes peçonhentos do Brasil são os que provocam o maior número de acidentes (HADDAD JR, 2000) por estarem amplamente distribuídos por toda a costa, sendo mais abundantes nas regiões Sudeste e Sul (REIS, 1986; HADDAD JR et al., 2006). Estes ocorrem principalmente quando pescadores manuseiam redes de pesca e quando banhistas pisam em um exemplar morto descartado na praia. Os acidentes provocados pelo bagre são caracterizados por ferimentos puntiformes ou lacerantes, eritema, edema, dor que se irradia pelo membro, sudorese, mal-estar, febre, náusea, vômito, agitação psicomotora e infecção secundária (HADDAD JR, 2000).

No Brasil são duas as principais espécies associadas a injúria em humanos: *Cathorops spixii* (bagre amarelo) e *Genidens genidens* (bagre branco). Com relação a essas espécies os primeiros trabalhos foram realizados por nosso grupo. O veneno de *G. genidens* apresenta perfil eletroforético complexo com bandas protéicas majoritárias entre 25 a 35 kDa, sendo capaz de induzir nocicepção e edema em camundongos (MONDIN et al., 2003).

Junqueira e colaboradores (2007) caracterizaram imunologicamente os venenos do ferrão e do muco do bagre *C. spixii*. Os resultados mostram que a injeção dos dois venenos promove reação inflamatória com diferentes perfis diferentes. A injeção intraperitoneal do muco em camundongos Balb/c induz imediato recrutamento de neutrófilos (2 horas) seguido de macrófagos (7 dias). Estes macrófagos obtidos do exudato peritoneal, após re-estimulação *in vitro* com o muco expressam altos níveis das moléculas CD11c e MHC classe II e sintetizam a citocina IL-12p70, indicando uma ativação dos fagócitos com capacidade de apresentação antigênica. Ao contrário, o infiltrado celular induzido pela injeção do ferrão é rapidamente solucionado, sendo indetectado após sete dias. Além disso, os macrófagos peritoneais obtidos de camundongos injetados com o veneno do ferrão e re-estimulados *in vitro* possuem baixa capacidade de se diferenciarem em células apresentadoras de antígeno, não expressando CD11c nem exibindo níveis suficientes de MHC de classe II. A peritonite causada pela injeção dos venenos apresenta ainda a produção da citocina IL-6, quimiocinas (MCP-1 e KC) e do mediador lipídico LTB₄.

Os peixes-escorpião, pertencentes à família Scorpaenidae, são freqüentemente encontrados na costa brasileira entre rochas e recifes de corais e em baixas profundidades. No Brasil, as espécies mais encontradas são *Scorpaena plumieri* (peixe-escorpião preto) e *Scorpaena brasiliensis* (peixe-escorpião vermelho). São igualmente conhecidos como mamangava, mamangá ou beatriz. Apresentam aspecto exótico mimetizando o ambiente para melhor se ocultar de predadores. Os espinhos são distribuídos ao longo da nadadeira dorsal, sendo ao todo 13 dorsais, 3 anais e dois pélvicos, todos contendo individualmente pequenas glândulas produtoras de veneno. Os sinais do envenenamento em humanos são dor intensa, edema, necrose localizada e alterações sistêmicas que incluem dificuldade respiratória, hipotensão, arritmia, bradicardia, e em casos mais graves paralisia e convulsões (FIGUEIREDO et al., 1978; 1980; HADDAD JR et al., 2003).

Estudo publicado em 2005 por Carrijo e colaboradores mostrou que camundongos injetados com doses sub-letais do veneno de *S. plumieri* (LD50 0.28 mg/Kg) apresentam perda de controle dos movimentos, hipersalivação, convulsões e arritmias respiratória e cardíaca. O efeito cardiovascular foi avaliado e em baixas doses (0.04 mg/Kg) o veneno é capaz de induzir abrupta queda na pressão arterial e diminuição na freqüência respiratória. O veneno fresco induziu ainda atividade hemorrágica, hemolítica e proteolítica em camundongos (CARRIJO et al., 2005).

Boletini-Santos e colaboradores (2008) verificaram que o veneno de *S. plumieri* é capaz de induzir resposta sistêmica causando um dano pulmonar agudo, caracterizado por extravasamento protéico do espaço vascular para o alveolar e acompanhado pela infiltração de leucócitos (neutrófilos e macrófagos), síntese e secreção de citocinas e quimiocinas (IL-6, KC e MCP-1) como também de proteinases com atividade gelatinolítica (MMP-2 e MMP-9). Neste estudo, a lesão pulmonar aguda foi induzida pelo veneno tanto pela via intraperitoneal quanto pela via intraplantar. Além disso, foi descrito um complexo padrão eletroforético do veneno em SDS-PAGE, que apresenta nove bandas majoritárias que variam entre 25 e 116 KDa.

Os niquins pertencem à família Batrachoididae, são divididos em 15 espécies, das quais quatro são encontradas no Brasil: *Thalassophryne nattereri*, *Thalassophryne punctata*, *Thalassophryne reticulata* e *Thalassophryne*

amazonica. Entretanto, os únicos relatos de acidentes referem-se à espécie *T. nattereri*. Este é encontrado ao longo da costa norte e nordeste do Brasil, principalmente no encontro de águas marinhas e fluviais, vivendo entre rochedos ou plantas, encobertos pela areia ou lodo e em locais relativamente rasos. São popularmente chamados de niquim, miquim ou niquim-de-lama. Dos peixes peçonhentos possui o mais completo aparelho inoculador de veneno, consistindo de quatro espinhos, dois localizados na região dorsal (1º segmento da nadadeira dorsal) e dois laterais, colocados acima das barbatanas peitorais na região opercular. Todos os espinhos são canaliculados e possuem comunicação com as glândulas produtoras de veneno. São pontiagudos e revestidos por um prolongamento da pele do peixe que serve como bainha. Funcionam como arma de defesa e no momento em que o peixe se sente agredido, tocado ou pisado se eriçam e penetram funcionando como uma agulha injetando o veneno no tecido do agressor ou da vítima humana (FRÓES, 1932, 1933). Os acidentes provocados pelo *T. nattereri* acometem na maioria das vezes as regiões plantar ou palmar das vítimas humanas. Um dos principais sintomas decorrentes do envenenamento é a dor que se instala imediatamente após o acidente e persiste por mais de 24 horas e segundo a descrição das vítimas é de grande intensidade. Eritema e edema também são notados de imediato com eflorescência de bolhas com conteúdo seroso. Estes acidentes evoluem para necrose que na maioria das vezes se instala após 24 horas e permanece por um longo período de tempo, retardando o processo de cicatrização (FONSECA; LOPES-FERREIRA, 2000).

Estudos realizados com o veneno de *T. nattereri* em camundongos mostram que baixas doses do veneno (a partir de 0,3 µg/por animal) são suficientes para induzir efeitos locais de dor e edema, semelhantes aos descritos em humanos (FONSECA; LOPES-FERREIRA, 2000). O veneno não apresenta atividades hemorrágica, fosfolipásica A2 ou coagulante (LOPES-FERREIRA et al., 1998). Também foi verificado que a nocicepção e o edema causados pelo veneno podem ser mediados por toxinas com atividade cininogénica (LOPES-FERREIRA et al., 2004). O veneno é capaz de alterar a fisiologia renal de ratos interferindo principalmente em parâmetros vasculares (FACÓ et al., 2003). A análise histopatológica da lesão induzida pelo veneno no músculo gastrocnêmio mostrou aparecimento de mionecrose precoce e de difícil regeneração, trombos e poucas células fagocitárias (LOPES-FERREIRA et al., 2001). A análise por

microscopia intravital mostrou que o veneno induz estase do fluxo sangüíneo nas vênulas pós-capilares e em capilares e vasoconstrição das arteríolas. De modo interessante, a estase venular ocorrida não pode ser associada à ação do veneno sobre fatores solúveis da coagulação, pois testes *in vitro* mostram que o veneno não é capaz de induzir coagulação do sangue total, do plasma rico ou agir sobre plaquetas. Baseado nesses resultados os autores sugerem que os efeitos na microcirculação podem estar relacionados à ação indireta de mediadores liberados de plaquetas ou células endoteliais, uma vez que o veneno promove a lise dessas células em cultura (LOPES-FERREIRA et al., 2002).

Com relação à ação inflamatória foi verificado que após a injeção do veneno no coxim plantar de camundongos ocorre a liberação de importantes citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 na lesão, porém acompanhada de uma pobre migração celular. Foi ainda verificado que o veneno afeta a viabilidade de células mononucleares da linhagem J774A1 em cultura (LIMA et al., 2003). Em baixas doses, a injeção do veneno adicionado do adjuvante hidróxido de alumínio em camundongos promove resposta imune específica com diferenciação de linfócitos T de ambos os tipos (Th1 e Th2) com grande produção de IL-5 e IFN- γ , promovendo a síntese de anticorpos veneno específicos IgG1 e IgG2a e IgE total (GRUND et al., 2006).

As toxinas do veneno de *T. nattereri* vêm sendo obtidas através da utilização de técnicas cromatográficas seguida da caracterização de suas seqüências através da abordagem de química de proteínas (isolamento e seqüenciamento de peptídeos internos e N-terminal) e de biologia molecular (transcriptoma da glândula venenífera do peixe e expressão dos cDNAs que codificam as toxinas). Utilizando as abordagens acima descritas sabemos da existência, na glândula venenífera do peixe, das seguintes toxinas: Família Natterinas (N1, MM 35,8 kDa e pl 8,18; N2, MM 38,1 kDa e pl 8,76 e N3, MM 35,0 kDa e pl 6,70) e Nattectina (MM 15,0 kDa e pl 9,73). A Nattectina representa 0,8% das toxinas do veneno com homologia para proteínas lectina do tipo C. Já as Natterinas são as toxinas majoritárias e não apresentam homologia com proteínas encontradas nos bancos de dados (MAGALHÃES et al., 2006). Possuem atividade cininogenásica e são as responsáveis pela nocicepção e o edema induzidos pelo veneno (MAGALHÃES et al., 2005; LOPES-FERREIRA et al., 2004).

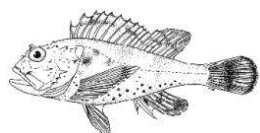
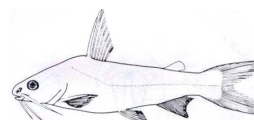
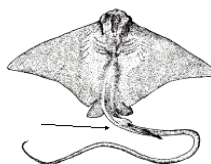
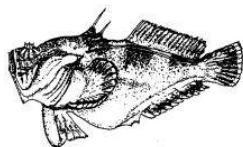
Uma vez que acidentes por peixes peçonhentos de diferentes famílias vêm ocorrendo com maior frequência no Brasil e por não possuírem um tratamento específico eficaz tornam-se um problema médico e sócio-econômico, pois as vítimas permanecem de dias a meses com os sintomas do envenenamento, impossibilitadas de voltar ao trabalho. Desta maneira, o estudo destes venenos visando a obtenção de uma terapia apropriada apresenta-se oportuno.

Dos tratamentos utilizados para os pacientes acidentados por peixes, o inicialmente indicado é a imersão do membro lesado em água quente, na tentativa de aplacar a dor. Outra medida adotada de rotina nos hospitais é o uso de analgésicos injetáveis no local do acidente, antiinflamatórios e antibióticos. Entretanto, os antiinflamatórios dexametasona ou indometacina não são capazes de reverter os sintomas que evoluem independentemente da sua utilização. Estas observações clínicas também foram confirmadas em camundongos. Dexametasona e indometacina não reduzem eficientemente a dor e o edema provocados pelos venenos de *P. gr orbigny*, *C. spixii* ou *T. nattereri*. Os efeitos induzidos pelo veneno de *T. nattereri* também não são inibidos pelo tratamento com inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME) nem pelo antagonista de serotonina (ciproheptadina). Somente os inibidores das calicreínas tecidual ou plasmática são capazes de reduzir parcialmente a dor e o edema (LOPES-FERREIRA et al., 1998a,b, 2004).

Enquanto os antiinflamatórios clássicos mostram-se ineficientes para os acidentes provocados pelo *T. nattereri* os anticorpos específicos apresentam capacidade eficiente de neutralização dos sintomas do envenenamento. Camundongos com resposta de memória e altos títulos de anticorpos neutralizantes não desenvolvem dor ou edema após um segundo contato com o veneno (LOPES-FERREIRA et al., 2000; PIRAN-SOARES et al., 2007).

Sabendo que a soroterapia é considerada um eficiente tratamento para reverter os efeitos patológicos causados por diversos animais peçonhentos e é o tratamento utilizado também para acidentes provocados por peixes do oceano Indo-Pacífico (GWEE et al., 1994; SUTHERLAND, 1992) este projeto tem como principal objetivo a produção experimental de um soro poliespecífico constituído por anticorpos dirigidos aos venenos dos principais peixes peçonhentos que mais causam acidentes no Brasil (*C. spixii*, *P. gr orbigny*, *S. plumieri* e *T. nattereri*) e ainda a avaliação da sua capacidade neutralizante.

Conclusão

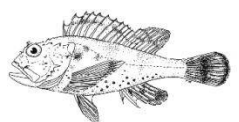
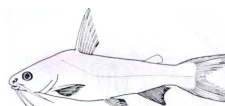
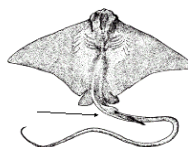
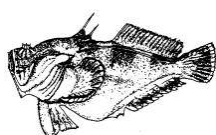


6 CONCLUSÃO

- O protocolo de imunização de camundongos padronizado com o uso ou não de adjuvante possibilitou a obtenção de soros monoespecíficos com títulos satisfatórios de anticorpos e com especificidade para os venenos que os geraram e para os venenos de outros peixes
- As atividades induzidas pelos venenos na microcirculação foram totalmente neutralizadas pelo soro. A neutralização do efeito do veneno de *C. spixii* sobre as fibras musculares foi parcial, ao contrário da maior eficiência na neutralização do efeito induzido pelo veneno de *T. nattereri*
- O soro poliespecífico controlou parcialmente os efeitos de nocicepção e edema induzidos pelos venenos, sendo mais eficiente no controle da nocicepção induzida pelo veneno de *P. gr orbygnyi*
- Além da neutralização dos principais efeitos locais, o soro poliespecífico foi capaz de neutralizar a inflamação sistêmica pulmonar induzida pelo veneno de *S. plumieri*

Os nossos dados nos permitem sugerir o uso de soro poliespecífico no controle dos envenenamentos causados pelos peixes *T. nattereri*, *S. plumieri*, *C. spixii* e *P. gr orbygnyi* uma vez que para eles não existe terapia apropriada.

Referências Bibliográficas



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALMEIDA, V. G.; ROCHA, C. M. Registros de acidentes com peixes peçonhentos e/ou venenosos. **Rev. Soc. Bras. Toxicol.**, 1989.

AOSHI, T.; NAGATA, T.; SUZUKI, M.; UCHIJIMA, M.; HASHIMOTO, D.; RAFIEI, A.; SUDA, T.; CHIDA, K.; KOIDE, Y. Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. **Infect. Immun.**, v. 76, n.4. p. 1565-71, 2008.

ARAUJO, S. C.; CASTANHEIRA, P.; ALVARENGA, L. M.; MANGILI, O. C.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v. 41, n. 3, p. 261-267, 2003.

ARAUJO, S. D.; DE, S. A.; NUNES, F. P.; GONCALVES, L. R. Effect of dexamethasone associated with serum therapy on treatment of *Bothrops jararaca* venom-induced paw edema in mice. **Inflamm. Res.**, v. 56, n.10, p. 409-413, 2007.

ATKINSON, P. R. T.; BOYLE, A.; HARTIN, D.; McAULEY, D. Is hot water immersion an effective treatment for marine envenomation? **Emerg. Med. J.**, v. 23, p. 503-508, 2006.

AUTO, H. F. Acidentes por peixes peçonhentos *Thalassophryne* (Niquim), considerações em torno de 32 casos. **Rev. Esc. Ciênc. Méd. Alagoas**, 1992.

BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc. Res.**, v. 5, p. 384-394, 1973.

BOGARIN, G.; MORAIS, J. F.; YAMAGUCHI, I. K.; STEPHANO, M. A.; MARCELINO, J. R.; NISHIKAWA, A. K.; GUIDOLIN, R.; ROJAS, G.; HIGASHI, H. G.; GUTIERREZ, J. M. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, v. 38, p. 1429-1441, 2000.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOLETINI-SANTOS, D.; KOMEAGAE, E. N.; FIGUEIREDO, S. G.; HADDAD JR., V.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Systemic response induced by *Scorpaena plumieri* fish venom initiates acute lung injury in mice. **Toxicon**, v. 15, n.4, p. 585-96, 2008.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93-95, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNI, F. M.; MAGALHÃES, G.S.; LOPES-FERREIRA, M. The role of Natterin 2 in nociception and edema induced by *Thalassophryne nattereri* venom. VIII Congresso da Sociedade Brasileira de toxicologia-Symposium of the Pan American section of the International society on toxicology. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 8., 2004, Angra dos Reis, RJ. **Anais...** Angra dos Reis: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2004. p.183-183.

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J. L. L.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 367-392.

CARMICLE, S.; STEEDE, N. K.; LANDRY, S. J. Antigen three-dimensional structure guides the processing and presentation of helper T-cell epitopes. **Mol. Immunol.**, v. 44, p. 1159-1168, 2007.

CARRETTE, T. J.; CULLEN, P.; LITTLE, M. Temperature effects on box jellyfish venom: a possible treatment for envenomed patients? **Med. J. Aust.**, v. 177, p. 654-655, 2002.

CARRIJO, L. C.; ANDRICH, F.; LIMA, M. E.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; FIGUEREIDO, S. G. Biological properties of the venom from the Scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**, v. 45, p. 843-850, 2005.

CHEN, H.S.; LEI, J.; HE, X.; WANG, Y.; WEN, W.W.; WEI, X.Z.; GRAVEN-NIELSEN, T.; YOU, H.J.; ARENDT-NIELSEN, L. Pivotal involvement of neurogenic mechanism in subcutaneous bee venom-induced inflammation and allodynia in unanesthetized conscious rats. **Exp. Neurol.**, v. 200, p.386-91, 2006.

CHOTWIWATTHANAKUN, C.; PRATANAPHON, R.; AKESOWAN, S.; SRIPRAPAT, S.; RATANABANANGKOON, K. Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol. **Toxicon**, v. 39, p. 1487-1494, 2001.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, p. 823-846, 1998.

CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. Stonefish (*Synanceia* spp.) antivenom neutralizes the in vitro and in vivo cardiovascular activity of soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*) venom. **Toxicon**, v. 39, p. 319-324, 2001.

CHURCH, J. E., HODSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 1083-1093, 2002.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, C.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, D.; LOPES-FERREIRA, M. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon* gr. *orbygnyi*. **Peptides**, v. 27, p. 3039-3046, 2006.

CRIBBS, D. H.; GHOCHIKYAN, A.; VASILEVKO, V.; TRAN, M.; PETRUSHINA, I.; SADZIKAVA, N.; BABIKYAN, D.; KESSIAK, P.; KIEBER-EMMONS, T.; COTMAN, C. W.; AGADJANYAN, M. G. Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with β -amyloid. **Jpn. Soc. Immunol.**, v.15, p. 505-514, 2003.

CURRIE, B. J.; F.R.A.C.P.; F.A.F.P.H.M.; D.T.M.H. Marine Antivenoms. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 41, p. 301-308, 2003.

CVETKOVIC, R.S.; FIGGIT, D.P.; PLOSKER, G. L. ET- 743. **Drugs**, v.62, p. 1185-1192. 2002.

DAI, G.; CARMICLE, S.; STEEDE, N. K.; LANDRY, S. J. Structural basis for helper T-cell and antibody epitope immunodominance in bacteriophage T4 Hsp10. Role of disordered loops. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 161-168, 2002.

EDMONDS, C. **Dangerous marine creatures**. Frenchs Foret, New South Wales: Reed Books, 1989.

FACÓ, P. E.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S.; NOBRE, A. C.; BEZERRA, G. P.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; LOPES-FERREIRA, M.; MONTEIRO, H. S. Effects of *Thalassophryne nattereri* fish venom in isolated perfused rat kidney. **Toxicon**, v. 42, n. 42, p. 509-514, 2003.

FACÓ, P. E.; BEZERRA, G. P.; BARBOSA, P. Epidemiologia dos acidentes por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará (1992-2002). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p.479-482, 2005.

FERNANDES, I.; LIMA, E. X.; TAKEHARA, H. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TANJONI, I.; GUTIÉRREZ, J. M. Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, v. 38, p. 633-44, 2000.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Brasil II. Teleostei (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1978, p. 34-95.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. J. L.; FIGUEIREDO, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil**: São Paulo: Museu de Zoologia - Universidade de São Paulo, 1990, p.14-18.

FONSECA, L. A.; LOPES-FERREIRA, M. Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *T. nattereri* (niquim). **An. Bras. Dermatol.**, v. 75, n. 4, p. 435-443, 2000.

FRÓES, H. P. Sur un poisson toxiphore brésilien: le "niquim" *Thalassophryne maculosa*. **Rev. Sudam. Med. Chil.**, v. 3, p. 871-878, 1932.

FRÓES, H. P. Peixes toxíforos do Brasil. **Bahia Med.**, v. 4, p. 69-75, 1933a.

FRÓES, H. P. Studies on venomous fishes of tropical countries. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 36, p. 134-135, 1933b.

FRÓES, H. P. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (*Thalassophrynidæ*). **Bahia Med.**, v. 4, p. 225-227, 1933c.

GARCÍA, M.; MONGE, M.; LEÓN, G.; LIZANO, S.; SEGURA, E.; SOLANO, G.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. Effect of preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation. **Biologicals**, v. 30, p.143-51, 2002.

GOURLEY, T. S.; WHERRY, E. J.; MASOPUST, D.; AHMED, R. Generation and maintenance of immunological memory. **Semin. Immunol.**, v. 16, p. 323-333, 2004.

GRUND, L. Z.; SOUZA, V.M.O.; MAURO-FAQUIM, E.L.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Experimental immunization with *Thalassophryne nattereri* fish venom: Striking IL-5 production and impaired of B220+ cells. **Toxicon**, v. 48, n.5, p. 499-508, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENE, J. A.; CHAVES, F.; ALVARADO, J.; ROJAS, E. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. **Toxicon**, v. 28, p. 1127-1129, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n.11, p. 1405-24, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; BOGARIN, G. Evaluation of the neutralizing ability of antivenoms for the treatment of snake bit envenomation of Central America. In: BON, C.; GOYFFON, M. (Ed.). **Envenomings and their treatment**. Lyon: Fundation Marcel Meriéux, 1996. p. 223-231.

GUTIÉRREZ J.M.; ROJAS E.; QUESADA L.; LEÓN G.; NÚÑEZ J.; LAING G.D.; SASA M.; RENJIFO J.M.; NASIDI A.; WARRELL D.A.; THEAKSTON R.D.; ROJAS G. Pan-African polyspecific antivenom produced by caprylic acid purification of horse IgG: an alternative to the antivenom crisis in Africa. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, p.468-75, 2005.

GWEE, M. C; GOPALAKRISHNAKONE, P.; YUEN, R.; KHOO, H. E.; LOW, K.S. A review of stonefish venoms and toxins. **Pharmacol. Ther.**, v. 64, p. 509-528, 1994.

HADDAD JR, V. **Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento.** São Paulo: Editora Roca, 2000. p. 145.

HADDAD JR, V.; DA SILVEIRA. F. L.; CARDOSO, J. L.; MORANDINI, A. C. A report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. **Toxicon**, v. 40, p. 1445-50, 2002.

HADDAD JR, V.; PARDAL, P. P. O.; CARDOSO, J. L.; MARTINS, I. A. The venomous toadfish *Thalassophryne nattereri* (niquim or miquim): Repor of 43 injuries provoked in fishermen of Salinópolis (Pará State) and Aracaju (Serjipe State). **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 4, p. 221-3, 2003.

HADDAD JR, V.; NETO, D.G.; NETO, J.B.P.; MARQUES, F.P.L.; BÁRBARO, K.C. Freshwater stingrays:study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**, v. 43, p. 287-294, 2004.

HADDAD JR, V.; MARTINS, I.A. Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study. **Toxicon**, v. 47, p. 838-843, 2006.

HAROUND, M.; EL-SAYED, M. Measurement of IgG levels can serve as a biomarker in newly diagnosed diabetic children. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 40, p. 56-61, 2007.

HAWGOOD, B. J. Pioners of anti-venomous serotherapy: Dr. Vital Brazil (1865-1950). **Toxicon**, v. 30, p. 573-79, 1992.

HALSTEAD, B. W. **Poisonous and venomous marine animals of the world.** Washington: US Government Printing Office, 1970.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, n.1, p. 69-76, 1985.

JORDAN, M.B.; MILLS, D.M.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; CAMBIER, J. C. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. **Science**, v. 304, p. 1808-1810, 2004.

JUNQUEIRA, M. E. P. **Resposta Imune induzida pelas peçonhas do bagre *Cathorops agassizii***. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu , Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

JUNQUEIRA, M.E.; GRUND, L.Z.; ORII, N.M.; SARAIVA, T.C.; DE MAGALHÃES LOPES, C.A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Analysis of the inflammatory reaction induced by catfish (*Cathrops spixii*) venoms. **Toxicon**, v. 49, p. 909-19, 2007.

KANKONKAR, R. C.; KULKURNI, D. G.; HULIKAVI, C. B. Preparation of a potent anti-scorpion-venom-serum against the venom of Red Scorpion (*Buthus tamaris*). **J. Postgrad. Med.**, v. 44, p. 85-92, 1998.

KOOL, M.; SOULLIÉ, T.; NIMWEGEN, M. V.; WILLART, M. A. M.; MUSKENS, F.; JUNG, S.; HOOGSTEDEN, H. C.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 4, p. 869-82, 2008.

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

LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Immunoglobulin G and F(ab')₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 35, p. 1627-37, 1997.

LEON, G.; VALVERDE, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 233-244, 2000.

LIMA, C.; CLISSA, P. B.; PIRAN-SOARES, A. A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mouse model of tissue injury. **Toxicon**, v. 42, p. 499-507, 2003.

LOMONTE, B.; LUNDGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. The dynamics of local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 41-55, 1994.

LOPES-FERREIRA, M.; BÁRBARO, K. C.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. *T. nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v. 36, p. 405-410, 1998a.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A. S.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. Characterization of the nociceptive and edematogenic activities of the *T. nattereri* fish venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1304, 1998b.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. Neutralization of *T. nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. **Toxicon**, v. 38, p. 1149-1156, 2000.

LOPES-FERREIRA, M.; NÚÑEZ, N.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Necrosis induced by *thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom in murine skeletal muscle: a novel tool to study muscle degeneration and regeneration. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 55-64, 2001.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIRAN-SOARES, A. A.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FARSKY, S. H. P. Hemostatic effects induced by *T. nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. **Toxicon**, v. 40, p. 1141-1147, 2002.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A. S.; OLIVEIRA, V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H.; ARAÚJO, M. S.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; MOURA-DA-

SILVA, A. A. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 2151-2157, 2004.

MAGALHÃES, G. S.; LOPES-FERREIRA, M.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. M. J.; SPENCER, P. J.; ARAUJO, M. S.; PORTARO, F. C. V.; MA, L.; VALENTE, R. H.; JULIANO, L.; FOX, J. W.; HO, P. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Natterins, a new class of protein with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochimie**, v. 87, p. 687-699, 2005.

MAGALHÃES, K.W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A.A., MARQUES, E.E.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbigny*. **Toxicon**, v. 47, p. 575-583, 2006.

MEIER, J.; WHITE, J. **Clinical Toxicology of animal venomous and poisonous**. Florida: CRS Press, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Serviço De Vigilância Sanitária. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasília: Sinan, 2007.

MONDIN, A. C.; JUNQUEIRA, M. P.; FERREIRA, M. L.; RAMOS, P. R. R. Peçonhas de bagres marinhos: perfil eletroforético. In: ENCONTRO REGIONAL DE BIOMEDICINA, 6., 2003, Botucatu, SP. **Caderno de Resumos...** Botucatu: ERBM, 2003. p. 85-85.

MURRAY, C. W.; COWAN, A. Formalin nociception in the mouse does not lead to increased spinal serotonin turnover. **Neurosci. Lett.**, v. 108, n. 1-2, p. 132-137, 1990.

MUSTAFA, A. S.; AL-ATTIYAH, R.; HANIF, S.N.; SHABAN, F. A. Efficient Testing of Pools of Large Numbers of Peptides covering 12 Open Reading Frames of M. Tuberculosis RD1 and Identification of Major Antigens and Immunodominant Peptides Recognized by Human Th1 Cells. **Clin. Vaccine Immunol.**, 9, Apr. 2008. [Epub ahead of print].

NUIJEN, B.; BOUMA, M.; HENRAR, R.; MANADA, C.; BULT, A.; BEIJNEN, J.H. Compatibility and stability of aplidine, a novel marine-derive depsipeptide

antitumor agent, in infusion devices, and its hemolytic and precipitation potential upon i.v. administration. **Anticancer Drugs**, v. 10, p.879-886, 1999.

OCHSENBEIN, A. F.; PINSCHWE, R. D.; SIERRA, S.; HORVATH, E.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p.13263-13268, 2000.

OLIVERA, B.M.; RIVIER, J.; CRAIG C.; CECILIA, A.R.; CORPUZ, G.P.; ABOGADIE, F.; MENA E.E.; WOODWARD, S.R.; HILLYARD, D.R.; Cruz, L.J. Diversity of Conus neuropeptides. **Science**, v. 249, p.257-263, 1990.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A.; MIRANDA, E.; URIBE, A.F.; SILVA J.F.; OSPINA, J.G.; MEDINA, Y.; TORO, M.F.; GARCÍA, M.E.; LEÓN, G.; GARCÍA, M.; LIZANO, S.; DE LA TORRE, J.; MÁRQUEZ, J.; MENA, Y.; GONZÁLEZ, N.; ARENAS, L.C.; PUZÓN, A.; BLANCO, N.; SIERRA, A.; ESPINAL, M.E.; LOZANO, R. A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in Bothrops and Porthidium snake bites in Colombia: correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. **Toxicon**, v. 37, p.895-908, 1999.

OTERO, R.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G., TORO, M.F.; BARONA, J.; RODRÍGUEZ, V.; DÍAZ, A.; NÚÑEZ, V.; QUINTANA, J.C.; AYALA, S.; MOSQUERA, D.; CONRADO, L.L.; FERNÁNDEZ, D.; ARROYO, Y.; PANIAGUA, C.A.; LÓPEZ, M.; OSPINA, C.E.; ALZATE, C.; FERNÁNDEZ, J.; MEZA, J.J.; SILVA, J.F.; RAMÍREZ, P.; FABRA, P.E.; RAMÍREZ, E.; CÓRDOBA, E.; ARRIETA, A.B.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without beta-propiolactone, in the treatment of Bothrops asper bites in Colombia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, p.1173-82, 2006.

PIRAN-SOARES, A.A.; KOMEAGAE, E. N.; OLIVEIRA SOUZA, V.M.; FONSECA, L.A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Neutralizing antibodies obtained in a persistent immune response are effective against deleterious effects induced by the *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Toxicon**, v. 49, p. 920–930, 2007.

RAWEERITH, R.; RATANABANANGKON, K. Immunochemical and biochemical comparisons of equine monovalent and polyvalent snake antivenoms. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 369-375, 2005.

REIS, E. G. **A pesca artesanal de bagres marinhos (Siluriformes, Ariidae) no Estuário da Lagoa dos Patos, RS.** 5. ed. Lagoa dos Patos: Furg,1986. p. 22. (Documentos Técnicos).

RINEHART, K.L. Antitumor compounds from tunicates. **Med. Res. Rev.**, v.20, p.1-27, 2000.

ROJAS, G.; JIMÉNEZ, J.M.; GUTIÉRREZ, J.M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. **Toxicon**, v. 32, p.351-63, 1994.

RUSSELL, F.E. **Poisonous Marine Animals.** New York: TFH Publications, 1971.

SEUBERT, A.; MONACI, E.; PIZZA, M.; O'HAGAN, D.; WACK, A. The adjuvants Aluminum Hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **J. Immunol.**, v.180, p. 5402-5412. 2008.

SIVAN, G.; VENKETESVARAN, K.; RADHAKRISHNAN, C. K. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. **Toxicon**, v. 50, p. 563-571, 2007.

SOSA-ROSALES, J. I.; PIRAN-SOARES, A. A.; FARSKY, S. H. P.; TAKEHARA, H. A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. **Toxicon**, v. 45, p. 155-161, 2005.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 850-8, 1996.

SURMAN, S.; LOCKEY, T. D.; SLOBOD, K. S.; JONES, B.; RIBERDY, J. M.; WHITE, S. W.; DOHERTY, P. C.; HURWITZ, J. L. Localization of CD4⁺ T cell epitope hotspots to exposed strands of HIV envelope glycoprotein suggests structural influences on antigen processing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 4587-4592, 2001.

SUTHERLAND, S. **Australian Animal Toxins.** Australia: Oxford University Press, 1983.

SUTHERLAND, S. K. Deaths from snake bite in Australia, 1981-1991. **Med. J. Aust.**, v. 7, p. 740-746, 1992.

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

THULESIUS, O.; AL-HASSAN, J. M.; CRIDDLE, R. S.; THOMSON, M. Vascular responses elicited by venom of Arabian catfish (*Arius thalassinus*). **Gen. Pharmacol.**, v. 14, p. 129-132, 1983.

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

VAN KESTEREN, C.; TWELVES, C.; BOWMAN, A.; HOEKMAN, K.; LOPEZ-JAZARO JIMENO, J.; GUZMÁN, C.; MATHOT, R. A.; SIMPSON, A.; VERMORKEN J. B.; SMYTL, J.; SCHELLENS, J.H.; HILLEBRAND, M.J.; ROSING, H.; BEIJNEN, J.H. Clinical pharmacology of the novel marine-derived anticancer agent ecteinascidin 743 administered as a 1-and 3-h infusion in a phase in study. **Anticancer Drugs**, v.13, p.381-393, 2002.

WHITE, J. **CSL antivenom handbook**. Melbourne/Australia: Ed. CSL Press, 1995.

WILLIAMSON, J.; FENNER, P. J.; BURNETT J. W.; RIFKIN, J. R. **Venomous and Poisonous Marine Animals. A Medical and Biological Handbook**. Sydney: University of South Wales Press, 1996.

WINKEL, K. D.; MIRTSCHIN, P.; PEARN, J. Twentieth century toxinology and antivenom development in Australia. **Toxicon**, v. 48, p. 738-754, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**. Geneva: WHO Offset Publication, 1981. n. 58.

ZINKERNAGEL, R. M. On natural and artificial vaccinations. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, 515–546, 2003.