IASMIM BAPTISTA DE FARIAS

Estudo comparativo do Veneno Botrópico de Referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

São Paulo

2016

IASMIM BAPTISTA DE FARIAS

Estudo comparativo do Veneno Botrópico de Referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof.ª Drª. Anita Mitico Tanaka-Azevedo

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Farias, Iasmim Baptista de.
Estudo comparativo do veneno Botrópico de referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan / Iasmim Baptista de Farias. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Comparação do veneno das serpentes *Bothrops jararaca*.

Versão do título para o inglês: Comparative study between Bothropic reference venom and venom from Brazilian *Bothrops jararaca* snake born in captivity in the Herpetology Laboratory of Butantan Institute

1. *Bothrops jararaca* 2. Veneno de serpente 3. Soro antibotrópico 4. Comparação 5. Plantel 6. Veneno Botrópico de referência nacional I. Azevedo, Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0122/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Iasmim Baptista de Farias.

Título da Dissertação: Estudo comparativo do veneno Botrópico de referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

Orientador(a): Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo comparativo do veneno botrópico de referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan", **protocolo nº 1008/13**, sob a responsabilidade de Anita Mitico Tanaka Azevedo e Iasmim Baptista de Farias, Karem de Morais Zani – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 21/5/2014.

Vigência do Projeto: 05/2013 - 04/2015	**N° de animais/espécie**	**Observação**
Laboratório de Herpetologia	50 Camundongos Swiss 18-22g (M) - **adicional**; 110 Camundongos Swiss 5-8 semanas (M); 15 camundongos Balb/c 5-8 semanas (F)	Adicional de animais

São Paulo, 23 de maio de 2014

Dra. Wafa K. Cabrera
Coordenadora Substituta da CEUAIB

Ao meu avô Antonio, por ser meu maior incentivador, às minhas avós Neusa e Lindinalva. Aos meus pais Antonio Elias e Jupira e minha irmã, Iamê Gabriela por estarem sempre ao meu lado, apoiando, incentivando e dando todo o suporte necessário para a realização deste trabalho e ao Guilherme, meu namorado, por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Amo vocês.

Agradecimentos

Às minhas famílias Baptista e Farias, por estarem sempre ao meu lado. Em especial à minha tia Maria Cecília S. de Farias que me incentivou desde a infância para que eu estudasse e obtivesse sucesso na vida.

À minha amiga Angélica Gomes da Silva, que me indicou para fazer o estágio.

À Drª. Anita Mitico Tanaka Azevedo, por anos de compreensão, paciência, amizade e orientação.

Aos colegas de Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Caroline Serino Silva, Henrique Fernandes Sericaku, Karen de Morais Zani, Lídia Jorge Tasima, Nathália Galizio e Wéslei da Silva Aguiar, pela constante ajuda. De maneira especial à Caroline Serino Silva, Henrique Fernandes Sericaku, Karen de Morais Zani e Wéslei da Silva Aguiar, por estarem sempre comigo tanto na realização do Mestrado, quanto na amizade fora do laboratório.

À Drª. Kathleen Fernandes Grego, Diretora do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por permitir a realização deste trabalho e pelas imagens cedidas.

Ao Instituto Butantan por doar o Veneno Botrópico de Referência Nacional.

Ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela extração de venenos das serpentes do plantel.

À Drª. Marisa Maria Teixeira da Rocha, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela colaboração nos experimentos de Dose Letal 50%, Dose Efetiva 50% e Dose Mínima Hemorrágica.

À Patrícia Antônia Estima de Abreu Aniz, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, pela colaboração no experimento de ELISA.

À Drª. Elisabeth Cheng, Dr. Alexandre Keiji Tashima e Drª. Nancy Oguiura, pela participação no meu exame de qualificação e pelas valiosas sugestões.

À todos do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pelo apoio e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

FARIAS, I.B. de. **Estudo comparativo do Veneno Botrópico de Referência em relação ao veneno das serpentes *Bothrops jararaca* nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.** 2016. 95 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A composição do veneno das serpentes pode variar de acordo com a idade, gênero e a região de origem, tornando os venenos desses animais um importante campo na pesquisa científica e biomédica. O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* têm como principais atividades fisiopatológicas: proteolítica, hemorrágica e coagulante. Em 1987, O Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde no Brazil (INCQS) definiu o Veneno Botrópico de Referência Nacional (VBRN), que é composto pela primeira extração das serpentes recém-chegadas da natureza ao Instituto Butantan (IB) (São Paulo, Brasil), como referência para ensaios biológicos e bioquímicos dos antivenenos de todos os produtores brasileiros de soro antibotrópico. Contudo, tem-se observado uma queda gradual na recepção das serpentes da natureza ao IB, além disso, estas pertencem a uma distribuição geográfica restrita, resultando em uma menor variabilidade dos venenos que compõem o VBRN. O objetivo deste trabalho foi comparar os venenos das serpentes nascidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do IB (plantel) e o VBRN, por meio de ensaios bioquímicos e biológicos, para verificar a possibilidade de incorporar estes venenos na produção do VBRN. Muitos dos testes realizados, como a concentração de proteínas, a atividade fosfolipásica, o SDS-PAGE, o gel bidimensional, o *Western blotting* e a atividade coagulante sobre o plasma, mostraram-se similares entre os dois grupos. No entanto, a cromatografia líquida de alta performance - fase reversa (RP-HPLC) revelou algumas proteínas com concentrações diferentes nos dois grupos. Por outro lado, as atividades de L-aminoácido oxidase, a caseinolítica e a coagulante sobre o fibrinogênio foram maiores no veneno do plantel do que no VBRN. A zimografia mostrou que os venenos atuam diferentemente em diferentes substratos, como gelatina e caseína. O VBRN exibiu uma maior atividade hemorrágica que o veneno do plantel. O teste de ELISA mostrou que o VBRN teve um título de anticorpos superior ao do veneno do plantel, contudo, os títulos apresentaram a mesma ordem de grandeza. Com relação à dose letal média (DL_{50}), a toxicidade tem diferença significativa entre os grupos, com o VBRN sendo mais tóxico do que o veneno do plantel. No entanto, a mistura dos dois venenos mostrou uma toxicidade ainda maior do que a deles sozinhos, bem como para a dose efetiva média (ED_{50}), em que a mistura do veneno do plantel com o VBRN mostrou uma maior neutralização quando comparado aos venenos do plantel e do VBRN separados. Os dados ilustram a complexidade intraespecífica que ocorre nos venenos de serpentes, que podem ser atribuídos aos fatores ontogenéticos, sexuais e ambientais que afetam a variabilidade do veneno das serpentes *Bothrops jararaca.* Esses resultados sugerem a inclusão do veneno do plantel ao VBRN, sem que haja perda da qualidade desse veneno.

Palavras chaves: *Bothrops jararaca.* Veneno de serpente. Soro antibotrópico. Comparação. Plantel. Veneno Botrópico de Referência Nacional.

ABSTRACT

FARIAS, I.B. de. **Comparative study between Bothropic reference venom and venom from Brazilian *Bothrops jararaca* snake born in captivity in the Herpetology Laboratory of Butantan Institute.** 2016. 95 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The composition of the snake venom may vary according to the snakes age, gender, and region of origin, making the snake venoms an important field of scientific and biomedical research. *Bothrops* snake venoms have as main pathophysiological activities: proteolytic, hemorrhagic and coagulant. In 1987, the National Institute of Quality Control in Health in Brazil (INCQS) established the Brazilian Reference Bothropic Venoms (BRBV), which should be composed of the first extraction of newcomers wild snakes in Instituto Butantan (IB) (São Paulo, Brazil), as reference for biological and biochemical assays of antivenoms from all Brazilian antibothropic serum producers. However, it has been observed a gradual decreased in the number of snakes donated to the IB, moreover, they belong to a restricted geographical distribution, resulting in a lower variability of venoms to the BRBV composition. The aim of this work was to compare the venoms from snakes born in the Herpetology Laboratory of the Instituto Butantan (captivity) and the BRBV, by means of biochemical and biological assays, in order to verify the possibility of incorporating these venoms in the composition of the BRBV. Many of the tests performed, such as the protein concentration, phospholipase activity, SDS-PAGE, two-bidimensional gels, *Western blotting* and clotting activity of the plasma were similar between the two groups. However, High performance liquid chromatography- reversed phase (RP-HPLC) revealed some proteins at different concentrations in the two groups. On the other hand, the L-amino acid oxidase and caseinolytic activities, and the coagulant activity on the fibrinogen in captivity venom were higher than the BRBV. Zymography showed that the venoms act differently on different substrates, such as gelatin and casein. The BRBV exhibited greater hemorrhagic activity than the captivity venom. The ELISA test showed that BRBV had a higher antibody titer than the captivity venom, however, the titles are in the same order of magnitude. Regarding the median lethal dose (LD_{50}), toxicity has a significant difference between the groups with BRBV being more toxic than captivity venom, however, the mixture of both venoms showed greater toxicity than captivity venom or BRBV alone. Similarly, considering the median effective dose (ED_{50}), the mixture of the captivity venom with BRBV showed greater neutralization activity than captivity venom and BRBV separated. The data illustrate the intraspecific complexity that occurs in snake venoms that can be attributed to the ontogenetic, sexual and environmental factors that affect the variability of the venom of the *Bothrops jararaca* snakes. These results suggest the inclusion of the captivity venom to BRBV, without loss of quality of this venom.

Keywords: *Bothrops jararaca.* Snake venom. Anti-Bothropic serum. Comparison. Captivity. Brazilian Reference Bothropic Venoms.

Lista de ilustrações

Figura 01 - Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil, segundo o gênero da serpente causadora do acidente.....**19**

Figura 02 - Cabeça das serpentes do gênero *Bothrops*. Presas em repouso e preparadas para o bote.....**20**

Figura 03 - Fêmea adulta de *B. jararaca*.....**20**

Figura 04 - Distribuição geográfica da serpente *B. jararaca* no Brasil.....**21**

Figura 05 - Filhote de *B. jararaca*.....**21**

Figura 06 - Esquema de classificação das SVMP.....**26**

Figura 07 - Esquema da cascata de coagulação sanguínea e os locais de ações das SVSP.....**28**

Figura 08 - Sítios de ação das PLA_2s. R_1 e R_2 referem-se aos ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-2 dos fosfolipídios numerados estereoespecificamente, em que X se refere aos grupos polares, sendo os mais comuns: a colina, a etanolamina, a serina, o inositol e o glicerol.....**30**

Figura 09 - Distribuição geográfica dos venenos que compõem o BRA/BOT/005.....**37**

Figura 10 - (A): Banho de triclorfon 0,2%; **(B):** tratamento com vermifugação.....**38**

Figura 11 - Sala da quarentena de *B. jararaca*.....**38**

Figura 12 - (A): Sala berçário; **(B):** Sala da produção de venenos.....**39**

Figura 13 - Número de serpentes *B. jararaca* doadas anualmente ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan no período entre 2003 e 2013.....**40**

Figura 14 - Distribuição geográfica das serpentes *B. jararaca* oriundas da natureza entre 04/2012 e 01/2014.....**40**

Figura 15 - Distribuição geográfica de origem dos progenitores das serpentes produtoras de veneno do plantel.....**42**

Figura 16 - Proporção entre o sexo e a faixa etária das serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan utilizadas na composição do veneno de *B. jararaca* do plantel.....**42**

Figura 17 - Gráfico com dosagem de proteínas dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN.....**52**

Figura 18 - SDS-PAGE (12%) dos venenos de *B. jararaca* do plantel, do VBRN e da mistura dos dois venenos. Canaletas **(1)** e **(4):** plantel, **(2)** e **(5):** VBRN, **(3)** e **(6):** Mistura. Canaletas **(1-3):** condições reduzidas, canaletas **(4-6):** condições não reduzidas.....**53**

Figura 19 - Sobreposição dos géis bidimensionais do veneno *B. jararaca* do plantel (laranja) e do VBRN (azul), em destaque os *spots* exclusivos.....**54**

Figura 20 - Perfil cromatográfico dos venenos de *B. jararaca* em coluna C-18 em HPLC. Absorbância 215 nm. **(Azul):** Veneno do plantel, **(Vermelho):** VBRN, **(Verde):** Gradiente de tampão B.....**55**

Figura 21 - Atividade PLA_2 dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN.....**56**

Figura 22 - Atividade de LAAO do veneno do plantel e do VBRN.....**57**

Figura 23 - Atividade caseinolítica dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN.....**58**

Figura 24 - Zimografia dos venenos *B. jararaca* do plantel e do VBRN. **(A):** SDS-PAGE contendo caseína, **(B):** SDS-PAGE contendo gelatina, canaletas **(1):** plantel; **(2):** VBRN.....**59**

Figura 25 - Dose Mínima Coagulante sobre o plasma (DMC-P) e sobre o fibrinogênio (DMC-F) dos venenos das serpentes do plantel e do VBRN.....**60**

Figura 26 - Halos hemorrágicos causados pelos venenos, **(A):** Veneno do plantel; **(B):** VBRN.....**61**

Figura 27 - DMH dos venenos do plantel e o VBRN.....**61**

Figura 28 - Imunorreconhecimento dos venenos de *B. jararaca* do plantel e VBRN pelo soro comercial anti-botrópico, avaliado por ELISA.....**62**

Figura 29 - *Western Blotting* dos venenos de *B. jararaca* do **(1):** plantel, do **(2):** VBRN e da **(3):** Mistura dos dois venenos.....**62**

Figura 30 - DL_{50} dos venenos das serpentes do plantel, do VBRN e da mistura dos dois venenos.....**63**

Figura 31 - DE_{50} dos venenos do plantel, o VBRN e com a mistura dos dois venenos.....**64**

Lista de tabelas

Tabela 01 - Classificação das desintegrinas de acordo com o tamanho.....**27**

Tabela 02 - Composição de antígenos utilizados na produção de soros no Brasil.....**32**

Tabela 03 - Dosagem de proteínas dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN por A_{280} e BCA.....**52**

Tabela 04 - Atividade PLA_2 dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN.....**56**

Tabela 05 - Comparação da atividade de LAAO do veneno de *B. jararaca* do plantel e do VBRN.....**57**

Tabela 06 - Comparação da atividade caseinolítica dos venenos *B. jararaca* do plantel e do VBRN.....**58**

Tabela 07 - DMC sobre o plasma (DMC-P) e sobre o fibrinogênio (DMC-F) dos venenos das serpentes do plantel e o VBRN.....**60**

Tabela 08 - Valores da DMH dos venenos das serpentes do plantel e o VBRN.....**61**

Tabela 09 - DL_{50} dos venenos das serpentes do plantel, do VBRN e da mistura dos dois venenos.....**63**

Tabela 10 - DE_{50} dos venenos do plantel, VBRN e da mistura dos dois venenos.....**64**

Lista de abreviaturas e siglas

1008/13 CEUAIB – Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASP - Ácido aspártico

BCA – Ácido bicinconínico

BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ-RJ – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

B. jararaca - *Bothrops jararaca*

BPF - Boas Práticas de Fabricação

BRA/BOT/005 – Lote nº05 do Veneno Botrópico de Referência Nacional

$CaCl_2$ – Cloreto de cálcio

CPPI-PR – Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos

DE_{50} – Dose Efetiva Média

DL_{50} - Dose Letal Média

DMC-F – Dose mínima coagulante do Fibrinogênio

DMC-P – Dose mínima coagulante do plasma

DMH – Dose mínima Hemorrágica

D.P – Desvio padrão

DTT – Ditiotreitol

FAP-RJ – Fundação Ataulfo de Paiva

FUNED-MG – Fundação Ezequiel Dias

HCL – Ácido clorídrico

HF – Fator Hemorrágico

His - Histidina

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

IAA - Iodoacetamida

IB-SP – Instituto Butantan

IPB-RS – Instituto de Pesquisas Biológicas

INCQS – Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

IVB-RJ – Instituto Vital Brazil

LAAO - L-aminoácido oxidase

LCCDMA – Laboratório Central de Controle e Drogas, Medicamentos e Alimentos

NaCl – Cloreto de sódio

NaN_3 – Azida de sódio

NOBA – 4-nitro- 3-(octanoloxy) benzoic acid

OMS - *Organização Mundial de Saúde*

OPD – Ortofenilenodiamina

PASNI – Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos

P<0,05 – Diferenças estatísticas significativas

PBS – Tampão fosfato de sódio

pI – Ponto isoelétrico

PLA_2 - Fosfolipase A_2

PLANTEL – Serpentes que nascem em cativeiro

PNI - Programa Nacional de Imunizações

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SAB - Soro Antibotrópico

SAC - Soro Anticrotálico

SAE - Soro Antielapídico

SAL - Soro Antilaquético

Ser - Serina

SVMP- *Snake venom metalloproteinase*

SVSP- *Snake venom serine proteinase*

TCA – Ácido tricloroacético

TECPAR-PR – Instituto de Tecnologia do Paraná

TRIS - Trisaminometano

VBRN – Veneno Botrópico de Referência Nacional

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

1.1 Serpentes 18

1.2 *Bothrops jararaca* 19

1.3 Venenos 22

1.3.1 Ação proteolítica 23

1.3.2 Alterações hemostáticas 23

1.3.3 Ação hemorrágica 24

1.4 Famílias de proteínas dos venenos dos viperídeos 24

1.4.1 Metaloproteinases 24

1.4.2 Desintegrinas 26

1.4.3 Serinoproteinases 27

1.4.4 Lectinas do tipo C 28

1.4.5 Fosfolipases A_2 (PLA_2s) 29

1.5 Envenenamento 31

1.5.1 Acidente Botrópico 31

1.6 Produção de Soros Antiofídicos 31

1.7 Fabricação e distribuição dos soros antiofídicos no Brasil 33

1.8 Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos 34

1.9 Veneno Botrópico de Referência Nacional 36

1.10 Serpentes nascidas e mantidas em cativeiro 39

2. OBJETIVO 41

3. METODOLOGIA 42

3.1 Venenos 42

3.2 Camundongos 43

3.3 Dosagem proteica 43

3.4 SDS-PAGE 44

3.5 Gel bidimensional 44

3.6 Cromatografia líquida de fase reversa 45

3.7 Atividade de PLA_2 45

3.8 Atividade de LAAO 46

3.9 Atividade caseinolítica 46

3.10 Zimografia 47

3.11 DMC 47

3.12 DMH 48

3.13 ELISA 48
3.14 *Western Blotting* 49
3.15 DL_{50} 50
3.16 DE_{50} 50
3.17 Análise estatística 51
4. RESULTADOS 52
4.1 Dosagem de proteínas 52
4.2 SDS-PAGE 52
4.3 Gel bidimensional 53
4.4 Cromatografia líquida de fase reversa 54
4.5 Atividade de PLA_2 55
4.6 Atividade de LAAO 56
4.7 Atividade caseinolítica 57
4.8 Zimografia 58
4.9 DMC 59
4.10 DMH 60
4.11 ELISA 62
4.12 *Western Blotting* 62
4.13 DL_{50} 63
4.14 DE_{50} 64
5. DISCUSSÃO 66
6. CONCLUSÕES 79
REFERÊNCIAS* 80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes

As serpentes são animais que causam na maioria das pessoas o encantamento ou o medo. É nítida a sua simbologia dentro da cultura humana, cercada por diversos mitos, rituais e histórias ao redor do mundo. Esses animais são muito visados pela abundante fonte de superstição que os envolve, além de possuírem glândulas de veneno que contém componentes complexos bioativos, potencialmente importantes para a utilização como fármacos para o tratamento de diversas doenças (GARDINER; OSBORN, 2005).

Há muito tempo, a humanidade vem sofrendo envenenamentos causados por picadas de animais peçonhentos, que são aqueles que produzem substâncias tóxicas em glândulas especializadas e que apresentam aparelho apropriado para inoculação do veneno (BUTANTAN, 2006).

Aproximadamente 600 das 3.000 espécies de serpentes conhecidas mundialmente são peçonhentas. Predominantemente, esses animais são encontrados em regiões tropicais e equatoriais, mas podem ser encontradas em qualquer região do planeta, com exceção da Antártida (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2007).

No Brasil, existem aproximadamente 390 espécies de serpentes, uma das faunas mais ricas no mundo, classificadas dentro de 73 gêneros, reunidas em 9 famílias. Porém, apenas duas dessas famílias são conhecidas como peçonhentas (Viperidae e Elapidae). As serpentes chamadas de corais, do gênero *Micrurus*, são as representantes da família Elapidae nas Américas, enquanto a família Viperidae representa o grupo de serpentes com maior importância para a saúde pública, compreendendo os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (Figura 01) (ALVES, 2007; COSTA; BÉRNILS, 2014, 2015).

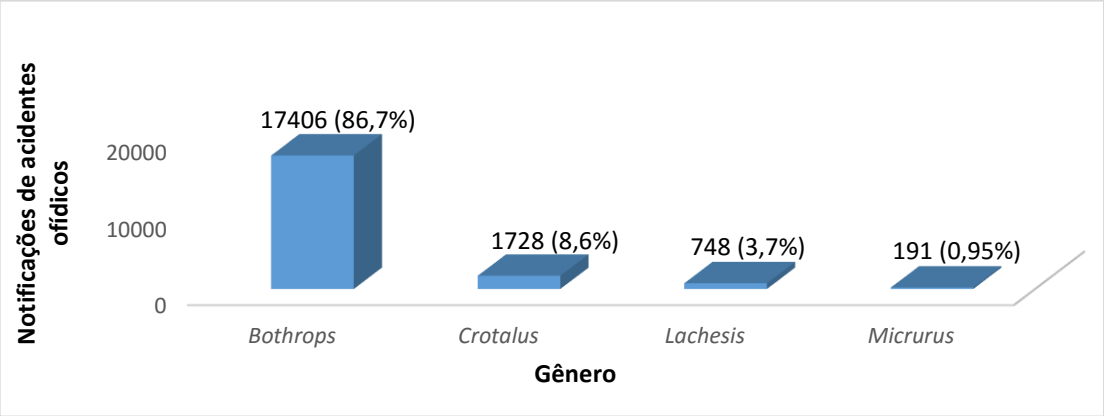
Os acidentes ofídicos são um problema de saúde pública no mundo, especialmente nas zonas rurais. Mundialmente, ocorrem cerca de 2,5 milhões de envenenamentos por serpentes a cada ano, consequentemente, 10% (250 mil) desses envenenados ficam com sequelas, e, pelo menos, 4% (100 mil)

entram em óbito. Com isso, em abril de 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu os acidentes causados por serpentes à lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (TAMBOURGI, 2010; WARRELL, 2010).

Além da grande extensão territorial e suas diferenças regionais de desenvolvimento, o Brasil também demonstra problemas quanto aos relatos dos acidentes ofídicos. Este fato faz com que haja uma necessidade de investimentos na preparação de pessoal especializado, bem como maior número de unidades de atendimento para fornecer um relato real da situação nacional dos acidentes ofídicos (LUCAS, 2009; SINITOX, 2009).

A maior parte dos acidentes ocorre nos meses mais quentes e chuvosos do ano (entre janeiro e maio). Cerca de 86,7% dos acidentes são atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops*, 8,6% ao gênero *Crotalus*, enquanto os gêneros de *Lachesis* e *Micrurus* representam valor inferior a 5% das ocorrências registradas pelo Ministério da Saúde no ano de 2014 (SAÚDE, 2014).

Figura 01 - Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil, segundo o gênero da serpente causadora do acidente (SAÚDE, 2014).



1.2 *Bothrops jararaca*

O gênero *Bothrops*, pertencente à família Viperidae, compreende cerca de 30 espécies que se distribuem por todo o território nacional. São animais que habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, com preferência a ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, e que tenham grande incidência de roedores, sua principal fonte de alimentação (CARDOSO, 2009). Esse gênero possui algumas das espécies mais importantes do ponto de vista clínico, apresentando o maior número de acidentes ofídicos no Brasil,

tendo sido responsável por 17.406 dos 20.073 acidentes ofídicos anuais registrados no Brasil em 2014 (SAÚDE, 2014).

As serpentes desse gênero podem ser identificadas através de algumas características importantes, como a cabeça em formato triangular e a dentição solenóglifa, ou seja, um par de dentes funcionais, inoculadores de venenos, extremamente grandes, ocos e agudos, que, em repouso, ficam em paralelo ao crânio do animal, mas que, no momento do bote, essas presas são movimentadas em até 90º (Figura 02). Outra característica importante é a presença da fosseta loreal, um órgão sensorial capaz de captar calor para detectar a presa cuja temperatura corporal seja superior à do ambiente. Além disso, a espécie *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) apresenta características morfológicas típicas, como manchas em formas triangulares distribuídas em ambos os lados do corpo, com coloração que podem variar do castanho claro até uma pigmentação quase preta. As fêmeas são relativamente maiores e mais robustas do que os machos, além de possuírem maior tamanho de cabeça (Figura 03). Habitando uma vasta área geográfica do Brasil, é a espécie mais comum em toda a Região Sudeste, sendo encontrada desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Figura 04) (CARDOSO, 2009; JANEIRO-CINQUINI; LEINZ; FIGUEIREDO, 1992; MORAES, 2008).

Figura 02 - Cabeça das serpentes do gênero *Bothrops*. Presas em repouso e preparadas para o bote (BRASIL, 2001).

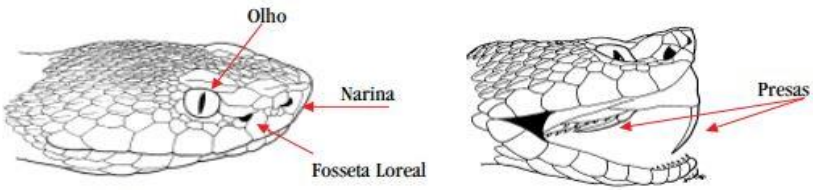
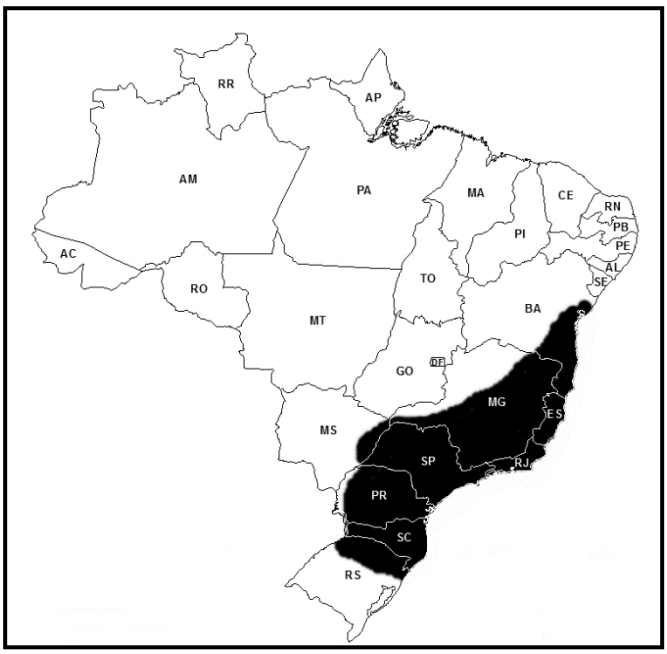


Figura 03 - Fêmea adulta de *B. jararaca* (Fonte: Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna).

Figura 04 - Distribuição geográfica da serpente *B. jararaca* no Brasil.



O tamanho médio da serpente *B. jararaca* é de 1 metro de comprimento, porém, espécimes de 1,5 metros já foram observados. Nascem no período entre fevereiro e março, medindo aproximadamente 20 cm, em ninhadas de 3 a 35 filhotes (Figura 05).

Figura 05 - Filhote de *B. jararaca* (Fonte: Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna).

Os indivíduos de *B. jararaca* apresentam mudanças ontogenéticas na sua dieta. Quando jovens e na natureza, alimentam-se principalmente de anfíbios anuros, em menor extensão de lagartos e, eventualmente, de pequenos roedores. Os indivíduos adultos alimentam-se principalmente de roedores, que podem ser desde camundongos até preás (BJARNASON; FOX,

1988; HARTMANN; HARTMANN; GIASSON, 2003; MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002).

1.3 Venenos

O veneno das serpentes desempenha um importante papel fisiológico, iniciando e auxiliando a digestão das presas, contribuindo para o mecanismo de defesa contra predadores e sendo responsável pelo domínio das presas (GANS; ELLIOTT, 1968; MACKESSY, 1993; THOMAS; POUGH, 1979). Contendo assim, componentes que agem sinergicamente para afetar processos vitais da presa, atuando no sistema nervoso, cardiovascular, locomotor e ainda na coagulação do sangue e na permeabilidade das membranas (KARLSSON; LEE, 1979).

Os venenos das serpentes peçonhentas são produzidos em glândulas especializadas, capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas. Acredita-se que a glândula de veneno tenha surgido há cerca de 200 milhões de anos na evolução dos Squamata, sendo fator principal da diversidade ecológica de serpentes e lagartos. Além disso, que a glândula de veneno nas serpentes represente uma modificação das glândulas salivares e o aparecimento e desenvolvimento de um aparato venenífero (FRY et al., 2006; KOCHVA; NAKAR; OVADIA, 1983; THOMAS; POUGH, 1979).

A família Viperidae abriga espécies que possuem um alto grau de especialização no aparato venenífero, caracterizado por modificações morfológicas importantes, como: uma musculatura cefálica bem desenvolvida, sobretudo, próxima às glândulas de veneno, além de dentes móveis e canaliculados, implantados na parte anterior do maxilar móvel, que permite a movimentação das presas para frente no momento do bote (GANS; ELLIOTT, 1968; KOCHVA, 1987; THOMAS; POUGH, 1979).

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* é conhecido pela sua complexidade, constituído principalmente por proteínas (aproximadamente 90% do seu peso seco), carboidratos (10 a 30%) e em pequenas proporções, lipídios, nucleotídeos, aminoácidos, peptídeos e componentes inorgânicos (DEVI, 1968; GOMES, 2006, 2008; IWANAGA; SUZUKI, 1979).

Uma grande variedade de enzimas está presente na composição dos venenos botrópicos, tais como, metaloproteinases (SVMP), fosfolipases A_2 (PLA_2), SVSP, L-aminoácido oxidases (LAAO), hialuronidases, enzimas ativadoras de fator X e protrombina, além de várias esterases, endopeptidases e fosfatases (AMARAL et al., 1991; IWANAGA; SUZUKI, 1979).

Embora a composição dos venenos botrópicos seja bem complexa e heterogênea, seus efeitos são característicos de ações proteolíticas, hemorrágicas e coagulantes, que são desencadeadas por componentes específicos do veneno, como as SVMP, desintegrinas, SVSP, lectinas tipo C e PLA_2.

1.3.1 Ação proteolítica

A ação proteolítica, ou necrosante, do veneno das serpentes é decorrente da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno. Podendo haver liponecrose, mionecrose e lise (quebra) das paredes vasculares. Nos acidentes botrópicos, acredita-se que as lesões locais possam acontecer de algumas maneiras, sendo essas devido, tanto às múltiplas ações biológicas de uma única toxina do veneno, quanto por efeitos combinados de duas ou mais toxinas ou mesmo devido aos efeitos sinérgicos das mesmas. De acordo com Selistre e colaboradores (1990), a patogênese das lesões locais pode ser atribuída, primariamente, às atividades de proteinases, PLA_2, fatores hemorrágicos e, secundariamente, à liberação de agentes vasoativos como bradicinina e histamina (MANDELBAUM; REICHL; ASSAKURA, 1988; OHSAKA, 1979; QUEIROZ et al., 1985; SELISTRE et al., 1990).

1.3.2 Alterações hemostáticas

Os venenos de diversas espécies de animais possuem toxinas que podem acarretar distúrbios hemostáticos à vítima de envenenamento. As toxinas presentes nos venenos animais podem ser classificadas de acordo com as suas ações sobre o mecanismo hemostático. Quando atuam na coagulação sanguínea, são toxinas coagulantes ou anticoagulantes, quando exercem ações diretas sobre as plaquetas, são toxinas agregantes ou antiagregantes plaquetárias, e quando causam lesões vasculares, são fatores hemorrágicos ou hemorraginas. O veneno botrópico produz mudanças no mecanismo hemostático e causa danos sobre os vasos sanguíneos, interferindo sobre as

funções plaquetárias e dos fatores de coagulação sanguínea, como protrombina (Fator II), Fator X e fibrinogênio (Fator I) (CARDOSO, 2009; KAMIGUTI et al., 1985; MARKLAND, 1998; ROODT; DOLAB; SEGRE, 1996; SMOLKA et al., 1998).

1.3.3 Ação hemorrágica

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* são importantes ferramentas na pesquisa científica para a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos, como a coagulação sanguínea, a fibrinólise, o sistema complemento, o processo inflamatório e as atividades hemorrágica e miotóxica (LUCAS, 2009).

Além dos fenômenos hemorrágicos locais, os venenos botrópicos são capazes de produzir hemorragias em vários tecidos e órgãos do organismo envenenado. As hemorraginas ou fatores hemorrágicos são responsáveis pelo sangramento local e sistêmico, sendo definidas como enzimas proteolíticas de alta especificidade pelo substrato. Segundo Queiroz e colaboradores (1985), as toxinas hemorrágicas atuam nos capilares, destruindo a membrana basal e facilitando a saída de hemácias íntegras pelas pequenas fendas endoteliais (MANDELBAUM; REICHL; ASSAKURA, 1988; OHSAKA, 1979; QUEIROZ et al., 1985; SELISTRE et al., 1990).

Estudos anteriores demostram que o veneno de *B. jararaca* tem efeito coagulante *in vitro*. No entanto, *in vivo*, sua atividade promove o consumo dos fatores da coagulação sanguínea, principalmente o fibrinogênio, e ativam o sistema fibrinolítico causando a incoagulabilidade sanguínea. Os distúrbios na coagulação sanguínea podem agravar as alterações hemorrágicas locais e sistêmicas (AMARAL et al., 1991; KAMIGUTI et al., 1985; RIBEIRO; JORGE, 1989).

1.4 Famílias de proteínas dos venenos dos viperídeos

1.4.1 Metaloproteinases

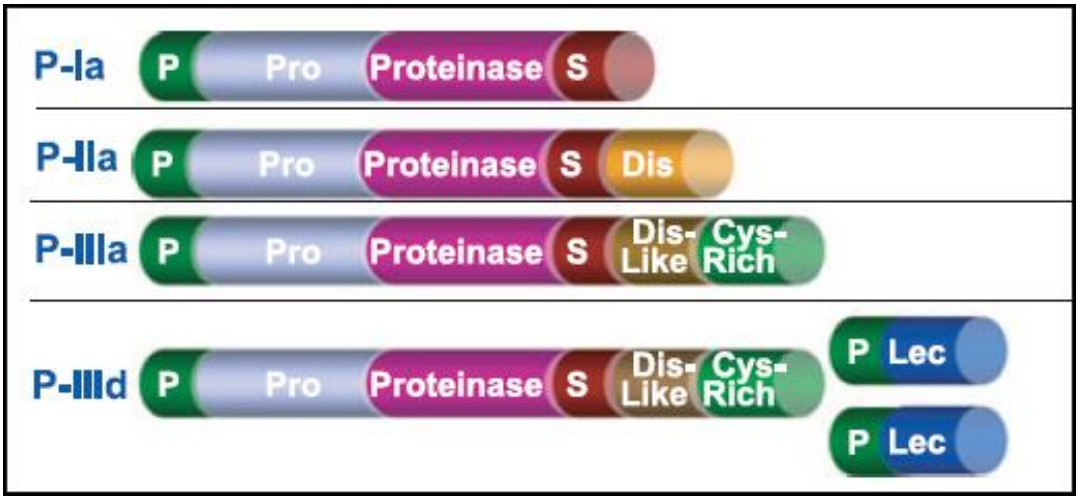
Os venenos dos viperídeos possuem em abundância as SVMP, que têm como principal característica a presença de íon inorgânico (geralmente o zinco) associado a uma sequência de aminoácidos, conhecida como motivo estrutural (BJARNASON; FOX, 1994; HITE et al., 1994; SERRANO; MAROUN, 2005).

Essas enzimas estão presentes em diversos processos decorrentes do envenenamento, como: degradação dos fatores da coagulação sanguínea, inibição da agregação plaquetária, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e atividade hemorrágica (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000b; GUTIÉRREZ et al., 2005; SERRANO; MAROUN, 2005).

Há algum tempo, as SVMP eram divididas em quatro classes. A **Classe P-I:** enzimas de massa molecular entre 20 a 30kDa, que apresentam apenas um domínio catalítico (protease); **Classe P-II:** enzimas de massa molecular de 30 a 50kDa que, além do domínio catalítico, apresentam um domínio de desintegrina. Nesta classe, geralmente, há uma autocatálise que leva ao processamento da SVMP P-II em uma P-I e uma desintegrina; **Classe P-III:** são enzimas que apresentam intensa atividade hemorrágica nos venenos. Estruturalmente apresentam um domínio catalítico, uma desintegrina e um rico em cisteínas. A massa molecular dessa classe de enzimas varia de 50 a 80kDa; **Classe P-IV:** essas SVMP são de alta massa molecular, de 80 a 100kDa, que apresentam os 3 domínios anteriores e dois domínios tipo-lectina ligados por pontes dissulfeto (BJARNASON; FOX, 1994; HITE et al., 1994; SERRANO; MAROUN, 2005).

Contudo, baseando-se nas características dos precursores das SVMP de venenos, assim como nos produtos gerados a partir desses precursores, após modificações pós-traducionais, durante o processo de síntese, foi proposta uma nova classificação, na qual a antiga classe P-IV foi incorporada à classe P-IIId, pois até o presente momento, nenhum precursor específico contendo todos os domínios presentes nessa proteinase (catalítico, tipo-desintegrina, rico em cisteína e tipo-lectina) foi descrito, assim indicando que as proteinases que apresentam essa estrutura são geradas por modificações pós-traducionais de um precursor da classe P-III (Figura 06) (FOX; SERRANO, 2008).

Figura 06 - Esquema de classificação das SVMP de venenos de serpentes (FOX; SERRANO, 2008).



1.4.2 Desintegrinas

O termo desintegrina ficou conhecido na década de 90, período em que tal termo foi utilizado, pela primeira vez, para denominar um grupo de peptídeos, provenientes dos venenos de serpentes da família Viperidae, com habilidade de inibir a agregação plaquetária. A maioria das desintegrinas interage com as integrinas, de maneira dose dependente, através de uma alça com a sequência arginina, glicina e ácido aspártico que “imita” a sequência RGD, presente em algumas moléculas que interagem com integrinas plaquetárias, exemplificando, o fibrinogênio, o qual apresenta um papel importante na interação do peptídeo com as integrinas. Estudos sustentam a hipótese de que as desintegrinas dos venenos das serpentes Viperidae são sintetizadas através da clivagem das SVMP P-II e P-III. Recentemente, a possibilidade de algumas desintegrinas serem codificadas por precursores sem domínio das SVMP, sendo liberadas diretamente como peptídeos no veneno, tem sido considerada (CALVETE et al., 2003; MARCINKIEWICZ et al., 1997; MCLANE et al., 2004; OKUDA; KOIKE; MORITA, 2002).

As desintegrinas são divididas em cinco grupos, baseados no número de aminoácidos e no número de pontes dissulfeto. Composto por pequenas desintegrinas, o primeiro grupo contém de 41-51 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto. O segundo grupo é formado por desintegrinas médias, com aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos e 6 pontes dissulfeto. Formado por desintegrinas grandes, o terceiro grupo contém 84 resíduos de

aminoácidos e 7 pontes dissulfeto. As SVMP P-III, com domínio disintegrina, possuem em torno de 100 resíduos de aminoácidos, sendo 16 resíduos de cisteína, e oito pontes dissulfeto, constituindo assim o quarto grupo. Finalmente, o quinto grupo que é composto por desintegrinas diméricas contendo subunidades de aproximadamente 67 resíduos de aminoácidos, sendo 10 cisteínas, e quatro pontes dissulfeto (Tabela 01) (CALVETE et al., 2003).

Tabela 01 - Classificação das desintegrinas de acordo com o tamanho (SUCCAR, 2012).

Grupo	**Nº de Aminoácidos**	**Nº de Pontes dissulfeto**
Pequenas	41-51	4
Médias	~70	6
Grandes	84	7
Metaloproteinases P-III	100	8
Diméricas	~67 (Cada subunidade)	4

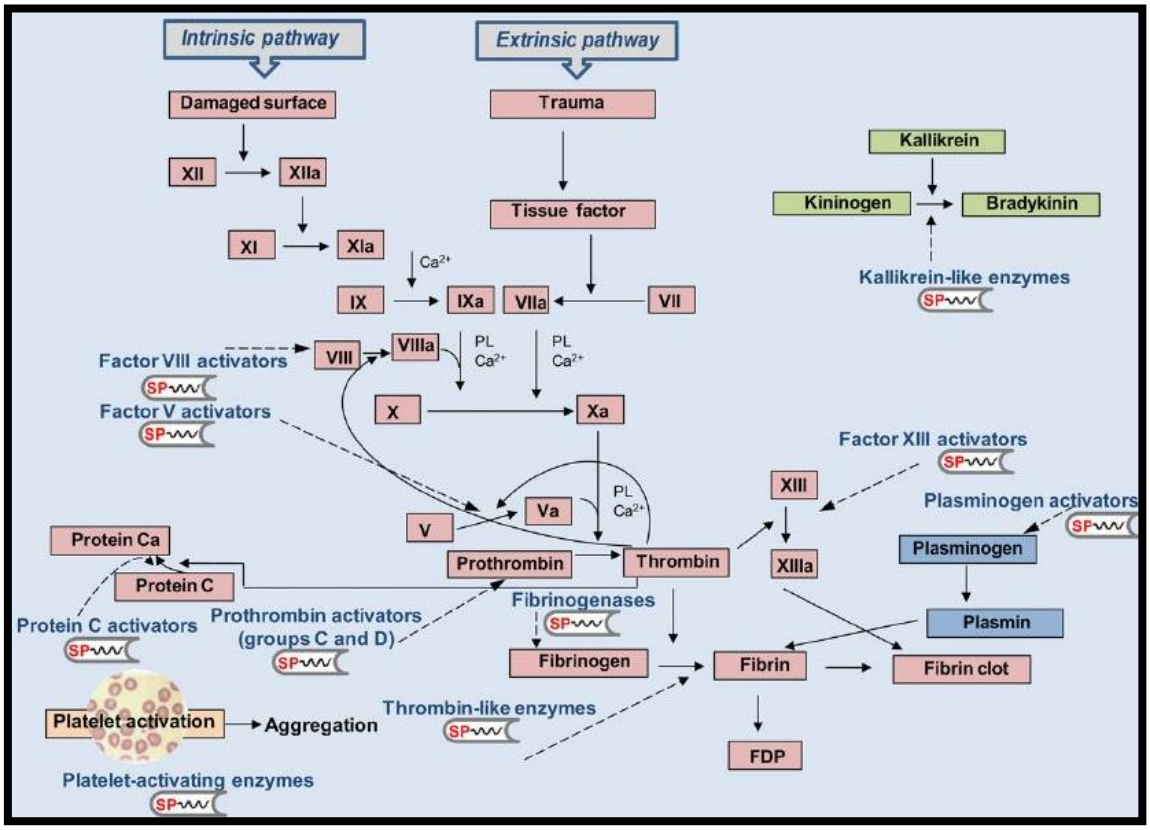
A literatura descreve uma série de desintegrinas em diversos organismos (GIEBELER; ZIGRINO, 2016), como por exemplo, as desintegrinas jarastatina e jararacina, que foram isoladas e identificadas do veneno da serpente de *B. jararaca* (SCARBOROUGH et al., 1993; WERMELINGER et al., 2009).

1.4.3 Serinoproteinases

As SVSP são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas utilizando mecanismos covalentes de catálise, através de um conjunto de três resíduos formados por histidina, ácido aspártico e serina (His, Asp e Ser). Esse grupo é bem definido pela organização desses resíduos em uma conformação espacial da proteína que gera um sítio catalítico muito bem caracterizado. As SVSP desempenham papel fundamental em diversos mecanismos nos seres vivos, como a digestão de proteínas da dieta alimentar (tripsina), participam da cascata de coagulação sanguínea e em algumas vias de sinalização para diferenciação e desenvolvimento celular. Elas são produzidas como zimogênios inativos e, por proteólise, fazem com que o sítio ativo adquira a conformação catalítica eficiente (PERONA; CRAIK, 1997; RIVERO, 2012).

As SVSP presentes nos venenos botrópicos são caracterizadas principalmente como enzimas com atividade do tipo trombina, e, de maneira geral, afetam a cascata da coagulação sanguínea pela ativação dos componentes sanguíneos envolvidos na coagulação sanguínea, na fibrinólise e na agregação plaquetária e também pela degradação proteolítica das células, causando um desequilíbrio no sistema hemostático da presa. De maneira resumida, a trombina libera os fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio convertendo-o em fibrina que, por sua vez, é estabilizada pelo fator XIII ativado. A trombina também intervém no processo hemostático, agindo como ativadora de componentes da cascata de coagulação, tais como, dos fatores V e VIII (Figura 07). Dependendo do teor de glicosilação, estas enzimas apresentam massas moleculares que podem variar de 26 a 67kDa (SERRANO, 2013).

Figura 07 - Esquema da cascata da coagulação sanguínea e os locais de ações das SVSP (SERRANO, 2013).



1.4.4 Lectinas do tipo C

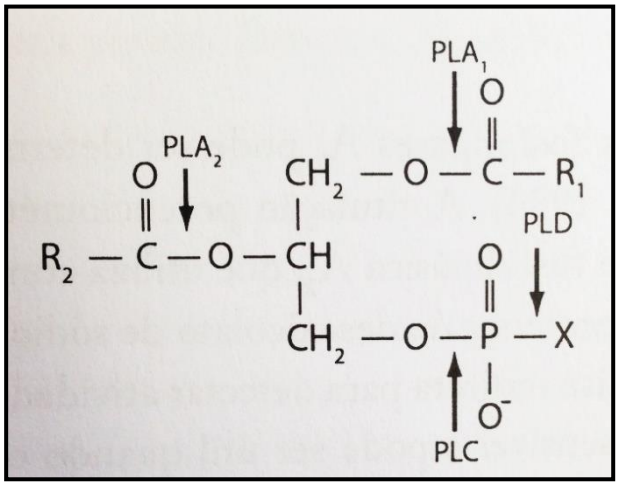
As lectinas do tipo C estão presentes em venenos de grande parte das famílias ofídicas. Algumas das lectinas de veneno são capazes de se ligar aos carboidratos. Porém, muitas outras parecem ter perdido essa propriedade e

são chamadas tipo lectinas, apenas por conservarem características estruturais em comum com as lectinas “verdadeiras”. Essas proteínas dependentes de cálcio são divididas em dois grupos, com o domínio completo (grupo I) e incompleto (grupo II) de reconhecimento de carboidratos. Possuem aproximadamente 130 aminoácidos por subunidade e massa molecular de cerca de 30kDa, podendo apresentar variáveis conteúdos de glicosilação. Em um mesmo veneno, o número de diferentes lectinas é grande e o número de subunidades é ainda maior. Essas moléculas podem ser encontradas em diversos venenos, como exemplos temos a botrocetina, proteína que faz a ligação de glicoproteínas com inibidores de trombina. As lectinas tipo C se ligam a uma ampla variedade de fatores da coagulação sanguínea, a outras proteínas importantes na hemostasia e aos receptores de plaquetas, o que evidencia fortemente que elas apresentam mais de um sítio de interação e que podem interagir com mais de um receptor/proteína (BARRETT; RAWLINGS, 1995; BRINKHOUS et al., 1983; CASTRO et al., 1998; CLEMETSON et al., 2002; DRICKAMER, 1988; JUNQUEIRA, 2005; ZINGALI et al., 1993).

1.4.5 Fosfolipases A_2 (PLA_2s)

As fosfolipases são proteínas importantes em uma série de atividades celulares, uma vez que hidrolisam fosfolipídeos de membrana gerando precursores de mensageiros como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e outros importantes mediadores de fenômenos fisiológicos envolvidos, principalmente, em processos inflamatórios. Dependendo do seu sítio de hidrólise na cadeia carbônica de fosfolipídeos, as fosfolipases são denominadas como: A_1, A_2 (PLA_2), B, C e D (Figura 08). Essas enzimas são responsáveis por diversos efeitos farmacológicos. Dentre as PLA_2s, há uma segunda divisão de classes, de acordo com a localização destas proteínas, que são PLA_2s citosólicas ou secretadas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KINI, 1997). As que estão presentes nos venenos de serpentes pertencem à segunda classe. Estas enzimas hidrolisam a cadeia carbônica dos fosfolipídeos na posição do carbono 2, liberando assim ácido graxos e lisofosfolípides.

Figura 08 - Sítios de ação das PLA_2s. R_1 e R_2 referem-se aos ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-2 dos fosfolipídios numerados estereoespecificamente, em que X se refere aos grupos polares, sendo os mais comuns: a colina, a etanolamina, a serina, o inositol e o glicerol.



As PLA_2s são particularmente abundantes nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops,* possuindo como atividades, além da função de hidrólise de fosfolipídio, efeitos cardiotóxico, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, inflamatório, miotóxico e neurotóxico. Estas atividades estão geralmente associadas ao fato delas afetarem a integridade da membrana plasmática das células e também a integridade de vasos e artérias. A atividade destas enzimas depende da presença de íons cálcio e está ligada à interação com grandes agregados lipídicos na presença de água, o que permite a difusão do substrato para o sítio ativo. Os venenos botrópicos apresentam isoformas de PLA_2 com atividade miotóxica. Algumas destas miotoxinas não apresentam atividade enzimática de PLA_2. Estudos feitos com fosfolipases miotóxicas demonstraram que, mesmo após a atividade fosfolipásica ter sido inibida, ocorriam danos musculares e citólise. Uma das hipóteses sugeridas para o mecanismo de ação das fosfolipases miotóxicas carentes de atividade enzimática é de que estas moléculas interajam com as membranas biológicas através de uma região molecular diferente do sítio catalítico. Esta região é formada provavelmente pela combinação de aminoácidos básicos e hidrofóbicos próximos da região C-terminal da proteína, permitindo interações eletrostáticas na bicamada lipídica (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KINI, 1997; LU et al., 2002; MOURA-DA-SILVA et al., 1991; OKA; ARITA, 1991; TOYAMA, 2004; VISHWANATH; KINI; GOWDA, 1987).

1.5 Envenenamento

1.5.1 Acidente Botrópico

Corresponde ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país e a taxa de letalidade é de cerca de 0,3% (SAÚDE, 2014).

Os envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por terem efeitos locais, como dor e edema no local da picada, geralmente logo após a picada. Além disso, equimoses (manchas na pele, produzidas geralmente por extravasamento de sangue) e sangramentos no ponto da picada são também frequentes. Em sequência, o enfartamento ganglionar e bolhas podem aparecer na evolução, acompanhados ou não de necrose, ou por manifestações sistêmicas, como sangramentos em ferimentos pré-existentes, hemorragias à distância como gengivorragias, hematêmese e hematúria (BRAZIL et al., 2001; JORGE; RIBEIRO, 1990; SCHOR; BOIM; SANTOS, 1997).

Nos acidentes causados por filhotes de *Bothrops* predominam as alterações na coagulação sanguínea; por outro lado, dor e edema locais podem estar ausentes (BRAZIL et al., 2001; JORGE, 1998; RIBEIRO; JORGE; IVERSSON, 1995; SCHOR; BOIM; SANTOS, 1997).

1.6 Produção de Soros Antiofídicos

Segundo a legislação vigente, Resolução nº 174 da secretaria de Vigilância Sanitária, de 11 de novembro de 1996, o Soro antiofídico é definido como:

"Uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equídeos hiperimunizados, contra o veneno da serpente a que se refere" (CARLINI, 1996).

Por serem medicamentos, os soros antiofídicos estão inclusos na legislação relacionada aos produtos farmacêuticos. Por exemplo, a sua produção é regulamentada pela mesma Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aplicada aos medicamentos – Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº210, de 04 de agosto de 2003. Essa resolução dita as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Como a produção dos soros antiofídicos envolvem a utilização de material biológico, intrinsecamente

variável, o cumprimento das BPF na produção dos soros é ainda mais crítica quando comparada a outros produtos farmacêuticos (HENRIQUES, 2003). A diversidade dos venenos não se resume apenas às diferenças entre as espécies, mas também aos indivíduos da mesma espécie. Além disso, a idade dos animais e os fatores ambientais podem acarretar diferenças na composição dos seus venenos. Por esse motivo, para a imunização dos animais produtores de soro é necessário preparar misturas de venenos de vários exemplares diferentes da mesma espécie de serpente, para que a mistura resultante apresente ampla variabilidade quanto à composição de toxinas. Desta forma, o soro produzido poderá proteger melhor a vítima do acidente (GUTIÉRREZ et al., 1991; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002; ZAMUNÉR et al., 2004). Para a produção do soro específico de um gênero, além de misturar venenos de vários indivíduos da mesma espécie, é necessário misturar venenos das diferentes espécies (Tabela 02) (DA SILVA, 2008).

Tabela 02 - Composição de antígenos utilizados na produção de soros no Brasil (BRASIL, 1996).

Soros	**Espécies presentes no Brasil**
Antibotrópico (SAB)	*Bothrops jararaca* (50%) *Bothrops jararacussu* (12,5%) *Bothrops alternatus* (12,5%) *Bothrops moojeni* (12,5%) *Bothrops neuwiedi* (12,5%)
Anticrotálico (SAC)	*Crotalus durissus terrificus* (50%) *Crotalus durissus collilineatus* (50%)
Antielapídico (SAE)	*Micrurus frontalis* (50%) *Micrurus coralinus* (50%)
Antilaquético (SAL)	*Lachesis muta*

Uma etapa preliminar ao preparo do imunizante é o controle do veneno que é titulado para certificar seu efeito tóxico. A dose letal (DL_{50}), deve ser determinada, para garantir que o soro produzido a partir da imunização com esse material tenha um bom efeito protetor (CARLINI, 1996).

1.7 Fabricação e distribuição dos soros antiofídicos no Brasil

O Governo Federal é responsável pela produção e distribuição dos soros antiofídicos para o uso humano no Brasil. Esses dois aspectos do mercado dos soros antiofídicos passaram a ser administrados pela esfera federal na década de oitenta, depois de uma situação de desabastecimento que ficou conhecida como a “crise do soro” (DA SILVA, 2008).

Desde que o Programa Nacional de Imunizações (PNI) foi implementado pelo Ministério da Saúde em 1973, para o controle de doenças imunopreveníveis, estava previsto a montagem de um laboratório nacional para a avaliação da qualidade das vacinas utilizadas nas campanhas de imunização.

Em 1980, com a descoberta da contaminação de vacinas importadas da Iugoslávia por fungos, essa necessidade se tornou ainda mais clara, pois devido a isso, houve um atraso nos programas de vacinação que mobilizou a opinião pública (PONTE, 2003).

Nessa mesma época, estava se consolidando a transferência do antigo Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) para a Fundação Oswaldo Cruz. Passando a ser chamado de Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS), e devido à contaminação das vacinas importadas, foi decidido que o INCQS analisaria as vacinas utilizadas pelo PNI (GADELHA, 1996; GEMAL; LEAL, 2005).

Em 1983 o INCQS reprovou alguns lotes da vacina tríplice bacteriana produzida pela empresa de capital estrangeiro *Synthex*, com filial em São Paulo, resultando em uma inspeção na empresa pela vigilância sanitária, na qual constatou-se que a planta de produção tinha várias deficiências. Para retornar à produção, foram feitas exigências a serem cumpridas pela empresa, que decidiu que era melhor encerrar suas atividades no Brasil (PONTE, 2003).

Na época, a *Synthex* do Brasil era a principal empresa fornecedora de vacina tríplice bacteriana e de soros antiofídicos. E o encerramento das atividades da companhia acarretou o desabastecimento de soros antiofídicos em 1985.

Nesse contexto, foi formulado o Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos (PASNI), em 1985. A ideia básica era estabelecer uma ação coordenada entre os produtores nacionais, estimulando os investimentos e a melhoria da qualidade da produção local, de sorte a se atingir a autossuficiência nos produtos vinculados aos programas de saúde. A partir da estimativa das necessidades dos programas de imunização, desenhou-se uma estratégia de substituição progressiva das importações e de expansão articulada dos sete laboratórios oficiais: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Biomanguinhos/Fiocruz-RJ), Instituto Butantan (IB-SP), Instituto Vital Brazil (IVB-RJ), Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar-PR), Fundação Ezequiel Dias (Funed-MG), Fundação Ataulfo de Paiva (FAP-RJ) e Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB-RS) (GADELHA, 1996).

Atualmente, no país, quatro laboratórios são responsáveis pela produção dos soros antiofídicos, que são o IB- SP, a Funed- MG, o IVB – RJ e o Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI – PR).

1.8 Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos

Os medicamentos biológicos apresentam uma variabilidade intrínseca, o que requer, na maioria das vezes, controles de qualidade diferentes dos aplicados aos medicamentos sintéticos, tais quais os ensaios de potência, o qual mede-se o efeito farmacológico do produto, para medir sua qualidade. Por se tratar de um medicamento de origem biológica, a normatização para o controle de qualidade desse deve ser muito rígida (BURNOUF et al., 2004; DA SILVA, 2008).

A grande maioria dos acidentes ofídicos registrados ocorrem em áreas tropicais e subtropicais do planeta, principalmente em países com o sistema de saúde precários (SANTOS, 2005).

Ciente do problema relacionado à precariedade do sistema de saúde nos principais países nos quais se têm registros de acidentes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) – *World Health Organization* (WHO), gerou em 1973 um informe técnico em que se refere as recomendações para a produção e o controle de qualidade de soros antiofídicos (DA SILVA, 2008).

A OMS realizou eventos para a discussão de problemas ligados ao acesso, produção e distribuição de soros em escala mundial e regional da América Latina. Nesses eventos, o tema qualidade sempre foi discutido, principalmente como os processos de produção influenciam no efeito neutralizador sobre o veneno e na segurança do produto (GUTIÉRREZ et al., 2007; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003; WHO, 2007).

As farmacopeias e os órgãos regulamentadores de alguns países também se preocupam em estabelecer suas próprias normatizações para a produção e o controle de qualidade dos soros antiofídicos.

No Brasil, a legislação que trata tal assunto é a Portaria nº174, de 11 de novembro de 1996, que define desde a produção ao estabelecimento de parâmetros que medem a qualidade dos soros antiofídicos, detalhando os ensaios a serem realizados e um protocolo de produção mínimo para cada lote de produto fabricado.

Outra regulamentação importante para o soro antiofídico no Brasil é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA nº315, de 26 de outubro de 2005, a qual regulamenta o registro de produtos biológicos, incluindo os soros antiofídicos, que são denominados de soros hiperimunes, que tem como definição "...imunoglobulinas específicas, de origem heteróloga, purificadas... capazes de neutralizar seus antígenos específicos" (DA SILVA, 2008).

Algumas farmacopeias regulamentam os parâmetros mínimos de qualidade que os soros antiofídicos deverão seguir, recomendando ensaios, com metodologias específicas e os limites que deverão ser adotados. Os ensaios para o controle de qualidade dos soros podem ser divididos em dois grupos, ensaios gerais e específicos.

Os ensaios gerais são aplicados para as formas farmacêuticas líquidas, para usos injetáveis, nas quais estão incluídos os soros. São ensaios como medidas de pH, volume médio, teor de conservantes, teor de isotonizantes, esterilidade e pirogênio. As únicas diferenças observadas nesses testes realizados para os soros antiofídicos, em relação aos demais produtos farmacêuticos, estão justamente nas especificações para os limites de pirogênio, pH, teor de conservantes e isotonizantes.

O ensaio específico para os soros antiofídicos tem como principal objetivo a avaliação da sua potência, que testa a capacidade do soro de proteger animais frente a um veneno de referência (SELLS, 2003).

A IV Edição da Farmacopeia Brasileira, publicada em 2000 recomenda um ensaio de potência, baseado na capacidade de neutralização do soro sobre o efeito do veneno. A expressão dessa capacidade deve ser feita em relação à massa de veneno, não em relação a dose letal (DL_{50}) do veneno, para minimizar o efeito da variabilidade dos venenos sobre o ensaio, a padronização deverá ser feita sobre um veneno de referência nacional (DA SILVA, 2008; "Farmacopéia Brasileira", 2000).

1.9 Veneno Botrópico de Referência Nacional

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, os Venenos de Referência são definidos como:

"Uma mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica das espécies Bothrops jararaca ou Crotalus durissus terrificus. Devem ser liofilizados e mantidos a –20 ºC. Os venenos foram padronizados pela determinação da dose Letal 50%" ("Farmacopéia Brasileira", 2000).

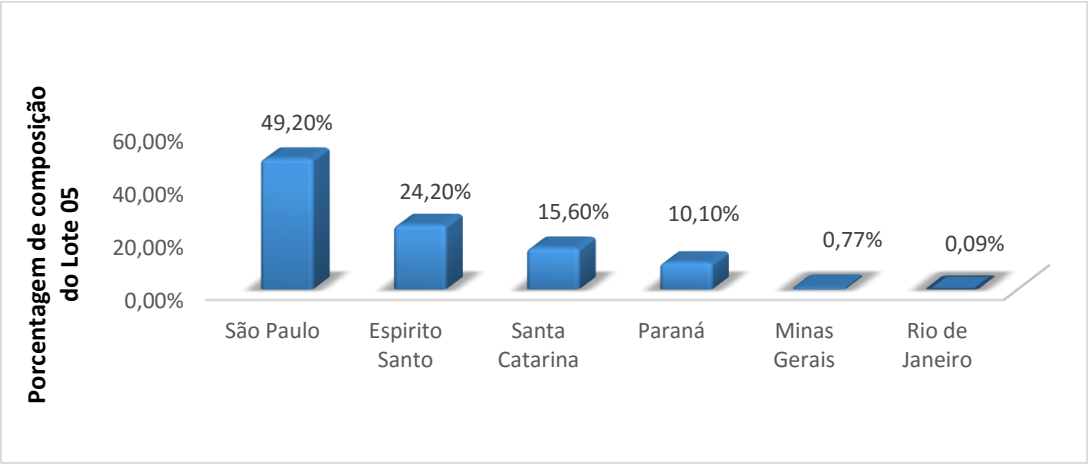
Como mencionado anteriormente, os venenos das serpentes apresentam uma grande heterogeneidade, tanto para indivíduos de uma mesma espécie, como de acordo com a sazonalidade, as variações ontogenéticas e o sexo. Assim, desde 1955 a Organização Mundial de Saúde – *World Health Organization* (*WHO)* vem buscando parâmetros para estabelecer a padronização biológica para a obtenção dos venenos e dos seus respectivos antivenenos, seguindo padrões internacionais de referência (FURTADO; COLLETTO; SILVA, 1991; FURTADO et al., 1991; RIBEIRO; JORGE, 1989; WHO, 1955; ZELANIS; TRAVAGLIA-CARDOSO; FURTADO, 2008).

Na década de 80, o Ministério da Saúde estimulou o aumento da produção do soro antiofídico no Brasil, tornando-se clara a necessidade da utilização de venenos de referência ao nível nacional, assim como a padronização dos métodos de ensaios das atividades biológicas dos venenos das serpentes brasileiras, para assegurar a uniformidade dos soros antiofídicos. Então, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) definiu que

somente a primeira extração de veneno das serpentes *B. jararaca* recém-chegadas da natureza seriam utilizadas para a composição do Veneno Botrópico de Referência Nacional (VBRN).

Definiu-se então que o Instituto Butantan seria responsável pela produção do VBRN, cuja potência seria determinada exclusivamente pelo INCQS, responsável também pelo seu armazenamento e distribuição. Assim, foram produzidos 5 lotes até o momento. O lote nº 05 do VBRN (BRA/BOT/005) foi obtido pela extração do veneno de 4.430 espécimes de serpentes *B. jararaca* oriundas da natureza e provenientes dos estados de São Paulo (49,2%), Espírito Santo (24,2%), Santa Catarina (15,6%), Paraná (10,1%), Minas Gerais (0,77%) e Rio de Janeiro (0,09%) (Figura 09).

Figura 09 - Distribuição geográfica dos venenos que compõem o BRA/BOT/005.



Desde esse período, o INCQS e os laboratórios brasileiros produtores de Soro Antibotrópico passaram a utilizar o VBRN nas determinações de potência dos antivenenos botrópicos produzidos, visando minimizar as diferenças interlaboratoriais desse produto.

Segundo a OMS, os animais que chegam da natureza devem ser colocados em quarentena, por pelo menos dois meses, em uma sala reservada somente para essa finalidade.

No Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan os animais que chegam da natureza passam por uma triagem para verificar sua procedência. Em seguida, o animal passa por uma análise clínica, sendo também determinados os dados de biometria. Recebe ainda um banho de imersão em

triclorfon 0,2% (Figura 10A), para combater ectoparasitas, e vermifugação contra diferentes nematódeos (Figura 10B). Após esses procedimentos, a serpente segue para o primeiro período de quarentena (Figura 11), no qual o animal é observado diariamente, regularmente alimentado, e, após os primeiros 15 dias, recebe mais uma dose de vermífugo. Por receber semanalmente novas serpentes, houve a necessidade de criar uma segunda quarentena, na qual o animal aparentemente saudável e regularmente alimentado é transferido para outra sala de quarentena, em que também é observado diariamente por mais 30 dias. Essa segunda quarentena funciona no sistema *all in, all out*, no qual todos os animais entram juntos e saem juntos dessa sala. Finalmente, ele é liberado para a sala em que será mantido.

Figura 10 - (A): Banho de triclorfon 0,2%; **(B):** tratamento com vermifugação (Fonte: Dra. Kathleen Fernandes Grego)

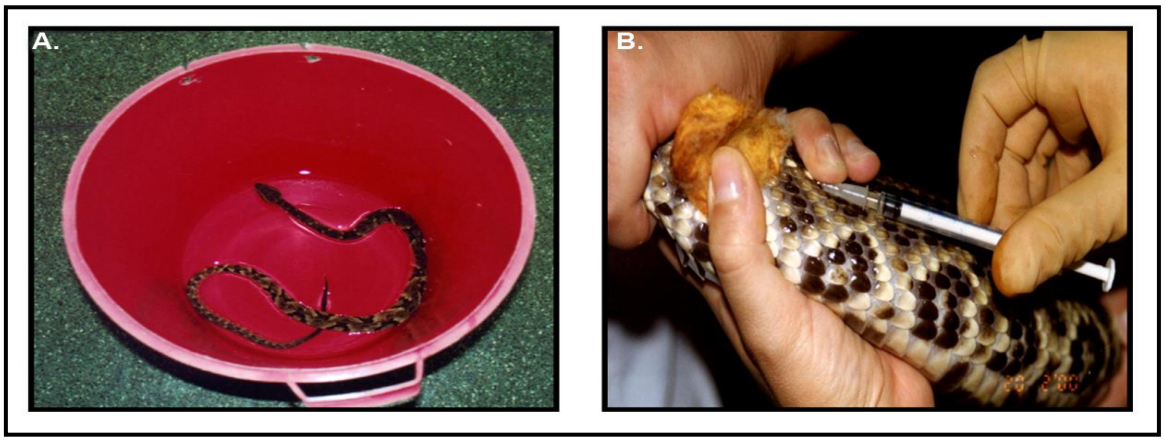


Figura 11 - Sala da quarentena de *B. jararaca* (Fonte: Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna).

1.10 Serpentes nascidas e mantidas em cativeiro

As serpentes que nascem em cativeiro (plantel) são mantidas em um berçário (Figura 12A) até o terceiro ano de vida, com condições de temperatura controlada, em torno de 20-27 ºC, e de umidade por volta de 60%, tendo livre disposição de água e alimentadas quinzenalmente. Após esse período, no qual elas entram na fase de maturidade sexual, são então transferidas para a sala das serpentes adultas (produção de venenos) (Figura 12B), cujas condições são semelhantes às do berçário, porém, sendo alimentadas mensalmente. No Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, as extrações de veneno são realizadas mensalmente e esses venenos são mantidos em -20ºC após serem centrifugados. Semestralmente, os venenos são reunidos e liofilizados, para a manutenção da sua atividade e armazenados a -20 ºC.

Figura 12 - (A): Sala berçário; **(B):** Sala da produção de venenos (Foto: Dra. Kathleen F. Grego).

Anualmente, tem sido observada uma diminuição gradativa na recepção das serpentes oriundas da natureza pelo Instituto Butantan (Figura 13), além de uma distribuição geográfica reduzida (Figura 14), o que acarreta em uma menor quantidade e variabilidade de venenos para a composição do VBRN. Contudo, o Laboratório de Herpetologia possui um bom acervo de serpentes na sala de produção de venenos. A origem desses animais, ou de seus progenitores, abrange a maior parte dos estados de ocorrência dessas espécies. Assim, este projeto visa estudar o veneno das serpentes *B. jararaca* do plantel do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, para avaliar suas características bioquímicas e suas atividades biológicas, assim como compará-las com a composição do VBRN. Desta forma, pretende-se também

verificar a viabilidade de inclusão do veneno das serpentes do plantel ao VBRN.

Figura 13 - Número de serpentes *B. jararaca* doadas anualmente ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan no período entre 2003 e 2013 (Fonte: Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna).

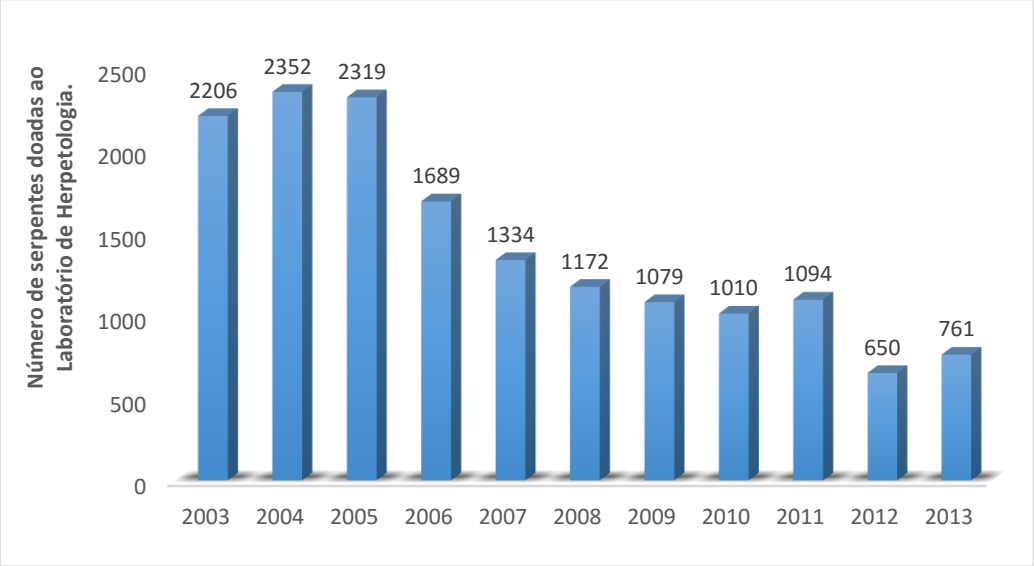
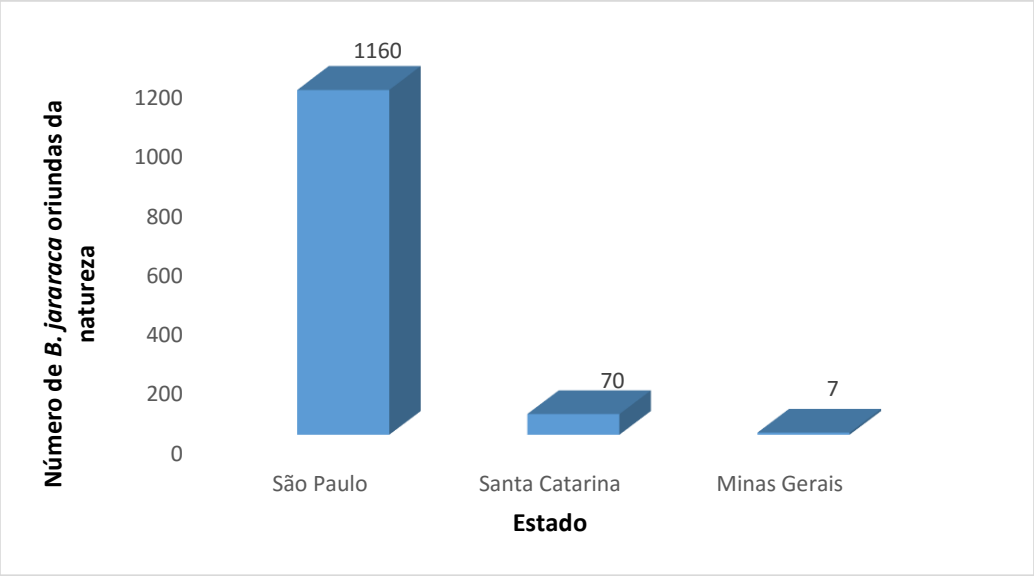


Figura 14 - Distribuição geográfica das serpentes *B. jararaca* oriundas da natureza entre 04/2012 e 01/2014 (Fonte: Dr. Sávio S. Sant'Anna).



2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar bioquímica e biologicamente os venenos das serpentes *B. jararaca* do plantel do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e o VBRN, para verificar a possibilidade de incorporação dos venenos dos animais do plantel na preparação do VBRN.

3. METODOLOGIA

3.1 Venenos

No período de extração do veneno dos animais do plantel, o Laboratório de Herpetologia dispunha de um acervo de 119 serpentes *B. jararaca*, sendo 50 animais jovens (recém-nascidas a 3 anos) e 69 serpentes adultas. Assim, os venenos foram extraídos de 71 animais entre, jovens e adultos, machos e fêmeas e de diferentes regiões do Brasil (Figuras 15 e 16), previamente anestesiados com gás carbônico, mantidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Após a extração, os venenos foram centrifugados por 15 min a 1700 g, aliquotados em 200 µL e liofilizados. Os venenos foram mantidos a -20 ºC até o momento do uso.

Figura 15 - Distribuição geográfica da origem dos progenitores das serpentes produtoras do veneno do plantel.

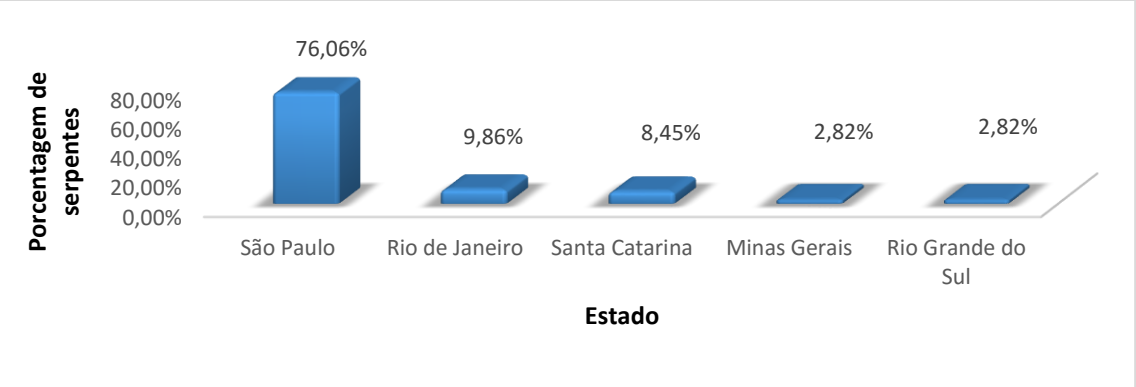
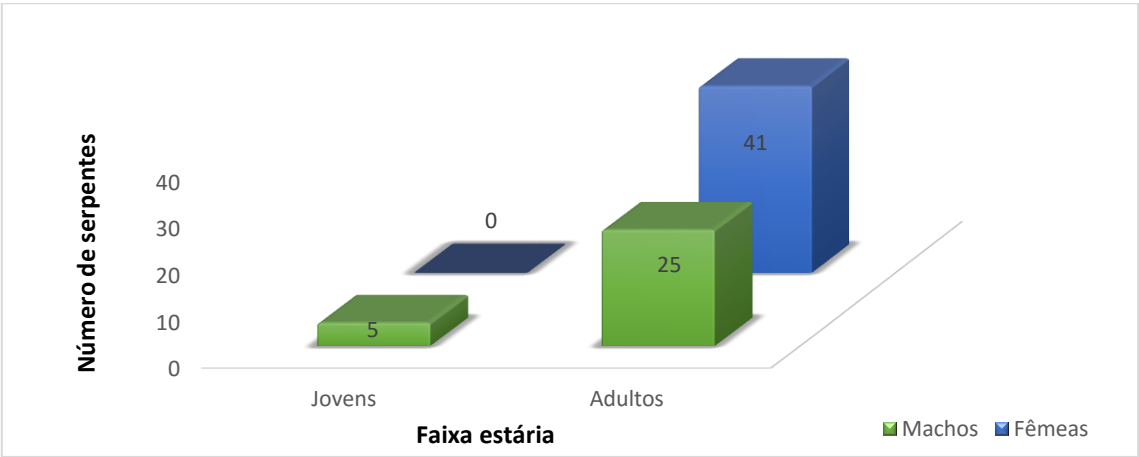


Figura 16 - Proporção entre o sexo e a faixa etária das serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan utilizadas na composição do veneno de *B. jararaca* do plantel.



O VBRN foi produzido e doado pelo Instituto Butantan. O lote nº 05 do VBRN–BRA/BOT/05, é um *pool* de veneno de 4430 extrações da espécie *B. jararaca*, liofilizado e estocado a – 20 °C.

Foi feito ainda um *pool* com quantidades iguais dos venenos do plantel e do VBRN para a realização de alguns testes.

3.2 Camundongos

Os animais utilizados para os testes *in vivo* foram camundongos *Swiss*, machos, pesando entre 18 e 22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (1008/13 CEUAIB).

3.3 Dosagem proteica

A quantidade de proteínas presente nos venenos foi mensurada seguindo dois métodos de dosagem proteica, por A_{280nm} (A_{280}) e a dosagem por ácido bicinconínico (BCA).

O método A_{280} consiste na leitura do comprimento de ondas na qual lê-se os anéis aromáticos do triptofano, da fenilalanina e tirosina (STOSCHECK, 1990).

Os venenos foram pesados e diluídos para uma concentração final de 1 mg/mL em solução NaCl 0,85%. Os mesmos foram homogeneizados e mantidos em banho de gelo até a sua utilização. Em uma microplaca, foram pipetados 200 µL de cada veneno diluído, em triplicata. Como branco, foram utilizados 200 µL de solução NaCl 0,85%.

O método proposto por Smith e colaboradores (1985) é baseado na reação de Cu^{2+} que é reduzido a Cu^{+}, na presença de proteínas, em meio alcalino, formando um complexo com o BCA, que absorve fortemente na região de A_{570}. Os venenos foram diluídos em solução NaCl 0,85% para a concentração final de 1 mg/mL.

Foi feita uma mistura reativa composta por BCA (Sigma) com sulfato de cobre 4% (Sigma). Foram pipetados 10 µL das amostras de venenos em microplaca e acrescentaram-se 200 µL da mistura reativa. O teste foi feito em

triplicata. A placa foi colocada no micro-ondas por 25 segundos e, em seguida, realizou-se a leitura de A_{570nm} em leitor de placas (Epoch - BioTek). A quantidade de proteínas foi determinada com base em uma curva padrão de albumina bovina, de 1 mg/mL – 0,015 mg/mL (Sigma).

3.4 SDS-PAGE

O SDS-PAGE é um método amplamente utilizado em avaliações quantitativas e qualitativas de amostras proteicas. Com a migração das proteínas presentes nos venenos pode-se identificar a massa molecular destas. Trinta µg de amostras de venenos, diluídas em solução NaCl 0,85%, na concentração de 1 mg/mL, foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12%, na presença de tampões com ou sem β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 100 ^{o}C por 7 min e concomitantemente às amostras foi utilizado também um padrão de massa molecular (High-range - Bio-Rad). Os géis foram submetidos à amperagem constante de 20 mA. Após a corrida, as proteínas foram coradas com Coomassie blue R-250 e descorados com etanol 10% e ácido acético 7% (LAEMMLI, 1970).

3.5 Gel bidimensional

O gel bidimensional foi a metodologia utilizada para a análise das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) e sua massa molecular (O'FARRELL, 1975).

Para a hidratação dos *strips* (7 cm, pH 3-10) (GE Healthcare), as amostras de cada veneno na concentração de 60 µg foram misturadas a 65 µL de DeStreak (GE Healthcare) e 1,12 µL de IPG buffer linear (GE Healthcare), para então submeter os *strips* à reidratação em IPGbox (GE Healthcare) por 16 horas em temperatura ambiente.

A focalização isoelétrica foi realizada no equipamento PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) com o seguinte programa: 1º *step* – 100 v por 4 horas; 2º *step* – 300 v por 2 horas; 3º gradiente – 1000 v em 300 v/hora; 4º gradiente – 5000 v em 4000 v/hora; 5º *step* – 5000 v por 1250 v/hora; 6º *step* – 100 v por 24 horas.

Antes de ser aplicada à segunda dimensão, os s*trips* foram equilibrados em solução de equilíbrio (tris-HCl 50 mM pH 8,8, ureia 6M, glicerol 30%, dodecil

sulfato de sódio 2% (SDS) e azul de bromofenol 0,001%), contendo ditiotreiol (DTT) 0,26 mM, sob agitação por 15 min. Após esse período, os *strips* foram, mais uma vez, equilibrados com solução de equilíbrio, contendo iodocetamida (IAA) 0,54 mM, por mais 15 min. Os *strips* foram colocados sobre o gel de poliacrilamida 12% polimerizado, juntamente com o padrão de massa molecular (High-range - Bio-Rad). Posteriormente os géis foram corados com *Coomassie blue G.*

3.6 Cromatografia líquida de fase reversa

A cromatografia foi realizada segundo Calvete e colaboradores (2011) e De Queiroz e colaboradores (2014), com algumas modificações. Um mg de veneno foi pesado e dissolvido em 150 µL de acetonitrila 5%, contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (solução A). A amostra foi então centrifugada a 10.621 g por 10 min. Em seguida, 100 µL do sobrenadante (666 µg de proteínas) foi aplicado em coluna C18 (5 µm 25 cm x 0,4 cm) (Teknokroma Europa Protein 300), previamente equilibrada com a solução A, em um fluxo de 0,5 mL/min. Foram feitos dois passos de gradientes de solução B (acetonitrila 95%, contendo, TFA 0,1%), de 0 a 75% em 144 min e de 75 a 100% em 40 min. As frações foram coletadas em 1 mL/tubo. A cromatografia foi acompanhada por leitura de absorbância em 215 nm.

3.7 Atividade de PLA_2

O método utilizado para a mensuração da atividade de PLA_2, descrito por Holzer e Mackessy (1996), tem como princípio a liberação de um produto cromogênico a partir da clivagem do substrato 4-*nitro-3-(octanoloxy) benzoic acid* (NOBA) na presença de fosfolipases.

Em microplacas, foram pipetados 20 µL de água deionizada, 20 µL de NOBA em uma concentração final de 3 mM em acetonitrila, 200µL de tampão (tris-HCL 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 100 mM em pH 8,0) e 20 µL dos venenos de *B. jararaca* na concentração final de 1 mg/mL. Como controle foi utilizado 40 µL de água deionizada, 20 µL de NOBA e 200 µL de tampão. A placa foi incubada por 20 min a 37 ºC e então foi realizada a leitura em A_{425}. Cada amostra foi analisada em triplicata. De acordo com Holzer e Mackessy (1996),

0,1 unidade de absorbância em A_{425nm} é equivalente a liberação de 25,8 nmoles de cromóforo.

Assim, a atividade PLA_2 foi expressa em unidades por miligrama de veneno, calculado através da fórmula: nMoles de produto (A_{425} Veneno*25,8 nmoles/ 0,1 U)/ 20 min/ 0,02 (mg veneno) e foi expressa como nM/min/mg de veneno.

$$PLA2 = \frac{\text{nMoles prod.}}{\text{t / mg veneno}}$$

3.8 Atividade de LAAO

Para essa atividade, foram feitas diluições seriadas dos venenos (0,31-20 µg), diluídos em NaCl 0,85%. Adicionalmente, às diluições foram acrescentadas a solução reativa (tris-HCL 50 mM em pH 8,0, 250 mM de L-metionina, 2 mM de *o-phenylenediamine* (OPD) e 0,8 U/mL de peroxidase de rábano). A curva padrão foi feita com várias concentrações de peróxido de hidrogênio (248 – 15800 µM), que foram misturadas a solução reativa (tris-HCL 50 mM pH 8,0, 2 mM de OPD e 0,8 U/mL de peroxidase de rábano).

A placa foi incubada por 60 min a 37 ºC e então foi realizada a leitura em A_{492nm}. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Assim, a atividade de LAAO foi expressa em µMols de peróxido por µg de veneno por minuto (CULMA et al., 2014).

3.9 Atividade caseinolítica

Esse método foi realizado com a utilização de caseína como substrato para quantificar a ação proteolítica dos venenos. Os venenos foram pesados e diluídos no tampão (tris- HCL 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, pH 8,8), na concentração de 1 mg/mL. A caseína dimetilada 2% foi preparada no mesmo tampão. O teste da atividade foi feito em triplicata. Dez µL das amostras de veneno foram adicionados a 490 µL do tampão e 500 µL de caseína. Como controle, foi utilizado 500 µL de caseína em 500 µL do mesmo tampão. Todas as amostras foram incubadas a 37 ºC por 30 min. Após esse intervalo, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% às amostras, as quais em seguida foram

centrifugadas por 15 min a temperatura de 4 ºC a 1400 g. A leitura A_{280nm} dos sobrenadantes foi mensurado no leitor de placas (Epoch – BioTek) (ANTUNES et al., 2010; MENEZES et al., 2006).

De acordo com Antunes e colaboradores (2010) uma unidade de atividade proteolítica sobre a caseína por minuto corresponde à mudança de 0,005 na absorbância e foi expressa como U/min/mg.

3.10 Zimografia

A zimografia é uma técnica na qual as proteínas são separadas por SDS-PAGE contendo determinados substratos (por exemplo, caseína ou gelatina). Com a finalidade de identificar as massas moleculares das proteínas de veneno com atividade proteásica, realizou-se a zimografia das amostras. Nesse experimento, baseado no grupo de Kwon (2013) com algumas modificações, os venenos foram pesados e diluídos em NaCl 0,85% na concentração de 1 mg/mL. A gelatina ou a caseína (2 mg/mL) foi utilizada como substrato dos géis. Trinta µg de cada veneno contendo tampão de amostra (tris 124,6 mM, glicerol 20%, SDS 138,7 mM, 20% azul de bromofenol 1%) sem β-mercaptoetanol foi aplicado em cada canaleta. Após a corrida, os géis foram lavados duas vezes por 15 min com triton X - 100 2,5%, foram enxaguados com água deionizada e incubados com o tampão (tris-HCl 30 mM, $NaCl_2$ 200 mM, NaN_3 0,02% em pH 7,4), durante 18 horas a 37 ºC. Os géis foram então submetidos à coloração por Coomassie Blue R-250 e descorados com a solução de etanol 10% e ácido acético 7%.

3.11 DMC

A DMC é definida como a menor quantidade de veneno (em mg) que coagula uma solução de fibrinogênio bovino (DMC-F) ou uma solução padronizada de plasma citratado (DMC-P) em 60 segundos a 37 ºC, em 60 segundos (THEAKSTON; REID, 1983).

Foram feitas diluições seriadas dos venenos em solução de NaCl 0,85%. A trombina bovina (5 U) (Roche) foi utilizada como controle positivo nesse teste. Para medir a DMC, foram incubados 200 µL do fibrinogênio (2 mg/mL) ou do plasma humano por um minuto a 37 ºC, após esse tempo de incubação, foi

adicionado 100 µL das diluições dos venenos. O tempo de coagulação foi cronometrado imediatamente após a adição da solução de veneno utilizando um coagulômetro (Drake).

Assim, a DMC foi calculada através da determinação da concentração de veneno que coagulou o fibrinogênio ou plasma em 60 segundos.

3.12 DMH

A DMH é definida como a menor quantidade de veneno capaz de induzir um halo de hemorragia de 10 mm de diâmetro (DE MOURA et al., 2015).

Camundongos machos *Swiss*, de 18 a 22 g, foram injetados, via intradérmica, na região abdominal, com 100 µL de diferentes doses de venenos (0,25-2,0 µg/animal) diluídos em solução de NaCl 0,85%. Após três horas da inoculação, os animais foram sacrificados em câmaras de gás carbônico, a pele foi removida e o halo foi mensurado em mm (DE MOURA et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 1985; KONDO et al., 1960).

O cálculo do diâmetro, da área hemorrágica foi feito através da expressão a seguir, na qual a área é representada pela letra “a” e o raio por “r” (SANTOS, 2010).

$$r = 2.\sqrt{\frac{a}{\pi}}$$

3.13 ELISA

O teste ELISA é um ensaio imunoenzimático que permite a detecção da imunointeração entre as proteínas de um antígeno (no caso, proteínas do veneno) com o anticorpo (soro antibotrópico).

Para a adsorção dos antígenos, microplacas de 96 poços de polietileno de alta afinidade foram expostas a uma solução de 1 µg/mL de cada veneno em tampão carbonato 0,1 M em pH 9,6 e incubados por 16 horas a 4 ºC. Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a placa com solução de bloqueio (leite desnatado 10% em tampão fosfato-salino (PBS) contendo tween 20

0,05%), por 1 hora a 37 ºC. Posteriormente, a placa foi lavada três vezes, com solução de lavagem (PBS com tween 20 0,05%) para retirar o excesso de solução de bloqueio.

Após as lavagens, foi realizada a diluição seriada do anticorpo primário (soro antibotrópico, lote 0712240/B, a partir de uma concentração de 1:20) em tampão de diluição (leite desnatado 1% em PBS contendo tween 20 0,01%). A placa foi incubada por 1 hora a 37 ºC. Posteriormente, os poços foram lavados 3 vezes com solução de lavagem e, em seguida, prosseguiu-se com a reação com o segundo anticorpo (anti-cavalo, 1:5000) (Sigma) em tampão de diluição por 1 hora a 37 ºC. Então, a placa foi lavada novamente 3 vezes com solução de lavagem.

O reconhecimento foi realizado através da reação com o substrato ortofenilenodiamina (OPD), em tampão citrato 0,1 M, fosfato 0,2 M, pH 5,0 na presença de H_2O_2 3% por 15 min no escuro. A reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 8 M. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da A_{492nm} (MONARIS, 2011).

3.14 *Western Blotting*

O *Western Blotting* foi o método utilizado para verificar a ocorrência da reação de imunorreconhecimento entre as proteínas dos venenos e do soro antibotrópico, lote 0712240/B, produzido pelo Instituto Butantan. Os venenos foram submetidos a SDS-PAGE (12%). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE Healthcare), que havia sido previamente umedecida em metanol por 5 min, em água deionizada por mais 5 min e, finalmente, em tampão de transferência (tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0,037% em pH 9,2) por mais 5 min. A transferência foi realizada em cuba semi-úmida (Amersham Biociences TE 77 PWR – GE Healthcare) durante duas horas com aproximadamente 15 V de tensão. Após a transferência, a membrana foi colocada na estufa para secar para a fixação das proteínas. Em seguida, a membrana foi umedecida em água deionizada e corada com solução de *Ponceau* 0,2% por 10 min, para verificar a eficiência da transferência, então, a membrana foi lavada com tampão de lavagem (tris-HCL 10 mM, NaCl 150 mM, tween 20 0,01% em pH 7,5) por 10 min.

Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a membrana com solução de bloqueio (leite desnatado 5%, tween 20 0,01%) sob agitação, por cerca de 18 horas a 4 ºC. Posteriormente, a membrana foi lavada duas vezes com tampão de lavagem por 5 min. A membrana então foi incubada por 2 horas com o anticorpo primário (antibotrópico) diluído [1:1000] em solução de bloqueio, seguido por 3 lavagens, de 5 min cada, com solução de lavagem. E, em seguida, a membrana foi submetida à incubação com o segundo anticorpo (anti-cavalo) (Sigma) diluído em [1:10000] em solução de bloqueio, por 2 horas, em temperatura ambiente. Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes novamente, por 5 min cada, com solução de lavagem.

A detecção foi realizada utilizando a solução de revelação (0,5 mg/mL 3,3' diaminobenzidina tetra-hidrocloreto, tampão imidazol 0,1 M, pH 7,0, $CoCl_2$ 0,2 M e H_2O_2 30%). E a reação foi parada com água corrente, para então a membrana secar na estufa (HARLOW; LANE, 1988).

3.15 DL_{50}

A DL_{50} é definida como a dose de veneno responsável pela morte de 50% da população analisada (THEAKSTON; REID, 1983; ZELANIS, 2006). Camundongos machos *Swiss*, pesando entre 18 e 22 g, receberam, via intraperitoneal, 500 µL da solução de veneno em diferentes doses (22-127 µg/animal), diluídas em solução NaCl 0,85%. Os animais foram observados por 48 horas após a injeção dos venenos (VILLARROEL et al., 1978). A DL_{50} foi calculada seguindo o método de Probito (FINNEY, 1952).

3.16 DE_{50}

A DE_{50} é definida como a dose que é capaz de neutralizar a ação do veneno em 50% de uma mesma população de camundongos, baseado na concentração de veneno de 5 DL_{50}.

A quantidade de veneno utilizada foi determinada através do cálculo de 5 vezes a DL_{50}, ou seja, para o veneno do plantel, para o VBRN e para o *Pool* dos dois venenos foi feito um cálculo de 5 vezes as suas respectivas doses letais, e esse valor foi fixado para cada experimento, com o intuito de que cada animal fosse inoculado com a dose correspondente a 5 DL_{50}.

As concentrações do soro antibotrópico, lote 0712240/B, foram determinadas pelo fator de diluição de 1.3.

Essa mistura foi homogeneizada e incubada a 37 ºC por 30 min. Assim, foi inoculada, por via intraperitoneal, com volume de 500 μL por camundongo, de cada diluição, em grupos de cinco camundongos machos *Swiss*, de 18 a 22 g (BARD et al., 1994).

A dose efetiva foi calculada a partir do número de mortes dentro de 48 horas após a injeção da mistura do veneno com o soro, usando o Probito (FINNEY, 1952).

3.17 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (D.P.). Para a comparação entre os dois grupos, foi realizada a análise estatística pelo programa Past (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Diferenças com $P<0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

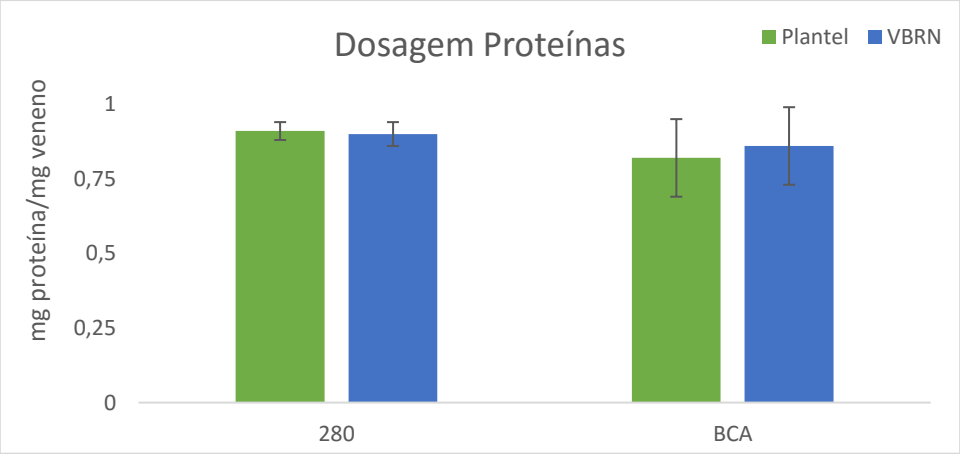
4.1 Dosagem de proteínas

Os valores obtidos para as dosagens de proteínas para o veneno das serpentes *B. jararaca* do plantel e o VBRN foram semelhantes em ambos os métodos utilizados. Na dosagem por A_{280}, os valores foram de 0,91 e 0,90 mg de proteína/mg veneno, para o veneno do plantel e o VBRN, respectivamente. Pelo método do BCA, os valores obtidos foram de 0,82 e 0,86 mg proteína/mg veneno para o veneno do plantel e o VBRN, respectivamente (Tabela 03, Figura 17).

Tabela 03 - Dosagem de proteínas dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN por A_{280} e BCA. *(média±D.P., n=3).

Veneno *B. jararaca*	Prot. (A_{280})* (mg proteína/mg veneno)	Prot. (BCA)* (mg proteína/mg veneno)
Plantel	0,91±0,03	0,82±0,13
VBRN	0,90±0,04	0,86±0,13

Figura 17 - Gráfico com dosagem de proteínas dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN. *(média±D.P., n=3).

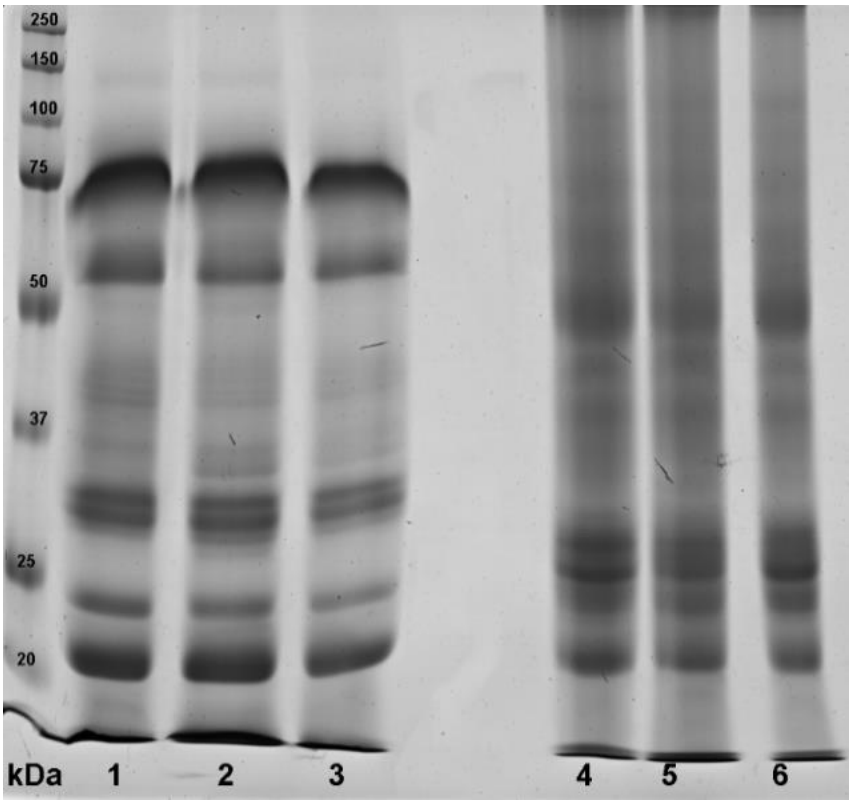


4.2 SDS-PAGE

Uma técnica muito utilizada para comparação das proteínas dos venenos de serpentes é o SDS-PAGE. A eletroforese dos venenos, em condições

reduzidas, possibilitou a visualização de cinco grupos com bandas proteicas majoritárias, com aproximadamente 75 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 22 kDa e 20 kDa, tanto para o veneno do plantel, quanto para o VBRN e para a mistura dos dois venenos. No entanto, em condições não reduzidas, nota-se que há quatro grupos de bandas proteicas majoritárias com massa molecular de aproximadamente 50 kDa, 28 kDa, 25 kDa e 20 kDa que são similares para todas as amostras analisadas. Portanto, os perfis proteicos dos venenos apresentaram comportamento semelhante nas duas condições as quais as amostram foram submetidas (Figura 18).

Figura 18 - SDS-PAGE (12%) dos venenos de *B. jararaca* do plantel, do VBRN e da mistura dos dois venenos. Canaletas **(1)** e **(4):** plantel, **(2)** e **(5):** VBRN, **(3)** e **(6):** Mistura. Canaletas **(1-3):** condições reduzidas, canaletas **(4-6):** condições não reduzidas.

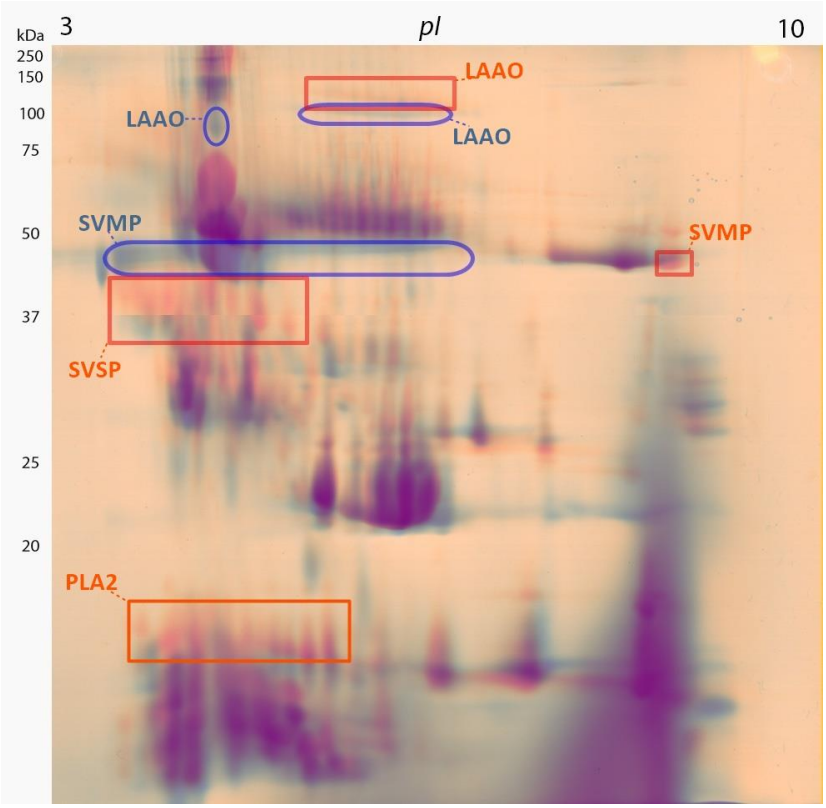


4.3 Gel bidimensional

A análise da sobreposição dos géis bidimensionais apresentou bastante semelhança entre os dois venenos, plantel e VBRN. Os *spots* na cor laranja referem-se às proteínas do veneno do plantel, que apresentou algumas regiões com *spots* exclusivos, como na faixa de massa molecular de aproximadamente 14 kDa e *pI* entre 4 e 5,5, regiões que podem corresponder às PLA_2s, a massa

molecular de 50 kDa e com *pI* de aproximadamente 9, sugerindo tratar-se de SVMPs, entre 150-100 kDa e *pI* na faixa aproximada de 5,5-7, que podem ser LAAOs e massa molecular na faixa de 40-37 kDa e *pI* de 3,5-5, regiões em que se encontram as SVSPs. Enquanto, o VBRN, apresentou *spots* exclusivos nas faixas de massa molecular entre 100-75 kDa e *pI* de 4,5, de 100 kDa e *pI* de 5,5-6, regiões em que situam-se as LAAOs e de 50-37 kDa com aproximadamente 3,5 a 6,5 de *pI*, as quais encontram-se as SVMPs (Figura 19). Todas as regiões acima citadas foram identificadas de acordo com Fox e Serrano (2005) e Zelanis e colaboradores (2011, 2016).

Figura 19 - Sobreposição dos géis bidimensionais do veneno *B. jararaca* do plantel (laranja) e do VBRN (azul), em destaque os *spots* exclusivos.

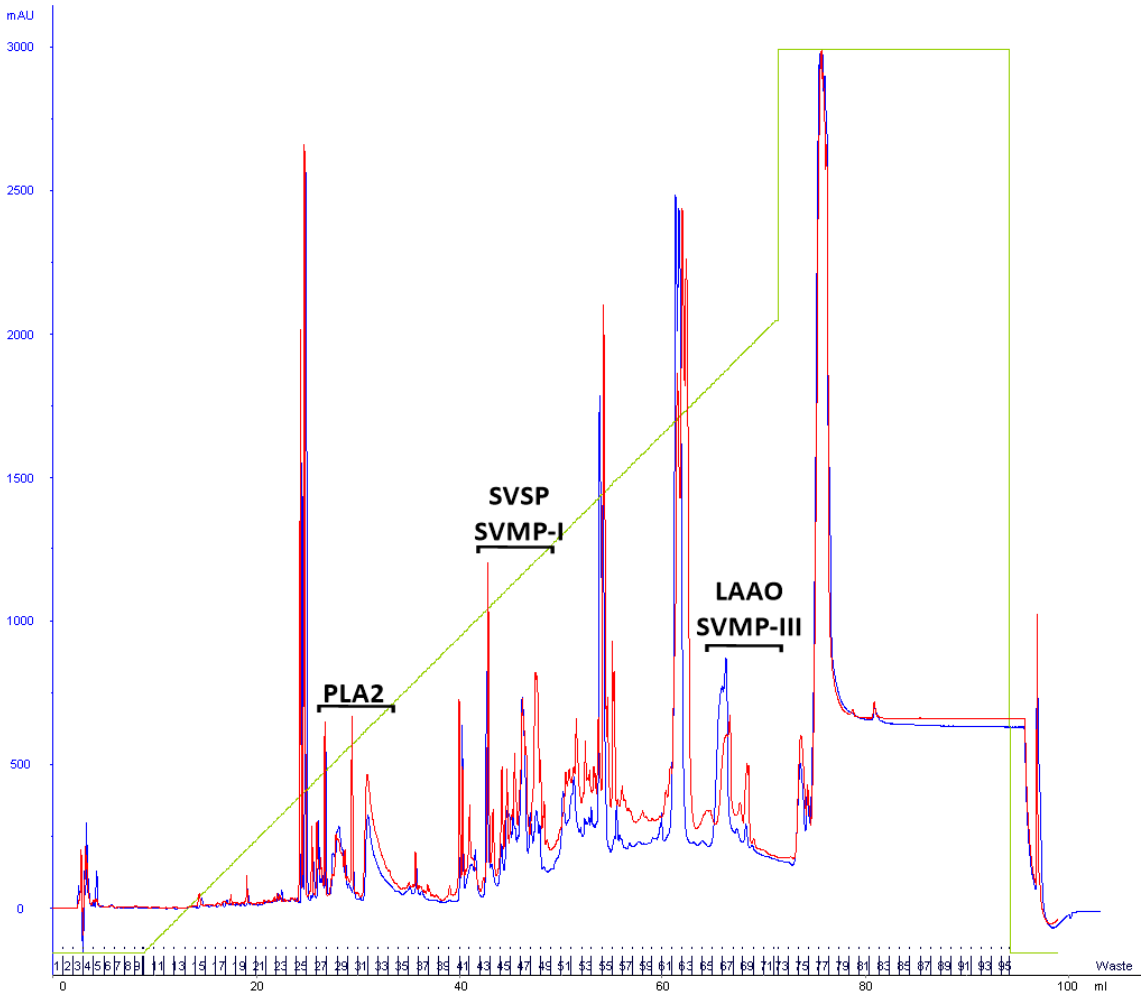


4.4 Cromatografia líquida de fase reversa

As cromatografias dos venenos em coluna de fase reversa C18 (5 µm 25 cm x 0,4 cm) (Teknokroma Europa Protein 300) em HPLC resultaram na separação de 43 picos para o veneno do plantel e 44 para o VBRN. Os perfis cromatográficos em A_{215nm} mostram similaridades entre os dois venenos, foram observados apenas um leve deslocamento e pequenas diferenças na

intensidade de alguns picos, destacados em regiões, que correspondem às famílias de proteínas: PLA_2, SVSP, SVMP-I, LAAO e SVMP-III (Figura 20).

Figura 20 - Perfil cromatográfico dos venenos de *B. jararaca* em coluna C-18 em HPLC. Absorbância 215nm. (Azul): Veneno do Plantel, (Vermelho): VBRN, (Verde): Gradiente de tampão B.



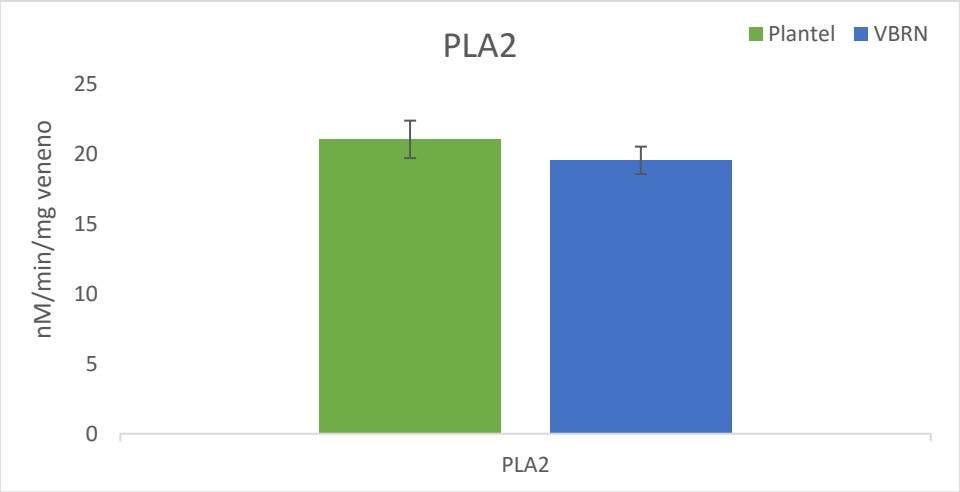
4.5 Atividade de PLA_2

A atividade de PLA_2 dos venenos do Plantel e do VBRN não apresentaram diferenças estatísticas, com resultados de 21,07 nM/min/mg veneno e 19,57 nM/min/mg veneno (Tabela 04, Figura 21).

Tabela 04 - Atividade PLA_2 dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN. *(média±D.P., n=3).

Veneno *B. jararaca*	Atividade PLA2* (nM/min/mg veneno)
Plantel	21,07±1,34
VBRN	19,57±0,98

Figura 21 - Atividade PLA_2 dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN. *(média±D.P. n=3).



4.6 Atividade de LAAO

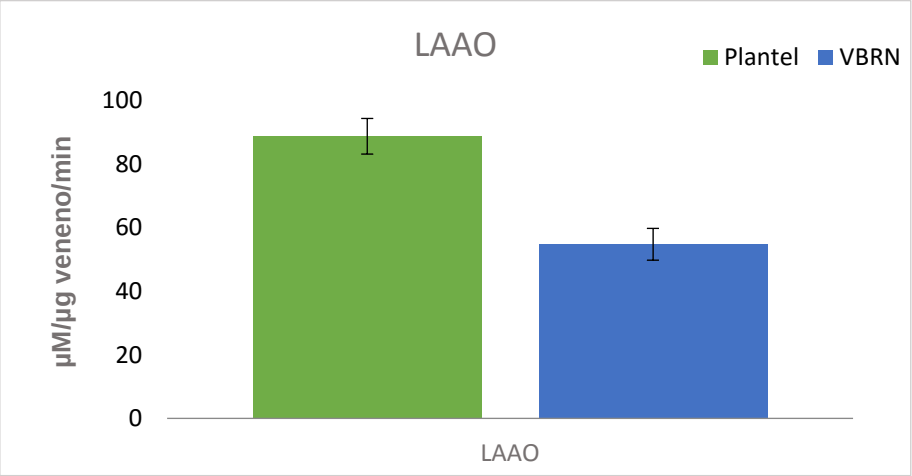
O resultado da atividade de LAAO indicou pouca variação entre os venenos, com valores de 88,8 µM/µg/min e 54,8 µM/µg/min para o veneno do plantel e VBRN, respectivamente (Tabela 05, Figura 22); contudo, esse resultado apresentou diferença estatística significativa, com $P<0,05$.

Tabela 05 - Comparação da atividade de LAAO do veneno de *B. jararaca* do plantel e do VBRN. *(média±D.P. n=3).

Veneno *B. jararaca*	Atividade de LAAO* (µM/µg veneno/min)
Plantel	88,8±5,6
VBRN	54,8±5,0
	#P<0,05

#análise estatística realizada por Past (#P<0,05)

Figura 22 - Atividade de LAAO do veneno do plantel e do VBRN. *(média±D.P., n=3).



4.7 Atividade caseinolítica

Diferentemente da atividade de PLA_2, porém semelhantemente ao ocorrido com a atividade de LAAO, os resultados da atividade caseinolítica apresentados pelos venenos de *B. jararaca* analisados apresentaram diferença estatística significativa (P<0,05) entre os dois grupos. Para o veneno do plantel, a atividade caseinolítica foi de 249,3 U/min/mg, enquanto para o VBRN, o valor foi de 146,7 U/min/mg veneno (Tabela 06, Figura 23), ou seja, o VBRN apresentou uma atividade caseinolítica cerca de 40% menor que o veneno do plantel.

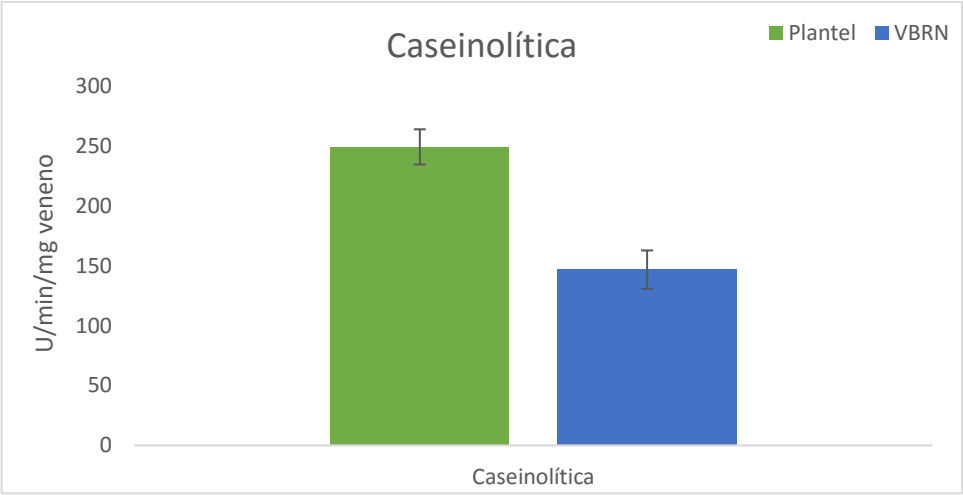
Tabela 06 - Comparação da atividade caseinolítica dos venenos *B. jararaca* do plantel e do VBRN. *(média±D.P. n=3).

Veneno *B. jararaca*	Atividade caseinolítica (U/min/mg veneno)
Plantel	249,3±14,69
VBRN	146,7±16,10

#P<0,05

#análise estatística realizada por Past (#P<0,05)

Figura 23 - Atividade caseinolítica dos venenos de *B. jararaca* do plantel e do VBRN. *(média±D.P. n=3).



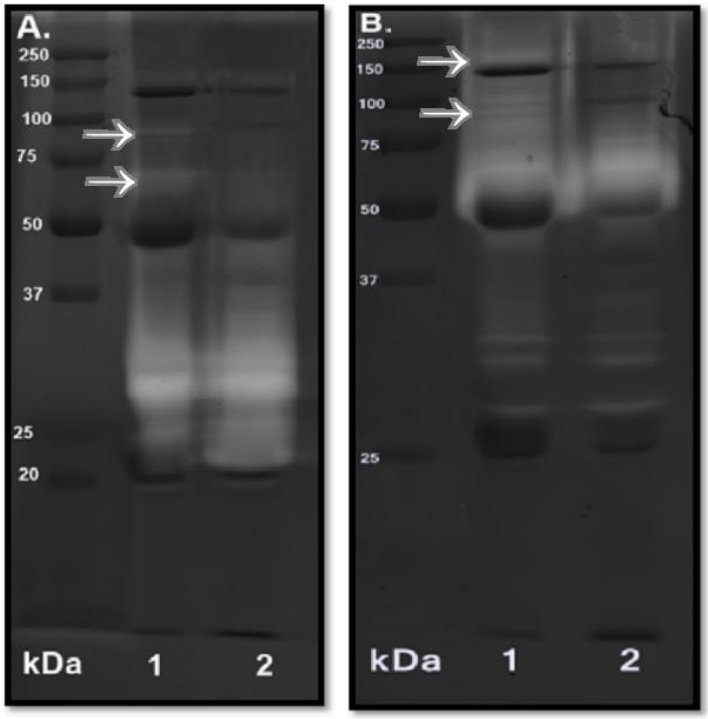
4.8 Zimografia

No perfil zimográfico, foi observado que ambos os substratos apresentaram áreas de degradação pelas proteinases dos venenos analisados. Quando a caseína foi utilizada como substrato, o veneno do plantel apresentou degradação do substrato nas faixas de massa molecular de 100 kDa, 70 kDa, e entre 50 e 20 kDa, enquanto o VBRN apresentou áreas de degradação nas faixas aproximadas entre 50 e 20 kDa. Tal fato sugere que o veneno do plantel apresenta uma maior atividade caseinolítica quando comparada ao VBRN, principalmente devido à degradação na faixa de alta massa molecular, fato não observado para o VBRN. No entanto, no geral, as faixas de degradação dos venenos mostraram-se semelhantes (Figura 24A).

Por outro lado, o perfil de degradação da gelatina pelos venenos é diferente quando comparada ao da caseína. A degradação utilizando esse substrato ocorre na faixa de alta e média massas moleculares, com aproximadamente, 150 kDa, 100 kDa, 90 kDa, entre 80 e 50 kDa, 33 kDa, 31 kDa e 28 kDa para o veneno do plantel, assim como o VBRN que teve a degradação do substrato em alta e média faixa de massa molecular, na faixa de 75 a 50 kDa, 33 kDa, 31 kDa e 28 kDa (Figura 24B).

Desta forma, em ambas as condições, ou seja, com caseína ou gelatina como substrato, o veneno do plantel apresentou algumas bandas que não apareceram no VBRN, sugerindo uma maior atividade proteinásica do veneno do plantel.

Figura 24 - Zimografia dos venenos *B. jararaca* do plantel e do VBRN. (A): SDS-PAGE contendo caseína, (B): SDS-PAGE contendo gelatina, canaletas (1): plantel; (2): Referência.



4.9 DMC

Neste teste, a DMC dos venenos foi analisada tanto sobre o plasma, quanto sobre o fibrinogênio. Os resultados da DMC dos venenos sobre o plasma, com valores de 30,83 µg/mL e 23,22 µg/mL, para os venenos do plantel e do VBRN, respectivamente, indicaram que não existe diferença

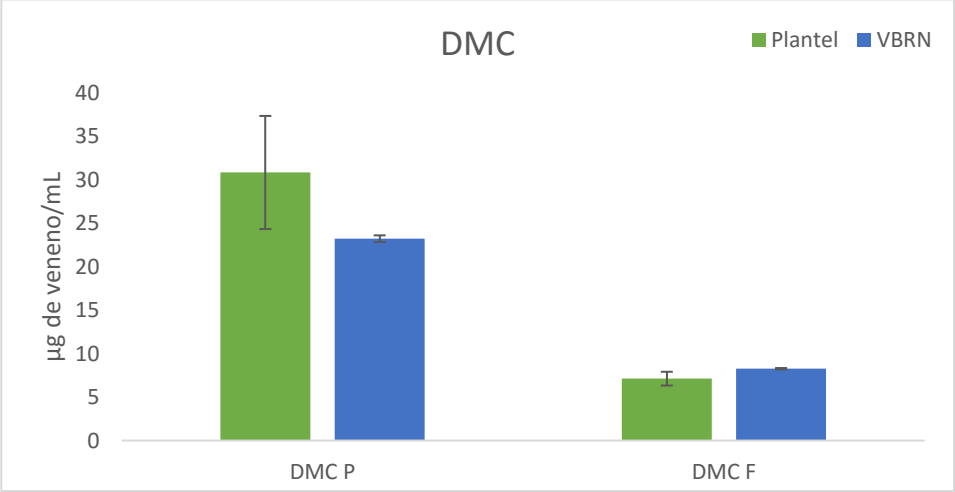
estatística significativa entre os grupos, P>0,05. No entanto, a DMC dos venenos sobre o fibrinogênio apresentou diferença significativa entre os grupos, P<0,05, com valores de 7,12 µg/mL para o veneno do plantel e 8,44 µg/mL para o VBRN (Tabela 07, Figura 25).

Tabela 07 - DMC sobre o plasma (DMC-P) e sobre o fibrinogênio (DMC-F) dos venenos das serpentes do plantel e o VBRN. *(média±D.P., n=3).

Veneno *B. jararaca*	**DMC-P*** **(µg/mL)**	**DMC-F*** **(µg/mL)**
Plantel	30,83±6,50	7,12±0,79
VBRN	23,22±0,38	8,44±0,08
		#P<0,05

#análise estatística realizada por Past (#P<0,05)

Figura 25 - DMC sobre o plasma (DMC-P) e sobre o fibrinogênio (DMC-F) dos venenos das serpentes do plantel e do VBRN. *(média±D.P., n=3).



4.10 DMH

A DMH dos venenos do plantel e do VBRN foi calculada através da medição dos halos hemorrágicos (Figura 26A e 26B). É interessante notar que, apesar do veneno do plantel ter apresentado a DMC cerca de 2,3 vezes menor que a do VBRN, com valores de 0,97 µg para o veneno do plantel e 0,42 µg

para o VBRN, não houve diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 08. Figura 27).

Figura 26 - Halos hemorrágicos causados pelos venenos, **(A):** Veneno do plantel; **(B):** VBRN *(1,5 µg de veneno por animal, n=5).

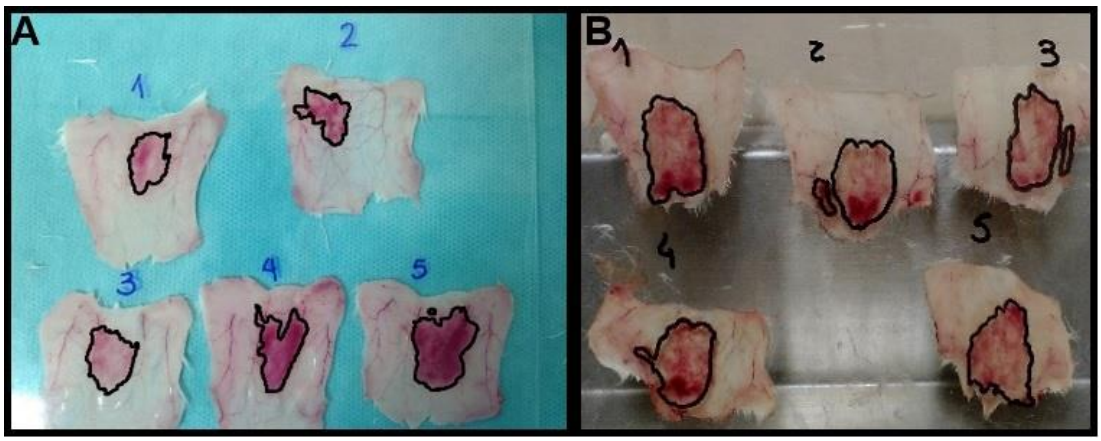
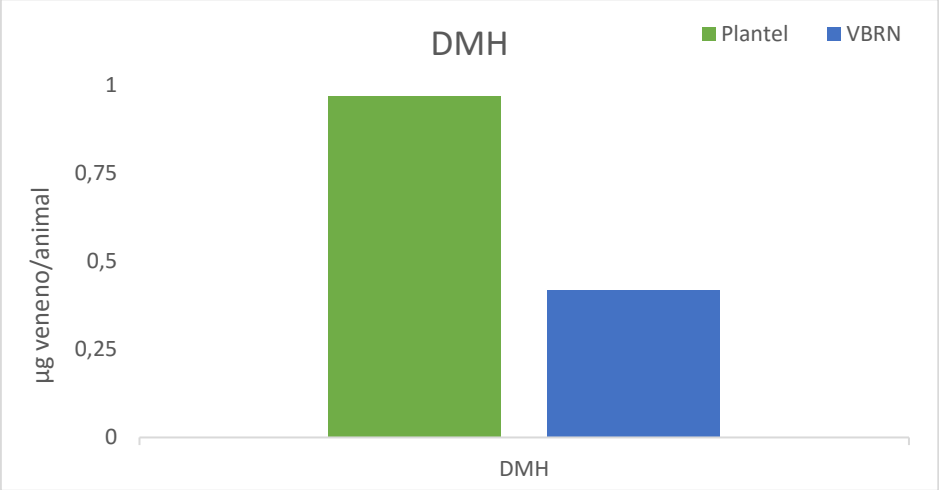


Tabela 08 - Valores da DMH dos venenos das serpentes do plantel e o VBRN. *(média, n=5)

Veneno	**DMH***
B. jararaca	**(µg/animal)**
Plantel	0,97
VBRN	0,42

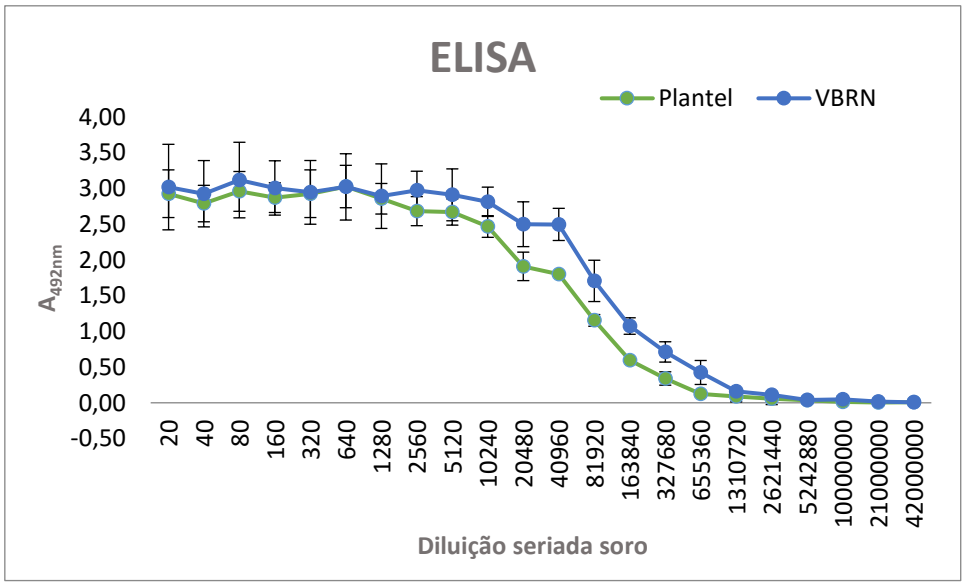
Figura 27 - DMH dos venenos do Plantel e o VBRN. *(média, n=5).



4.11 ELISA

O teste de ELISA apresentou perfis de titulação bastante semelhante para os dois venenos, sugerindo que o soro comercial teve um padrão de imunorreconhecimento parecido para as proteínas de ambos os venenos (Figura 28).

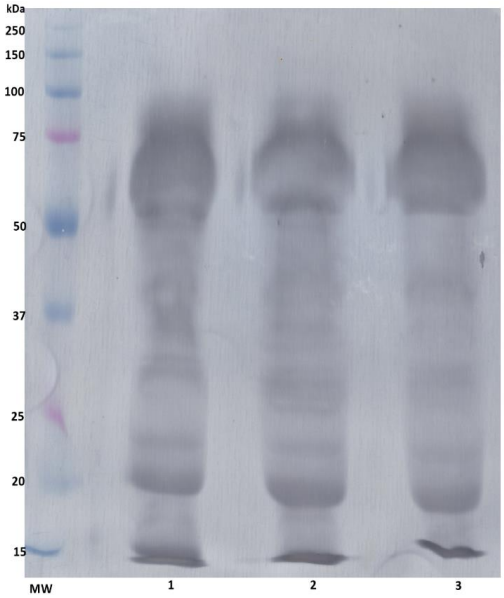
Figura 28 - Imunorreconhecimento dos venenos de *B. jararaca* do plantel e VBRN pelo soro comercial anti-botrópico, avaliado por ELISA



4.12 *Western Blotting*

O *Western blotting* foi realizado com os venenos de *B. jararaca* do plantel, do VBRN e com a mistura dos dois venenos. Pode-se observar que os três apresentaram padrão de reconhecimento semelhante (Figura 29).

Figura 29 - *Western Blotting* dos venenos de *B. jararaca* do (1): plantel, do (2): VBRN e da (3): mistura dos dois venenos.



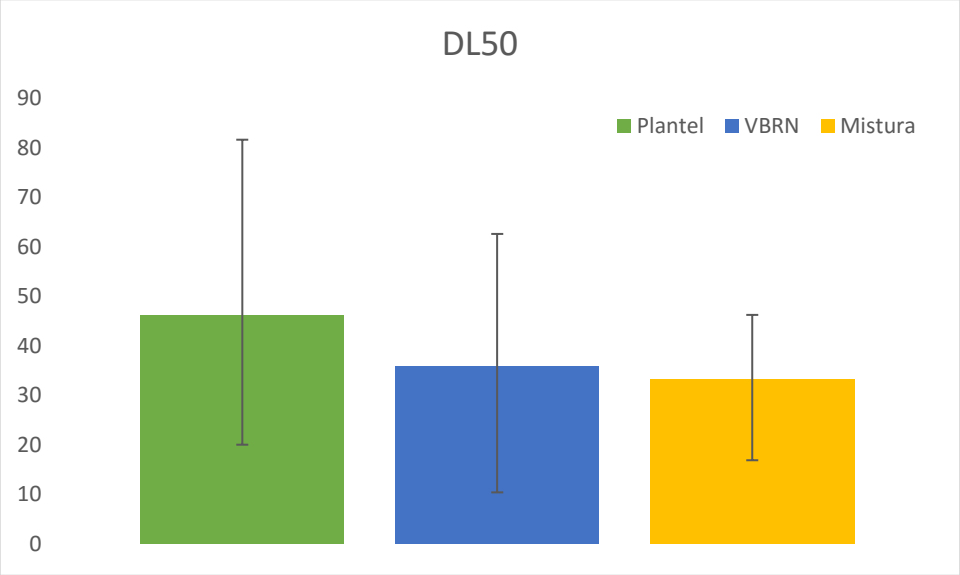
4.13 DL$_{50}$

A DL$_{50}$, ou seja, a dose de veneno de *B. jararaca* do plantel, do VBRN ou da mistura dos dois venenos, necessária para causar a morte de metade da população de camundongos foi calculada pelo programa Probito. Os valores da DL$_{50}$ para os grupos foram de 46,05 µg/animal para o veneno do plantel, 35,80 µg/animal para o VBRN e 33,24 µg/animal para a mistura dos dois venenos. (Tabela 09, Figura 30).

Tabela 09 - DL$_{50}$ dos venenos das serpentes do plantel, do VBRN e da mistura dos dois venenos. *(média, n=5)

Veneno *B. jararaca*	**DL$_{50}$ (µg/animal)**	**Limites de confiança (µg/animal)**
Plantel	46,05	20,04-81,64
VBRN	35,79	10,41-62,61
Mistura	33,24	16,90-46,26

Figura 30 - DL_{50} dos venenos das serpentes do plantel, do VBRN e da mistura dos dois venenos. *(média, n=5).



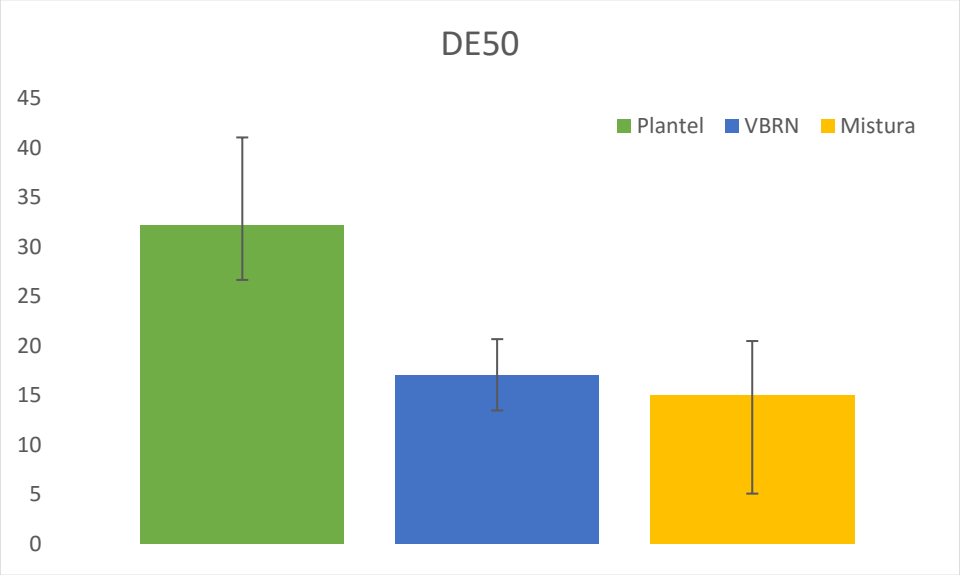
4.14 DE_{50}

A DE_{50}, ou seja, a dose de antiveneno que neutraliza 50% da população de camundongos, foi calculada pelo programa Probito, no qual os valores das doses foram de 32,12 µL/animal para o veneno do plantel, 16,98 µL/animal para o VBRN e 14,95 µL/animal para a mistura dos dois venenos (Tabela 10, Figura 31).

Tabela 10 - DE_{50} dos venenos do plantel, VBRN e da mistura dos dois venenos. *(média, n=5)

Veneno *B. jararaca*	**DE_{50} (µL/animal)**	**Limites de confiança (µL/animal)**
Plantel	32,12	26,66-41-05
VBRN	16,98	13,48-20,05
Mistura	14,95	5,08-20,49

Figura 31 - DE_{50} dos venenos do plantel, o VBRN e com a mistura dos dois venenos. *(média, n=5).



5. DISCUSSÃO

O INCQS, referência do Ministério da Saúde na área de controle de qualidade de produtos referentes à saúde, criou um Setor de Soros Antipeçonhentos, em virtude do interesse em projetos de pesquisa de relevância ou programas de monitoramento dos produtos oferecidos à população, bem como o controle dos mesmos para a saúde pública. Recomendou-se o estabelecimento de padrões de referência nacionais ou regionais para o ensaio de potência, de modo a permitir a comparação lote a lote, assim como a comparação entre os laboratórios (LUCAS, 2009).

Em uma reunião, sob responsabilidade do INCQS, com todas as entidades relacionadas à produção, controle e distribuição dos soros antipeçonhentos no Brasil, viu-se a necessidade de uma melhoria nas metodologias analíticas para o controle de qualidade desses soros, assim como a necessidade da produção do Veneno Referência Nacional (LUCAS, 2009).

O Instituto Butantan sempre foi referência para a população no recebimento de serpentes encontradas na natureza, e, desde a sua fundação, há cerca de 115 anos (BRAZIL, 1911), o Instituto recebe esses animais, sendo responsável pelo recebimento, triagem e manutenção das serpentes para a pesquisa e produção de venenos. Até o ano de 2011, todas essas funções eram desempenhadas pelo Laboratório de Herpetologia. Desde então, este Laboratório é responsável pela triagem, manutenção das serpentes e extração de todos os venenos produzidos no Instituto Butantan.

Há cerca de 20 anos, estabeleceu-se um padrão de conduta para as serpentes recém-chegadas ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, que consiste no banho de triclorfon 2%, para tratamento contra ectoparasitas, e extração do veneno.

A primeira extração dos venenos destas serpentes é destinada à composição do *pool* do VBRN, à produção de soros antiofídicos e à pesquisa. Após a extração e procedimentos de profilaxia, a serpente é submetida à duas quarentenas, para ser incorporada à sala de produção de venenos.

Contudo, com o passar dos anos e devido à redução dos animais na natureza, causada pelos constantes desmatamentos e urbanização, aliada à toda burocracia de transporte desses animais, o Instituto tem recebido anualmente cada vez menos serpentes oriundas da natureza, causando assim uma preocupação com relação à produção dos VBRN. Uma vez que a produção desses depende exclusivamente das serpentes oriundas da natureza. Por outro lado, com o passar dos anos, o Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan tem conseguido prolongar a sobrevida dos animais que nascem no biotério e dos que chegam da natureza, ambos têm tido sobrevida de cerca de 10 anos. Essas melhorias foram obtidas através de instalações adequadas para os animais, além de investimento na contratação e treinamento dos profissionais responsáveis pelo manejo desses animais.

Como a evolução do veneno é provavelmente afetada por condições externas, tais como geografia, tipo de predador e/ou tipo de presa, é interessante examinar o efeito do cativeiro sobre o veneno das serpentes (CALVETE et al., 2011; CHIJIWA et al., 2003; CREER et al., 2003; CURRIER et al., 2010; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; JIAO et al., 2005; PRASAD et al., 1999; VALENTE et al., 2009). Desta forma, esse trabalho sobre o estudo comparativo da biologia e bioquímica dos venenos das serpentes *B. jararaca* do plantel e do VBRN pretende contribuir para essa área, verificando as similaridades e diferenças entre esses dois venenos. Além disso, vislumbra a possibilidade de incorporação do veneno das serpentes do plantel do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan na produção do VBRN.

Muitos autores têm focado seus trabalhos na variação da composição do veneno de serpentes e atribuem tais variações a diversos fatores, como idade, sexo, origem geográfica, tipo de dieta dentre outros (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; FURTADO et al., 1991; MACKESSY, 1988; MACKESSY et al., 2003; MOURA-DA-SILVA; CARDOSO; TANIZAKI, 1990; RAEL; KNIGHT; ZEPEDA, 1984; SERRANO et al., 2005; WILLEMSE, 1978; ZELANIS; SERRANO; REINHOLD, 2012; ZELANIS et al., 2016).

As proteínas são os componentes majoritários dos venenos de serpentes, correspondendo à aproximadamente 90% da composição desses. Podendo

apresentar atividades tóxica e/ou enzimática (FONTEQUE; DE BARROS FILHO; SAKATE, 2001; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; VARANDA; GIANNINI; BARRAVIERA, 1999). Os resultados obtidos por esse trabalho, com relação ao conteúdo proteico dos venenos estudados corroboram estudos anteriores, obtendo valores de cerca de 80 a 90% de proteínas, tanto para o método de A_{280nm}, quanto para o do BCA os venenos do plantel e o VBRN mostraram-se estatisticamente semelhantes nos dois métodos utilizados.

Além da dosagem proteica, o perfil eletroforético foi o recurso utilizado para comparar o padrão de bandas proteicas do veneno do plantel e do VBRN, além do *pool* desses dois venenos. Assim, para um melhor entendimento da complexidade do veneno, a análise por SDS-PAGE foi realizada em condições reduzidas e não reduzidas. Os perfis proteicos em ambas condições mostraram uma grande similaridade nas bandas dos venenos estudados. Não houve nenhuma banda que fosse exclusiva para os venenos do plantel, VBRN ou para o *pool* dos dois venenos. Perfil eletroforético semelhante ao encontrado nesse trabalho já havia sido anteriormente obtido por outros grupos (ANTUNES et al., 2010; MENEZES et al., 2006; ZELANIS et al., 2016).

É comum encontrar bandas de alta massa molecular, em condições não reduzidas que não aparecem em condições reduzidas, o que significa que essas bandas são proteínas que têm cadeias polipeptídicas ligadas por pontes de dissulfeto, geralmente são proteínas de estrutura e função mais complexas, como é o caso das SVMP tipo III, das lectinas tipo-C e das desintegrinas diméricas (ZELANIS et al., 2011, 2016).

É interessante notar que, embora os venenos ofídicos sejam compostos por centenas de proteínas (SERRANO et al., 2005), estas pertencem a algumas poucas famílias proteicas, incluindo enzimas (SVSP, SVMP, LAAOs e PLA_2s) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas, peptídeos natriuréticos, miotoxinas CRISP, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY; WÜSTER, 2004; FRY, 2005; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998).

Estas famílias de proteínas já foram identificadas através do perfil eletroforético dos venenos do gênero *Bothrops*, sendo que as SVMP são encontradas com maior abundância nos venenos de *Bothrops jararaca,* podendo pertencer as classes P-I (massa molecular de 15-30kDa) e P-III (massa molecular entre 50-100kDa), podendo encontrar também SVMP do tipo P-II (30-50kDa) (MENEZES et al., 2006; ZELANIS et al., 2011, 2016).

As SVMP com atividade hemorrágica, as hemorraginas, têm a capacidade de alterar a permeabilidade dos vasos sanguíneos, causando extravasamento de sangue, além de interferirem na agregação plaquetária. No envenenamento botrópico a hemorragia é potencializada pela incoagubilidade sanguínea e pela formação de edema, causando extravasamento de líquidos (KAMIGUTI et al., 1994).

Terra e De Lema (2006) sugerem que dentre as SVMP presentes nos venenos de *Bothrops,* com massas moleculares na faixa de 48 a 55 kDa, são encontradas as proteínas hemorrágicas, como por exemplo a Bothropasina, isolada pelo grupo de Mandelbaum, Reichel e Assakura (1982), com massa molecular de 48 kDa, os Fatores Hemorrágicos (HF1, HF2), com massa molecular entre 46 a 62 kDa (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989), isoladas por Assakura e colaboradores (1986) a Alternagina, que foi isolada do veneno de *B. alternatus,* com massa molecular de 55 kDa (SOUZA et al., 2000) e a Jararagina, purificada pelo grupo de Paine (1992), com massa molecular de 52 kDa, que promove lesão endotelial sistêmica e trombocitopenia.

Outra SVMP isolada do veneno das serpentes *B. jararaca,* a Jararafibrase I, é uma SVMP com atividade fibrinolítica com massa molecular de 47 kDa (MARUYAMA et al., 1992).

As SVSP do veneno de serpentes formam uma grande família de enzimas proteolíticas que interferem especificamente nos mecanismos hemostáticos, com uma notável resistência à inibição por serpinas (SERRANO; MAROUN, 2005). Dependendo do teor de glicosilação, estas enzimas apresentam massas moleculares que podem variar de 26 a 67 kDa (SERRANO, 2013), como por exemplo, a Bothrombina, que foi isolada por Nishida e colaboradores (1994), que tem massa molecular de 35 kDa e promove a coagulação do fibrinogênio,

as SVSP isoladas do veneno de *B. moojeni* MSP1 e MSP2, com massas moleculares de 33 e 38 kDa, com atividade proteolítica e sobre a coagulação (SERRANO et al., 1993), as TL-BJ1, 2 e 3, massa moleculares de 30,31 e 32 kDa, respectivamente, com atividade coagulante (liberação do fibrinopeptídeos A) sobre o plasma e o fibrinogênio (SERRANO et al., 2000), as KN-BJ1 e 2, com massas moleculares de 38 e 39 kDa, com atividade coagulante sobre o plasma e o fibrinogênio (SERRANO et al., 1998).

A análise dos géis bidimensionais dos venenos do plantel e do VBRN, pela sobreposição dos mesmos, identificou que, apesar dos perfis dos venenos não serem idênticos, apresentaram vários *spots* em comum entre os dois grupos. Foram destacados alguns grupos de proteínas que parecem ser exclusivas do veneno do plantel ou do VBRN. De acordo com as características quanto às massas moleculares das famílias de proteínas descritas, pode-se sugerir que alguns *spots* possam pertencer à família de toxinas das LAAOs, por apresentarem massas moleculares entre 100 e 150 kDa e *pI* na faixa de 4 a 7, outro *spot*, com massa molecular na faixa de 37-40 kDa e *pI* na faixa de 3,5 a 5 poderia pertencer à família das SVSP além do *spot* com faixa de massa molecular aproximada de 37-50 kDa e *pI* entre 3,5 a 6,5 pode ser SVMP tipo III, enquanto, o *spot* com massa molecular de aproximadamente 14 kDa e *pI* aproximado de 4 a 5,5 poderia pertencer as PLA_2 (FOX; SERRANO, 2005; ZELANIS et al., 2011, 2016). Zelanis e colaboradores (2011, 2016) caracterizou os venenos de *B. jararaca* recém-nascidas e adultos, além de machos e fêmeas, e com isso, observou a variação entre gênero e idade na composição dos venenos dessas serpentes. Foi observado que o veneno das recém-nascidas tem a predominância de toxinas da família das SVMP tipo III, enquanto o veneno das adultas apresenta uma maior diversidade entre as toxinas das famílias das SVSP, das SVMP tipo-I, das LAAOs e das lectinas tipo C. A mesma pluralidade ocorre em relação ao gênero, o veneno dos machos são caracterizados por ter uma maior intensidade de *spots* contendo fator de crescimento neural em relação às fêmeas, enquanto as fêmeas apresentam maior intensidades para *spots* abrangendo lectinas tipo C e SVMP. Assim, a variação encontrada nos perfis dos venenos do plantel e do VBRN refletem bem o resultado final de todas essas interações, uma vez que é

composto por uma mistura complexa de venenos de diferentes idades, sexo, região geográfica, que culminará na complexidade de composição destes venenos.

A cromatografia líquida de fase reversa, que é um método de análise tanto qualitativo quanto quantitativo, também foi um recurso utilizado nesse trabalho para comparar os dois venenos, de acordo com a quantidade e a massa molecular das proteínas presentes neles. E o que pode ser observado nessa análise é que, mais uma vez, os venenos do plantel e o VBRN se mostraram muito semelhantes, salvo algumas pequenas diferenças de intensidade de picos proteicos. As proteínas do VBRN, em sua grande maioria, apresentam picos com a intensidade maior do que as proteínas do veneno do plantel, como apresentado na região em que são encontradas PLA_2s e na região em que as SVSP e SVMP tipo I são geralmente encontradas, diferentemente da região em que o veneno do plantel teve um pico com intensidade maior do que o VBRN, na qual são encontradas SVMP do tipo III (CALVETE et al., 2011; NÚÑEZ et al., 2009), contudo, não houve nenhum pico expressivo exclusivo em nenhuma das duas corridas. Trabalhos como os dos grupos de Gay e colaboradores (2015), Núñez e colaboradores (2009) e o grupo de Tashima (2008) apresentam perfis cromatográficos dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* que se assemelham aos perfis encontrados nesse trabalho, em que eles identificam alguns picos e encontram algumas das famílias de proteínas mais abundantes no veneno de *Bothrops,* tais como, SVMP, SVSP LAAOs, dentre outras. Podendo afirmar assim que, com relação à quantidade de proteínas e os perfis das massas moleculares desses venenos, analisados por dosagens de proteínas, SDS-PAGE e cromatografia líquida de fase reversa, o veneno do plantel e o VBRN apresentam bastantes semelhanças, além disso, a mistura dos dois venenos complementaria as poucas diferenças encontradas, sendo assim uma vantagem unir os dois venenos.

Venenos de serpentes da família Viperidae são caracterizados pela sua alta atividade enzimática, devido à presença, além das proteinases, de PLA_2 e de hialuronidases dentre outras enzimas, que levam à lesão local, edema, equimose, podendo evoluir para necrose (TU, 1977).

Neste estudo, a atividade de PLA_2 mostrou-se equivalente para a análise do veneno para o plantel e para o VBRN. Valores esses que não representam uma diferença significativa na análise estatística e que são semelhantes aos obtidos em estudos anteriores, como por exemplo, o de Terra e De Lema (2006), em que a atividade PLA_2 também não demonstrou diferença significativa entre os venenos do *pool* de *B. jararaca* do Rio Grande do Sul e do *pool* de várias regiões do Brasil. É interessante notar que o teste de atividade PLA_2 corrobora ao encontrado no gel bidimensional, em que a região de massa molecular de aproximadamente 14 kDa e *pI* entre 4 e 5,5, apresenta *spots* exclusivos para o veneno do plantel, que indicaria a presença de PLA_2, mas que não é confirmado pelo teste de cromatografia líquida de fase reversa, em que o VBRN tem picos de maior intensidade na região com predominância de PLA_2s. Cabe ressaltar que já foram descritas proteínas com homologia estruturais às PLA_2s sem atividade enzimática, mas potente atividade miotóxica, como por exemplo a Bothropstoxina (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988).

Desde os anos 50, quando o isolamento de diferentes LAAOs de veneno de serpentes de diferentes espécies foi iniciado, muitos estudos para identificar as suas atividades e para compreender o seu modo de ação foram realizados. Como resultado, diferentes ensaios para a caracterização dos efeitos tóxicos e farmacológicos destas enzimas foram padronizados para se obter uma melhor compreensão das atividades das LAAOs (DU; CLEMETSON, 2002; IZIDORO et al., 2014). No envenenamento, as LAAOs têm sido caracterizadas com funções distintas como indução à apoptose, à citotoxicidade, à hemólise, à agregação plaquetária, à indução de hemorragia, ao edema e às atividades bactericidas (COOPER; PINTO, 2005; DU; CLEMETSON, 2002). Nesse trabalho, a atividade de LAAO demonstrou maior atividade desta enzima no veneno do plantel quando comparado ao VBRN. Desta forma, com a inclusão do veneno do plantel ao VBRN, este último, teria um aumento quanto à presença desta enzima.

O efeito proteolítico dos venenos de serpentes sobre substratos como a caseína, a gelatina, dentre outros é conhecido há muito tempo (BOLAÑOS, 1984). As proteinases desempenham um importante papel nas composições e

atividades dos venenos de serpentes, estando relacionadas com diversos processos fisiológicos, cujo propósito principal é auxiliar a digestão das presas (MACKESSY et al., 2003; THOMAS; POUGH, 1979).

Os venenos desse estudo foram também avaliados com relação à sua ação proteolítica sobre a caseína, observando-se uma maior atividade proteinásica do veneno do plantel em relação ao VBRN. Os valores obtidos neste estudo corroboram com outros trabalhos da atividade caseinolítica dos venenos de *Bothrops jararaca* (FURTADO; COLLETTO; SILVA, 1991; TERRA; DE LEMA, 2006). Diferentemente do que ocorre entre a atividade de PLA_2 para o teste de cromatografia líquida de fase reversa, a atividade caseinolítica corrobora com o resultado da cromatografia líquida de fase reversa, na qual a região característica pela presença das LAAOs e SVMP tipo III, tem o pico de maior intensidade para o veneno do plantel do que para o VBRN.

Os venenos foram também submetidos à zimografia, realizada com gelatina, considerado um substrato natural presente nas presas destes animais (colágeno), e caseína um substrato para enzimas exógenas (ANTUNES et al., 2010). Esse teste possibilitou o conhecimento das massas moleculares das enzimas proteolíticas através da visualização de bandas que demonstram a degradação dos substratos (caseína ou gelatina) pelas proteinases dos venenos.

O padrão geral de atividade proteinásica, tanto do veneno do plantel quanto do VBRN, foi similar em ambos os substratos. No entanto, houve diferença com relação às regiões com atividade enzimática, enquanto o gel com caseína apresentou predominância de proteinases na região entre 20 e 50 kDa, no gel com gelatina a maior atividade ocorreu na região de maior massa molecular (50-150 kDa). Estas diferenças mostram que proteinases diferentes atuam nos dois substratos, com predominância de enzimas tipo SVSP e SVMP tipo I atuando no substrato caseína e SVMP tipo III na gelatina. Estes dados mostram a atuação diferenciada das várias proteinases presentes nos venenos ofídicos em diferentes substratos, como a caseína, considerada um substrato ausente em presas desses animais, e gelatina, que simularia um substrato presente nas presas desses animais, o colágeno. As áreas de lise presentes quando a gelatina foi utilizada como substrato indicam a atividade

colagenolítica destes venenos. Além disso, indicam que os venenos podem se diferenciar em termos de subproteomas de enzimas gelatinolíticas (ANTUNES et al., 2010; ZELANIS et al., 2010, 2011, 2016). Ademais, houveram algumas bandas de alta massa molecular em ambos substratos presentes apenas no veneno do plantel. Esses resultados corroboram os obtidos no teste de atividade proteolítica total sobre a caseína, em que o veneno do plantel teve uma atividade cerca de 1,6 vezes superior ao VBRN.

Os venenos de viperídeos apresentam muitas proteinases que atuam tanto na ativação, quanto na inativação da coagulação sanguínea, a ação dessas enzimas pode ser avaliada pelo teste de DMC. Assim, a DMC dos dois venenos foi testada utilizando o fibrinogênio ou o plasma humano como substrato. Na análise com o fibrinogênio, o veneno do plantel apresentou uma menor DMC do que o VBRN, ou seja, há uma maior atividade das proteínas trombina-símile no veneno do plantel. Desde a identificação da Reptilase em 1957, várias enzimas trombina-símile foram descritas no veneno *B. jararaca*. Essas proteínas pertencem principalmente à família das SVSP (BLOMBACK; BLOMBACK; NILSSON, 1958; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Brazil (1984) sugere a presença de enzimas trombina-símile com massa molecular entre 30 e 40 kDa no gênero *Bothrops*, e o grupo de Nishida (1994) purificou e caracterizou a Bothrombina, uma toxina do veneno de *B. jararaca*, que promove a coagulação do fibrinogênio, apresentando massa molecular de 35kDa.

Por outro lado, com relação à DMC sobre o plasma, o VBRN apresentou valor inferior ao plantel. Antunes e colaboradores (2010) demonstraram que o veneno de *B. jararaca* de indivíduos adultos apresentam uma atividade trombina-símile maior do que o veneno dos jovens, enquanto a atividade sobre o plasma foi superior em indivíduos jovens, atribuindo a atividade mais intensa nestes indivíduos pela presença de SVMP que ativam protrombina e fator X. Esses resultados evidenciam que a idade dos animais que compõem o *pool* de venenos é importante fator na atividade coagulante destes.

As SVMP com atividade hemorrágica (hemorraginas) têm a capacidade de alterar a permeabilidade dos vasos sanguíneos, causando assim a degradação das células do vaso endotelial e extravasamento de sangue, além de

interferirem na agregação plaquetária. No envenenamento botrópico a hemorragia é potencializada pela incoagubilidade sanguínea e pela formação de edema, causado pelo extravasamento de líquidos (KAMIGUTI et al., 1994).

As SVMP tipo III são as principais responsáveis pela hemorragia causada pelo veneno da *B. jararaca.* Existem algumas hemorraginas isoladas desta família, tais como: Jararagina, Botropasina e a HF-3 (FOX; SERRANO, 2005; MANDELBAUM; REICHL; ASSAKURA, 1988; PAINE et al., 1992).

O VBRN apresentou menor DMH, ou seja, maior atividade hemorrágica do que o veneno do plantel. A variação observada na atividade hemorrágica dos venenos pode estar relacionada com as bandas proteicas na região da faixa de massa molecular entre 50 e 37 kDa observada no gel bidimensional (*spot* 6), uma vez que as SVMP estão frequentemente relacionadas a processos hemorrágicos (FOX; SERRANO, 2005; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000a).

Sabe-se que há uma variação na concentração de proteínas entre o veneno de serpentes *B. jararaca* recém-chegadas da natureza e as que estão mais que 3 anos em cativeiro. Diferenças como alta atividade hemorrágica para os venenos das serpentes machos, adultos e recém-chegadas da natureza foi encontrada para serpentes, *Bothrops jararaca* (SAAD et al., 2012).

O soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan, utilizado no tratamento para os acidentes causados por *B. jararaca*, é produzido pela imunização em cavalos com um *pool* dos seguintes venenos: 50% *B. jararaca,* 12,5% *Bothrops alternatus,* 12,5% *Bothrops jararacussu,* 12,5% *Bothrops moojeni* e 12,5% *Bothrops neuwiedi* (CARDOSO; YAMAGUCHI; MOURA-DA-SILVA, 2003).

Assim, como o envenenamento por picada de serpente pode ter consequências graves, e o único tratamento eficaz atual é a soroterapia (MCCLEARY et al., 2016), ou seja, a capacidade dos anticorpos do soro antibotrópico comercial (Instituto Butantan) de reconhecer as proteínas dos venenos ofídicos. Assim, esta capacidade foi avaliada utilizando duas metodologias, o ELISA e o *Western blotting*. Para o teste de ELISA, o soro comercial apresentou a capacidade de imunorreconhecer ambos os veneos na mesma magnitude. Tal fato sugere que ambos possuem capacidade

semelhantes de serem reconhecidos pelo soro antibotrópico. Para investigar a participação das diferentes proteínas dos venenos no imunorreconhecimento pelos anticorpos dos soros antibotrópicos, realizou-se o teste de *Western blotting* do veneno do plantel, do VBRN e do *pool* dos dois venenos brutos. É interessante notar que o padrão de reconhecimento das bandas foi semelhante nos três venenos, que reforça a similaridade dos dois venenos de serem reconhecidos pelo soro antibotrópico comercial, além de demonstrar que a mistura desses dois venenos não altera os seus padrões de reconhecimento, tanto quanto ao conjunto de proteínas que foram reconhecidas pelos anticorpos do soro antibotrópico (ELISA), como para os grupos de proteínas que se ligaram aos anticorpos (*Western blotting*). Vale ressaltar que o padrão do *Western blotting* encontrado nesse trabalho foi semelhante ao encontrado no trabalho de Júnior (2008).

Gutiérrez e Lomonte (1989) relataram que o soro comercial era capaz de neutralizar os efeitos sistêmicos dos venenos, contudo os efeitos locais não seriam capazes de serem neutralizados por esse soro, sendo atribuídos à ação das PLA_2s e seus produtos de catálise.

Tanaka e colaboradores (2016) demonstraram que, embora alguns soros antiofídicos possam apresentar altos títulos e capacidade de imunorreconhecimento, estes resultados podem não estar diretamente correlacionados com o potencial neutralizante dos antivenenos. Isto pode ser ocasionado pela presença de componentes altamente imunogênicos e biologicamente não relevantes aos efeitos tóxicos dos venenos.

Portanto, o teste de letalidade dos venenos seria o teste indicado para analisar o efeito tóxico simultâneo de todos os componentes dos venenos, como preconizado pela WHO (WHO, 1955).

Assim, um importante parâmetro para mensurar a variação na composição dos venenos de serpentes recém-chegadas da natureza com a do plantel, é a DL_{50}. O VBRN mostrou-se cerca de 23% mais letal que o veneno do plantel. Cabe ressaltar que, para a espécie *Crotalus durissus terrificus*, foi observada semelhante variação, em que os venenos das serpentes do plantel apresentaram uma menor eficiência quanto à letalidade quando comparado

aos venenos das serpentes recém-chegadas da natureza (LOURENÇO et al., 2013; SAAD et al., 2012). Adicionalmente, foi feito um teste complementar, ou seja, determinou-se a DL_{50} utilizando a mistura dos dois venenos. É interessante notar que a mistura foi capaz de restaurar a letalidade do veneno do plantel, indicando o sinergismo dos componentes dos venenos no objetivo principal do veneno para as serpentes, sucumbir a presa. Contudo, como trata-se de experimento *in vivo* é esperado encontrar uma certa variação. Os valores obtidos neste trabalho são corroborados por diversos autores (ANTUNES et al., 2010; ARAÚJO, 2008; JÚNIOR, 2008; LUCAS, 2009; SAAD et al., 2012). Pode-se concluir com esse resultado que a mistura do veneno do plantel com o VBRN potencializou a ação dos venenos.

A capacidade de soroneutralização dos soros antiofídicos é importante para verificar a potência destes produtos, que é mensurada pela determinação da DE_{50} (GUTIÉRREZ et al., 1990). Este teste tem sido preconizado pela (WHO, 1981) e mensura a capacidade de neutralização da letalidade destes venenos. No Brasil, o VBRN é o veneno utilizado por todos os produtores de soros ofídicos, tanto para o teste de letalidade quanto para o teste de soroneutralização.

Assim, além de testar a DL_{50}, a DE_{50} também foi determinada para comparar a potência do soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan na neutralização da letalidade causada pelo veneno do plantel e do VBRN.

O soro antibotrópico apresentou o dobro da potência na neutralização da letalidade do VBRN sobre os camundongos quando comparado ao veneno do plantel. É interessante notar que, quando a mistura dos dois venenos foi utilizada, o soro antibotrópico apresentou potência equivalente a apresentada no VBRN. Este resultado também pode ser explicado pelo sinergismo entre as proteínas dos venenos, favorecendo assim a soroneutralização deles. Cabe ressaltar que o soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan é produzido pela mistura de venenos de *B. jararaca* do plantel e das oriundas da natureza. Isto pode justificar os resultados obtidos nos testes de DL_{50} e DE_{50}, além de sugerir a possibilidade da adição do veneno do plantel ao VBRN. Outro fator a ser considerado é a variação que normalmente ocorre em teste *in vivo.* Por exemplo, Lucas (2009), em trabalho para a definição de um soro botrópico

referência nacional, testou a potência de um *pool* dos soros produzidos pelos quatro produtores de soro antibotrópico (IB, IVB, FUNED e CPPI) sobre o VBRN, realizando 8 ensaios. Os valores obtidos de DE_{50} variaram de 24,94 a 33,48 µL/animal.

Concluindo, dentre os testes realizados neste estudo, a maioria deles apresentou padrões de comportamento bioquímico e de atividades biológicas semelhantes entre os venenos analisados. Inclusive, os ensaios nos quais o VBRN apresentou maior atividade, a mistura foi capaz de minimizar esta diferença. Assim, esses resultados sugerem a possibilidade da inclusão do veneno botrópico do plantel à composição do VBRN, sem que haja uma perda de qualidade deste veneno referência. Cabe ressaltar que esta mudança no preparo do VBRN minimizaria a dependência do recebimento de animais oriundos da natureza, favorecendo também a manutenção destes animais em seu ambiente natural.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados indicam que o veneno dos animais do plantel é equivalente, tanto em testes *in vitro,* quanto em testes *in vivo,* ao veneno das serpentes recém-chegadas da natureza.

- O *pool* dos dois venenos estudados em testes *in vivo* é mais eficiente do que quando os dois venenos atuam isoladamente.

- De acordo com os dados obtidos neste trabalho pode-se propor a inclusão do veneno do plantel no processo de produção do VBRN.

REFERÊNCIAS*

ALVES, R. DE M. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de'*Bothrops atrox*'.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - São Paulo, 2007.

AMARAL, C. F. S. et al. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. In: **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. Brasil. Ministerio da Saúde, 1991.

ANTUNES, T. C. et al. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1443–1458, 2010.

ARAÚJO, H. P. DE. **Avaliação da metodologia oficial in vivo e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade in vitro para determinação da potência do soro antibotrópico**, 2008. Tese de Doutorado.

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca (jararaca)*. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 943–946, 1986.

BARD, R. et al. Ineficácia do antiveneno botrópico na neutralização da atividade coagulante do veneno de Lachesis muta muta: relato de caso e comprovação experimental. **Rev. Inst. Med. Trop. Säo Paulo**, v. 36, n. 1, p. 77–81, 1994.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n. 2, p. 247–250, 1995.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 7, n. 2, p. 121–209, 1988.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. **Methods in enzymology**, v. 248, p. 345–368, 1994.

BLOMBACK, B.; BLOMBACK, M.; NILSSON, I. M. Coagulation studies on reptilase, an extract of the venom from *Bothrops jararaca*. **Thrombosis et diathesis haemorrhagica**, v. 1, n. 1, p. 76–86, 1958.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOLAÑOS, R. 2. Veneno de Serpientes. Estrutura química y actividades biológicas y farmacológicas. **Universidad de Costa Rica (Ed.). Serpientes venenos y ofidismo em Centro América.** San José, p. 45–81, 1984.

BRASIL. Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996. **Ministério da Saúde - Secretarias de Vigilência Sanitária.**, p. 23491–23556, 1996.

BRASIL, M. DA S. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. p. 120, 2001.

BRAZIL, F. N. DE S. et al. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2ª ed. ed. Brasília, DF.: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRAZIL, O. V. **Peçonhas.** In: COBERT, C. (ed.) Farmacodinâmica. Rio de Janeiro: Guanabara=Koogan, 1984. p. 1044–1074.

BRAZIL, V. **A defesa contra o ophidismo**. Pocai & Weiss, 1911. p. 152.

BRINKHOUS, K. M. et al. Botrocetin (venom coagglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 5, p. 1463–1466, 1983.

BURNOUF, T. et al. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. **Biologicals**, v. 32, n. 3, p. 115–128, 2004.

BUTANTAN, I. Soros e Vacinas. **Série didática 3**, p. 13–16, 2006.

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 3, p. 725–734, 2003.

CALVETE, J. J. et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 4, p. 510–527, 2011.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405–1414, 2007.

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**, p. 367–379, 2003.

CARDOSO, J. L. C. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. [s.l.] Sarvier, 2009.

CARLINI, E. . L. . **PORTARIA Nº 174, DE 11 DE NOVEMBRO DE 1996**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1996/prt0174_11_11_1996.html>.

CASTRO, H. C. et al. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1903–1912, 1998.

CHIJIWA, T. et al. Interisland evolution of Trimeresurus flavoviridis venom phospholipase A2 isozymes. **Journal of molecular evolution**, v. 56, n. 3, p. 286–293, 2003.

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

CLEMETSON, K. J. et al. Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 31, n. 3-6, p. 148–154, 2002.

COOPER, A. J. L.; PINTO, J. T. Aminotransferase, l-amino acid oxidase and β-lyase reactions involving l-cysteine S-conjugates found in allium extracts: Relevance to biological activity? **Biochemical pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 209–220, 2005.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira,** v. 3, p.74-84, 2014.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, v. 4, p. 75–93, 2015.

CREER, S. et al. Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pitviper venom composition detected using matrix-assisted laser desorption

time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. **Journal of Molecular Evolution**, v. 56, n. 3, p. 317–329, 2003.

CULMA, M. F. et al. Snake venomics of *Bothrops punctatus*, a semiarboreal pitviper species from Antioquia, Colombia. **PeerJ**, v. 2, p. e246, 2014.

CURRIER, R. B. et al. Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (Bitis arietans): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 864–873, 2010.

DA SILVA, F. S. Q. **Avaliação da pureza de soros antiofídicos brasileiros e desenvolvimento de nova metodologia para essa finalidade.** 2008. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, n. 6565, p. 537–540, 1996.

DE MOURA, V. M. et al. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of ethnopharmacology**, v. 161, p. 224–232, 2015.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of snake venoms. **Venomous animals and their venoms**, v. 1, p. 119–165, 1968.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9557–9560, 1988.

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002.

Farmacopéia Brasileira. **Farmacopéia Brasileira**, v. 4, Parte 2, Fascículo 5, p. 243, 2000.

FINNEY, D. J. **Probit analysis.** JSTOR, p. 388-390 , 1952.

FONTEQUE, J. H.; DE BARROS FILHO, I. R.; SAKATE, M. Acidentes botrópicos de interesse em animais domésticos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 3, p. 102–111,

2001.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Febs Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008.

FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403–420, 2005.

FRY, B. G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 584–588, 2006.

FRY, B. G.; WÜSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 5, p. 870–883, 2004.

FURTADO, M. DE F.; COLLETTO, G. M. D. D.; SILVA, W. D. DA. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos: I. Padronizaçäo dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops e Crotalus*... **Memória Instituto Butantan**, v. 53, n. 2, p. 149–159, 1991.

FURTADO, M. F. D. et al. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219–226, 1991.

GADELHA, C. A. G. A produção e o desenvolvimento de vacinas no Brasil. **História da Ciência Saúde-Manguinhos**, v. 3, p. 111–132, 1996.

GANS, C.; ELLIOTT, W. B. Snake venoms: Production, injection, action. **Advances Oral Biology**, v. 3, p. 45–81, 1968.

GARDINER, P.; OSBORN, G. **O Graal da Serpente. A verdadeira história do Santo Graal, dos Alquimistas e do Elixir da Imortalidade**. p.354. 2005.

GAY, C. et al. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in Northeastern Argentina. **Toxins**, v. 8, n. 1, p. 9, 2015.

GEMAL, A.; LEAL, E. Controle de Qualidade dos Imunobiológicos: Participação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). In: BUSS, P.; TEMPORÃO, J.; CARVALHEIRO, J. (Eds.). . **Vacinas, soros & imunizações no Brasil**. v. 1. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. p. 131–144.

GIEBELER, N.; ZIGRINO, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 122, 2016.

GOMES, M. S. R. Purificação e caracterização bioquímica de BthMP: uma nova metaloprotenaise do veneno de Botrops moojeni (Caiçaca). 2006.

GOMES, R. **Acidente botrópico, elapídico e crotálico em cães e gatos.** Trabalho de conclusão de curso de pós graduação do Instituto Qualittas. Universidade Castelo Branco, Florianópolis, 2008.

GUTIÉRREZ, J. et al. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887–893, 1985.

GUTIÉRREZ, J. et al. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. **Toxicon**, v. 28, n. 10, p. 1127–1129, 1990.

GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Phospholipase A 2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn Crotalus durissus durissus and adult Crotalus durissus terrificus rattlesnakes. **Toxicon**, v. 29, n. 10, p. 1273–1277, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997–1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: report of a workshop. **Toxicon**, v. 49, n. 1,

p. 30–35, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, n. 4, p. 211–223, 1989.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841–50, jan. 2000b.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. **Palaeontolia Electronica 4**, 2001.

HARLOW, E. D.; LANE, D. Antibodies. In: **A laboratory manual. New York,** Cold Spring Harbor Laboratory, p. 579, 1988.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; GIASSON, L. O. M. Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do sudeste do Brasil. **Phyllomedusa**, v. 2, n. 1, p. 35–41, 2003.

HENRIQUES, C. M. P. **Resolução - RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003**. Disponível em: <http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucao_sanitaria/210.pdf>.

HITE, L. A. et al. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, n. 1, p. 182–191, 1994.

HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A 2. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1149–1155, 1996.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615–627, 1988.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: **Snake venoms**. [s.l.]

Springer, 1979. p. 61–158.

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

JANEIRO-CINQUINI, T. R.; LEINZ, F. F.; FIGUEIREDO, V. C. Sexual dimorphism in adult *Bothrops jararaca*. **Bulletin Chicago Herpetological Society**, v. 27, p. 94–95, 1992.

JIAO, H. et al. Shedaoenase, a novel fibrinogenase from the venom of Agkistrodon shedaoenthesis Zhao. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 37, n. 12, p. 835–842, 2005.

JORGE, M. T. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Revista Associação Medédica Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 312–318, 1998.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **RAMB Revista Associação Médica Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 66–77, 1990.

JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomics: Characterization of protein families in Sistrurus barbouri venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 327–338, 2004.

JÚNIOR, M. A. R. **Estudo comparativo do veneno de *Bothrops jararaca* do continente e de espécimes da ilha de São Sebastião.** Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 2008.

JUNQUEIRA, M. R. Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno da serpente *Bothrops insularis* (Viperidae). Rio de Janeiro: **FIOCRUZ,** p. 63, 2005.

KAMIGUTI, A. S. et al. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 19, n. 2, p. 199–204, 1985.

KAMIGUTI, A. S. et al. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thrombosis and haemostasis**, v. 72, n. 2, p. 244–249, 1994.

KARLSSON, E.; LEE, C. Y. Snake Venom. In: Lee, C. **Handbook of experimental pharmacology.** v. 52, p. 32, 1979.

KINI, R. M. Phospholipase A2 - A Complex Multifunctional Protein Puzzle. In: Kini RM. Ed., **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism.** New York: John Wiley & Sons Inc Chichester, p.1-28, 1997.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 25, n. 1, p. 65–106, jan. 1987.

KOCHVA, E.; NAKAR, O.; OVADIA, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **American Zoologist**, v. 23, n. 2, p. 427–430, 1983.

KONDO, H. et al. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 13, p. 43, 1960.

KWON, I. et al. Thrombolytic Effects of the Snake Venom Disintegrin Saxatilin Determined by Novel Assessment Methods: A FeCl 3-Induced Thrombosis Model in Mice. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e81165, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LÓPEZ-LOZANO, J. L. et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 997–1006, 2002.

LOURENÇO, A. et al. Individual venom profiling of Crotalus durissus terrificus specimens from a geographically limited region: crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. **Toxicon**, v. 69, p. 75–81, 2013.

LU, Q.-M. et al. L-amino acid oxidase from Trimeresurus jerdonii snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **Journal of natural toxins**, v. 11, n. 4, p. 345–52, dez. 2002.

LUCAS, E. P. R. Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde, p.104, 2009.

MACKESSY, S. P. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes Crotalus viridis helleri and C. v. oreganus. **Copeia**, p. 92–101, 1988.

MACKESSY, S. P. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern Pacific rattlesnakes (Crotalus viridis oreganus). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 181–189, 1993.

MACKESSY, S. P. et al. Ontogenetic variation in venom composition and diet of Crotalus oreganus concolor: a case of venom paedomorphosis? **Copeia**, v. 2003, n. 4, p. 769–782, 2003.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca (jararaca)*. **Toxicon**, v. 20, n. 6, p. 955–972, 1982.

MANDELBAUM, F. R.; REICHL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Hemorrhagic factors from venoms of two species of *Bothrops* snake. In: XII Simpósio Anual da ACIESP. **Anais.** Campinas,SP. p. 51–57, 1988.

MARCINKIEWICZ, C. et al. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of αIIbβ3 and αvβ3 integrins and expression of ligand-induced binding site. **Blood**, v. 90, n. 4, p. 1565–1575, 1997.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 36, n. 12, p. 1749–800, dez. 1998.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. **Biology of the Vipers**, p. 307–328, 2002.

MARUYAMA, M. et al. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca (jararaca)* venom. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 853–864, 1992.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1, p. 146–156, 2000.

MCCLEARY, R. J. R. et al. Proteomic comparisons of venoms of long-term captive and recently wild-caught Eastern brown snakes (Pseudonaja textilis) indicate venom does not change due to captivity. **Journal of proteomics**, 2016.

MCLANE, M. A. et al. Disintegrins. **Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders**, v. 4, n. 4, p. 327–355, 2004.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304–312, 2006.

MONARIS, D. **Avaliação do potencial adjuvante da flagelina FliCi de Salmonella enterica sorovas Thyphimurium no desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose**. Tese de doutorado. Instituto Butantan e Universidade de São Paulo, 2011.

MORAES, R. A. DE. **Variações em caracteres morfológicos e ecológicos em populações de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae) no Estado de São Paulo.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2008.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 713–723, 1991.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, v. 28, n. 11, p. 1293–1301, 1990.

NISHIDA, S. et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1843–1849, 1994.

NÚÑEZ, V. et al. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest

the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 1, p. 57–78, 2009.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007–21, maio 1975.

OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: **Snake venoms**. [s.l.] Springer, 1979. p. 480–546.

OKA, S.; ARITA, H. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of the gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9956–9960, 1991.

OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v. 41, n. 48, p. 14248–14254, 2002.

PAINE, M. J. L. et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 32, p. 22869–22876, 1992.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 48, p. 29987–29990, 1997.

PONTE, C. Vacinação, Controle de Qualidade e Produção de Vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciência, Saúde - Manguinhos**, v. 10, n. 2, p. 619–53, 2003.

PRASAD, N. B. et al. Comparative characterisation of Russell's viper (Daboia/Vipera russelli) venoms from different regions of the Indian peninsula. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1428, n. 2, p. 121–136, 1999.

QUEIROZ, L. S. et al. **Ultrastructural-changes in skeletal-muscle capillaries caused by *Bothrops jararaca* snake-venom and 2 of its fractions.** In: Toxicon. BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD,

ENGLAND OX5 1GB, PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD, p.603, 1985.

RAEL, E. D.; KNIGHT, R. A.; ZEPEDA, H. Electrophoretic variants of Mojave rattlesnake (Crotalus scutulatus scutulatus) venoms and migration differences of Mojave toxin. **Toxicon**, v. 22, n. 6, p. 980–984, 1984.

RIBEIRO DE QUEIROZ, M. et al. Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Alteraçäo do tempo de coagulaçäo sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. Säo Paulo**, v. 44, n. 4, p. 143–145, 1989.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiologia do acidente por serpentes peçonhentas: estudo de casos atendidos em 1988. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 5, p. 380–388, 1995.

RIVERO, J. V. R. Avaliação da atividade não citotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu* em células mononucleares do sangue periférico. Dissertação de Mestrado. Goiânia, 2012.

ROODT, A. R.; DOLAB, J. A.; SEGRE, L. Fisiopatologia y diagnóstico del ataque por serpientes venenosas: una breve actualización. **Rev. Med. Vet**, v. 77, p. 64–71, 1996.

SAAD, E. et al. Intraspecific variation of biological activities in venoms from wild and captive *Bothrops jararaca*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16-17, p. 1081–1090, 2012.

SANTOS, C. . **Efeito do laser de baixa intensidade e led na atividade hemorrágica induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*.** In: Anais do 14º Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e 10º Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. **Anais.** São José dos Campos, Brasil. São José dos Campos: UNIVAP, p.1-4, 2010.

SANTOS, R. Contribuição da FUNED para a Produção de Soros Antivenenis e Antitóxicos no Brasil. **Revista Mineira de Saúde Pública**, v. 6, n. 5, p. 13–19, 2005.

SAÚDE, M. DA. **Acidentes por animais peçonhentos**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/animais-peconhentos-serpentes>.

SCARBOROUGH, R. M. et al. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 2, p. 1058–65, jan. 1993.

SCHOR, N.; BOIM, M. A.; SANTOS, O. F. P. Insuficiência renal aguda: fisiopatologia clínica e Tratamento. In: Burdmann, E.A. **Sarvier, v. 1. cap. 1. São Paulo**, p. 103–108, 1997.

SELISTRE, H. S. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis (jararaca ilhoa)* snake venom. **Toxicon**, v. 28, n. 3, p. 261–273, 1990.

SELLS, P. G. Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 115–133, 2003.

SERRANO, S. M. T. et al. Basic proteinases from *Bothrops moojeni (Caissaca)* venom—I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 471–481, 1993.

SERRANO, S. M. T. et al. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **European Journal of Biochemistry**, v. 251, n. 3, p. 845–853, 1998.

SERRANO, S. M. T. et al. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. **Thrombosis and haemostasis**, v. 83, n. 3, p. 438–444, 2000.

SERRANO, S. M. T. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501–510, 2005.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19–26, 2013.

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

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2009. Disponível em: <http://sinitox.icict.fiocruz.br/>.

SMITH, P. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SMOLKA, M. B. et al. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1059–1063, 1998.

SOUZA, D. H. F. et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits α2β1 integrin-mediated cell adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, n. 2, p. 341–350, 2000.

STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. **Methods in enzymology**, v. 182, p. 50–68, jan. 1990.

SUCCAR, B. **Avaliação do Perfil Antitrombótico das Desintegrinas Recombinantes do Veneno de *Bothrops jararaca***. Dissertação de Mestrado. Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, 2012.

TAMBOURGI, D. V. Acidentes por animais peçonhentos: doença negligenciável afetando países em desenvolvimento. In: **62ª Reunião Anual da SBPC. Anais.** Natal, RN, 2010.

TANAKA, G. D. et al. Micrurus snake species: Venom immunogenicity, antiserum cross-reactivity and neutralization potential. **Toxicon**, v. 117, p. 59–68, 2016.

TASHIMA, A. K. et al. Snake venomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **Journal of proteomics**, v. 71, n. 4, p. 473–485, 2008.

TERRA, A. L. C.; DE LEMA, T. Comparação da toxidade entre peçonhas de serpen-tes do gênero *Bothrops** presentes nas regiões sul e sudeste do brasil (* Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Toxicologia,** v. 20, n.1/2,

p. 55-63, 2006.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 949, 1983.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 541–557, 2003.

THOMAS, R. G.; POUGH, F. H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 17, n. 3, p. 221–8, jan. 1979.

TOYAMA, D. DE O. **Estudo das frações protéicas derivadas do veneno de serpentes crotálicas e bothropicas com atividade antibacteriana, isolamento, purificação e caracterização bioquímica e biológica.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia, , 2004.

TU, A. . Snake venoms: Proprieties and Actions. **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**, John Wiley e Sons, New York, 1977.

VALENTE, R. H. et al. *Bothrops insularis* venomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 241–255, 2009.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M.; BARRAVIERA, B. Bioquímica de venenos de serpentes. **BARRAVIERA, B. Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro: EPUB**, p. 205–223, 1999.

VILLARROEL, M. S. et al. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Memória Instituto Butantan**, v. 42, n. 43, p. 223–311, 1978.

VISHWANATH, B. S.; KINI, R. M.; GOWDA, T. V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A2 enzymes from habu (Trimeresurus flavoviridis) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid.

Toxicon, v. 25, n. 5, p. 501–515, 1987.

WARRELL, D. A. Guidelines for the management of snake-bites. **Guidelines for the management of snake-bites**, p. 162, 2010.

WERMELINGER, L. S. et al. Integrin inhibitors from snake venom: Exploring the relationship between the structure and activity of RGD-peptides. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 482, n. 1, p. 25–32, 2009.

WHO. **(World Health Organization). Expert Committee on Biological Standardization,** NINTH REPORT. Geneva: WHO, 1955.

WHO. **(World Health Organization). Global strategy for health for all by the year 2000, Health for All Series 3. Geneva: WHO,** 1981.

WHO. **(World Health Organization)**. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue: report of a consultative meeting, World Health Organization, Geneva, 10 January 2007.** 2007.

WILLEMSE, G. T. Individual variation in snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 553–557, 1978.

ZAMUNÉR, S. R. et al. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 259–271, 2004.

ZELANIS, A. **Análise da variabilidade ontogenética do veneno de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921)(Serpentes, Viperidae): implicações adaptativas aos itens alimentares &# 91**Dissertação de Mestrado&, , 2006.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 2010.

ZELANIS, A. et al. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomics**, v. 11, n. 21, p. 4218–4228, 2011.

ZELANIS, A. et al. Proteomic identification of gender molecular markers in *Bothrops jararaca* venom. **Journal of proteomics**, v. 139, p. 26–37, 2016.

ZELANIS, A.; SERRANO, S. M. T.; REINHOLD, V. N. N-glycome profiling of *Bothrops jararaca* newborn and adult venoms. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 3, p. 774–782, 2012.

ZELANIS, A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; FURTADO, M. F. Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, n. 1, p. 43–50, 2008.

ZINGALI, R. B. et al. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, n. 40, p. 10794–802, out. 1993.