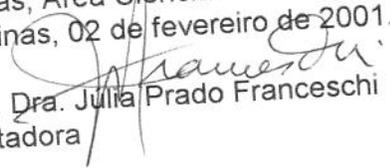


REJÂNE MARIA LIRA DA SILVA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

**“ESTUDO FARMACOLÓGICO DO VENENO DE
BOTHROPS LEUCURUS (SERPENTES; VIPERIDAE)”**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas. Campinas, 02 de fevereiro de 2001.


Prof. Dra. Júlia Prado Franceschi
Orientadora

CAMPINAS

2001

REJÂNE MARIA LIRA DA SILVA

**“ESTUDO FARMACOLÓGICO DO VENENO DE
BOTHROPS LEUCURUS (SERPENTES; VIPERIDAE)”**

*Tese de Doutorado Apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, Para Obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas, Área de Medicina Interna.*

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a Júlia Prado Franceschi

CAMPINAS

2001

iii



00106926

UNIDADE 30
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
Si. 38e
 V. _____ Ex. _____
 TOMBO BC/ 44298
 PROC. 16-892101
 C D
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 09/05/01
 N.º CPD _____

CM-00155054-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

Si38e Silva, Rejâne Maria Lira da
 “Estudo farmacológico do veneno de Bothrops Leucurus
 (serpentes:viperidade)” / Rejâne Maria Lira da Silva . Campinas, SP
 : [s.n.], 2001.

Orientador : Júlia Prado-Franceschi
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
 de Ciências Médicas.

Farmacologia / Antivenenos / Cobra Venenosa
 (venenos)
 1. XXXXXX. 2. XXXXX. 3. XXXXX. I. Júlia Prado-
 Franceschi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Orientador: Profa. Dra. Júlia Prado Franceshi

Membros:

1. Prof. Dr. José M^o Gutierrez - *José M. Gutierrez*
2. Profa. Dra. Maria de Fátima Furtado - *M. F. Furtado*
3. Prof. Dr. Fabiano Bucaretchi - *Fabiano Bucaretchi*
4. Profa. Dra. Leá R. Simioni - *Leá R. Simioni*
5. Profa. Dra. Júlia P. Franceschi - *Júlia P. Franceschi*

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02.02.09

DEDICATÓRIA

PROF^ª DR^ª JÚLIA PRADO-FRANCESCHI (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP

PROF^º DR^º FÁBIO BUCARETCHI

Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP

PROF^º DR^º JOSÉ MARIA GUTIÉRREZ

Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica)

PROF^ª LÉA RODRIGUES-SIMIONI

Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP

PROF^ª DR^ª MARIA DE FÁTIMA DOMINGUES FURTADO

Instituto Butantan

**AOS MEUS PAIS, NIL E ZEZINHO,
MAIS QUE PALAVRAS, EXEMPLOS...**

**A ALICE,
MINHA FILHA QUERIDA, MINHA COMPANHEIRA.**

**A LUÍS CLAÚDIO E CLÁUDIO,
MAIS QUE AMIGOS... OBRIGADA POR TUDO!**

**A JAIR TÉRCIO,
POR TER DESPERTADO EM MIM,
A NOÇÃO EXATA DE ALMA,
A NOÇÃO EXATA DE CONSCIÊNCIA
E A NOÇÃO EXATA DE LEI NATURAL.**

AGRADECIMENTOS

“Só o amor nos leva onde nunca fomos” (O Imutabilismo)

A Dr.^a Júlia (Campinas) pelo convite carinhoso. Obrigada pela acolhida amorosa, pela atenção e pelo grande ensinamento que tive: dizer a verdade com elegância e sabedoria! Não posso esquecer dos colegas de Laboratório: Zé Hilton, Malê e Cris.

A Míriam (Recife), onde tudo começou...e as suas primeiras “meninas”: Carla e Renata.

A Dr.^a Léa e sua “Família” (Campinas), que acabou sendo um pouco minha também: Gildo, Yoko, Chariston, Rosana e Sara.

“Muchas gracias” ao Adolfo do Instituto Carlos Malbrán (Buenos Aires, Argentina) e sua equipe: Silvana, Cristián e Sebastián. Também à Dr.^a Liliana Segre e Dr.^o Juan Vidal.

Ao Dr.^o Arion da FIOCRUZ (Salvador) que me aceitou prontamente, e suas técnicas maravilhosas: Cristina e Mel.

Ao Dr.^o Gontijo e Dr.^o Cristine do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas e a sempre gentil e carinhosa Marcinha. À Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAEP) por viabilizar minha viagem para a Argentina.

Ao Prof. Jailson Andrade (Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação/UFBA), pelo empenho na manutenção do Programa Institucional de Capacitação dos Docentes e Técnicos (PICDT) que disponibilizou a bolsa de pesquisa da CAPES. Não posso esquecer de Maisa que me ajudou longe ou perto.

A Tania e Luciana pelo inesquecível começo... Ao Laboratório de Animais Peçonhentos (UFBA), minha segunda “casa” e segunda “família”: Andréa, Robeilton, Eduardo, Marcelo, Silvinha, Raymundo, Yukari, Roberta, Tiago, Diego e Thales, com tudo o que uma família tem. À querida Katia, pelo apoio no momento mais difícil... às minhas IRMÃS Rosemere e Rosely, partes de mim...

*“NÃO DEVEMOS NUNCA ABSOLUTAMENTE NUNCA CEDER,
ONDE QUEREMOS, PODEMOS E SABEMOS TRIUNFAR,
AFINAL DEVEMOS ISTO A NÓS MESMOS.
A PERSISTÊNCIA VENCE À RESISTÊNCIA.”*

“O IMUTABILISMO”

	Pág.
RESUMO	xxvii
2. INTRODUÇÃO	31
3. OBJETIVO	39
4. JUSTIFICATIVA	43
4.1. A Importância Do Estudo Regionalizado Do Veneno De Serpentes.....	45
4.2. A Importância Do Estudo Da Variação Do Veneno De Serpentes.....	46
4.3. A Importância De Estudos Sobre A Capacidade Neutratizante Dos Antivenenos Comerciais	49
5. METODOLOGIA	53
5.1. O Veneno.....	55
5.2. Os Antivenenos.....	57
5.3. Os Reagentes.....	57
5.4. Os Animais-Teste.....	57
5.5. Caracterização Bioquímica.....	58
5.5.1. Dosagem Protéica.....	58
5.5.2. Determinação Do Perfil Cromatográfico.....	58
5.5.3. Eletroforese SDS-PAGE.....	59

5.6. Caracterização Das Atividades Biológicas.....	59
5.6.1. Atividade Tóxica.....	59
5.6.2. Atividade Proteolítica Sobre Caseína.....	60
5.6.3. Atividade Hemorrágica.....	60
5.6.4. Atividade Necrosante.....	62
5.6.5. Atividade Edemaciante.....	62
5.6.6. Atividade Pró-Coagulante.....	63
5.6.7. Atividade Coagulante.....	63
5.6.8. Atividade Fibrinogenolítica.....	64
5.6.9. Atividade Miotóxica.....	64
5.6.10. Atividade Sobre a Junção Neuromuscular.....	65
5.6.10.1. Preparação Nervo Frênico Músculo Diafragma (NFD) de Camundongo.....	65
5.6.10.2. Preparação Músculo Diafragma Cronicamente Desnervado (DCD) de Camundongo.....	66
5.6.10.3. Estudo das Alterações Morfológicas e Ultra- estruturais em Microscopia Óptica.....	67
5.7. Caracterização Imunoquímica.....	68
5.7.1. ELISA.....	68
5.7.2. Westerblot.....	69
5.8. Neutralização das atividades tóxicas.....	69

5.8.1. Soroneutralização da Atividade Hemorrágica.....	69
5.8.2. Soroneutralização da Atividade Necrosante.....	70
5.8.3. Soroneutralização da Atividade Pró-Coagulante.....	70
5.8.4. Soroneutralização da Atividade Hemolítica Indireta em Meio Líquido.....	71
5.9. Análise Estatística.....	72
6. RESULTADOS.....	73
6.1. Caracterização Bioquímica.....	75
6.2. Caracterização das Atividades Biológicas.....	79
6.3. Caracterização Imunoquímica.....	118
6.4. Neutralização das Atividades Tóxicas.....	122
7. DISCUSSÃO.....	127
7.1. Caracterização Bioquímica.....	129
7.2. Toxicidade.....	133
7.3. Caracterização das Atividades Enzimáticas e Biológicas.....	137
7.4. Caracterização Imunoquímica e Soroneutralização das Atividades Tóxicas.....	163
8. CONCLUSÃO	171
9. SUMMARY.....	177
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

	Pág.
Tabela 1: Lista das procedências da serpente <i>Bothrops leucurus</i> cujos venenos compõem as amostras: <i>pool 1</i> (Região Metropolitana do Salvador - RMS), <i>pool 2</i> (Sul/Sudeste Baiano - SB), <i>pool 3</i> (machos) e <i>pool 4</i> (fêmeas) e seus respectivos registros (Rg) no Laboratório de Animais Peçonhentos, Instituto de Biologia/UFBA (LAP/UFBA).....	56
Tabela 2: Valores da DL ₅₀ e seus limites de confiança da toxicidade do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil) e machos e fêmeas	79
Tabela 3: Atividades biológicas do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas e procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste Baiano, Bahia, Brasil.....	80
Tabela 4: Atividades enzimáticas e biológicas do veneno de <i>Bothrops leucurus</i>	81
Tabela 5: Tempo para 50% do bloqueio neuromuscular do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil) e machos e fêmeas, sob estimulação indireta	98
Tabela 6: Resposta da contratatura acetilcolínica (%) do veneno total de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil) e de machos e fêmeas, à estimulação direta da preparação músculo diafragma desnervado de camundongo	110
Tabela 7: Capacidade neutralizante (DE ₅₀) dos antivenenos comerciais antibotrópico-crotálico produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias frente às principais atividades biológicas veneno de <i>Bothrops leucurus</i> procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste Baiano, Bahia, Brasil.....	123

Tabela 8: Capacidade neutralizante (DE₅₀) dos antivenenos comerciais antibotrópico-crotálico produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias frente à atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino, do veneno de *Bothrops leucurus* machos, fêmeas e procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste Baiano, Bahia, Brasil..... 125

		Pág.
Figura 1:	<i>Bothrops leucurus</i> WAGLER, 1824.....	38
Figura 2:	Cromatografia em Superdex 75HR (Sistema FPLC) do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos (A), fêmeas (B) e procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS) (C) e Sul/Sudeste Baiano (SB) (D), Bahia, Brasil. Foram aplicadas 200 µl de cada amostra em tampão Acetato de Sódio 0,01 M, pH 5,9. Velocidade: 0,40 ml/min.....	75
Figura 3:	Cromatografia em Superdex 75HR (Sistema FPLC) do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos, fêmeas e procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e Sul/Sudeste Baiano (SB), Bahia, Brasil. Foram aplicadas 200 µl de cada amostra em tampão Acetato de Sódio 0,01 M, pH 5,9. Velocidade: 0,40 ml/min.....	77
Figura 4:	Padrão eletroforético das quatro amostras do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> (J = RMS; I = SB; H= ♂; G e F = ♀), E = <i>B. asper</i> ; D = <i>B. moojeni</i> ; C = <i>B. neuwiedi</i> ; B = <i>Crotalus durissus terrificus</i> ; A = Marcador de peso molecular.....	78
Figura 5:	Hemoglobina detectada na área hemorrágica pelos venenos de <i>Bothrops leucurus</i> procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste baiano, Bahia, Brasil.....	82
Figura 6:	Dose Mínima Coagulante em Fibrinogênio Bovino (DMC-F) do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste baiano, Bahia, Brasil e machos e fêmeas.....	83
Figura 7:	Níveis de Creatinoquinase (CK) no plasma de camundongos 3 horas após inoculação de diferentes venenos de Crotálidos da América do Sul, incluindo <i>Bothrops leucurus</i> procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e Sul/Sudeste (SB) baiano, Bahia, Brasil.....	84

Figura 8:	Cortes histológicos (A) e (B) de músculo diafragma de camundongo controle, incubado com solução Tyrode. Aumento 250 vezes.....	85
Figura 9:	Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 10 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> procedente da Região Metropolitana de Salvador, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”.....	87
Figura 10:	Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 10 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Área focal de destruição das fibras musculares.....	87
Figura 11:	Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 10 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Área focal de destruição das fibras musculares.....	88
Figura 12:	Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 10 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> macho, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Área focal de destruição das fibras musculares.....	88
Figura 13:	Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 20 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Edema intersticial.....	89
Figura 14:	Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 50 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> procedente da Região Metropolitana, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Filete nervoso íntegro.....	90

- Figura 15:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 50 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Edema intersticial, ❸ Lesões “delta”, ❹ Filete nervoso íntegro, ❺ Área focal de destruição de fibras musculares..... 90
- Figura 16:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 50 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Filete nervoso íntegro, ❺ Área extensa de destruição de fibras musculares..... 91
- Figura 17:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 50 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* macho, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Edema intersticial, ❸ Hipercontração das fibras, ❺ Área focal de destruição de fibras musculares..... 91
- Figura 18:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente da Região Metropolitana do Salvador, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Hipercontração, ❺ Área focal de destruição de fibras musculares..... 92
- Figura 19:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Lesões “delta”, ❸ Edema intersticial, ❹ Área extensa de destruição de fibras musculares..... 93
- Figura 20:** Corte histológico longitudinal de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ Hipercontração, ❷ Edema intersticial, ❸ Área focal de destruição de fibras musculares..... 93

- Figura 21:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 200 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente da Região Metropolitana do Salvador, durante 120 minutos, mostrando mionecrose severa e porções onde as fibras foram totalmente destruídas. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Área extensas de necrose de fibras musculares..... 94
- Figura 22:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 200 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Filete nervoso íntegro, ❸ Lesões “delta”, ❹ Hipercontração, ❺ Edema intersticial, ❻ Área extensa de necrose de fibras musculares..... 95
- Figura 23:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 200 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Edema intersticial, ❺ Área focal de necrose de fibras musculares..... 95
- Figura 24:** Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, após incubação de 200 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Edema intersticial, ❺ Área focal de necrose de fibras musculares, ❻ Filete nervoso íntegro..... 96
- Figura 25:** Curva dose-efeito (50% de bloqueio da resposta contrátil) do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil), em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos..... 99
- Figura 26:** Curva dose-efeito (50% de bloqueio da resposta contrátil) do veneno de *Bothrops leucurus* de machos e fêmeas, em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos..... 99

Figura 27:	Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 50 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil)	100
Figura 28:	Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 100 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil)	101
Figura 29:	Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 200 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil)	102
Figura 30:	Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 50 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas.....	103
Figura 31:	Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 100 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas	104
Figura 32:	Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 200 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas	105
Figura 33:	Efeito do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> da Região Metropolitana do Salvador sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos	107
Figura 34:	Efeito do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> do Sul/Sudoeste baiano sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos	107

Figura 35:	Efeito do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos	108
Figura 36:	Efeito do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> fêmeas sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos	108
Figura 37:	Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 10 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas	109
Figura 38:	Curva dose-efeito do bloqueio da resposta contrátil à Acetilcolina do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil), em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo, sob estimulação direta	111
Figura 39:	Curva dose-efeito do bloqueio da resposta contrátil à Acetilcolina do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas, em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo, sob estimulação direta.....	111
Figura 40:	Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 50 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil).....	113
Figura 41:	Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 100 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil).....	114
Figura 42:	Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 50 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas.....	115

Figura 43:	Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 100 µg/ml do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas.....	116
Figura 44:	Efeito do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> da Região Metropolitana de Salvador (RMS) e Sul/Sudoeste Baiano (SB) sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação direta, durante 120 minutos.....	117
Figura 45:	Efeito do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos e fêmeas sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação direta, durante 120 minutos.....	117
Figura 46:	Diluição de diferentes soros antiofídicos que diminui em 50% a A ₄₉₀ , em ELISA, referente ao veneno de <i>Bothrops leucurus</i> machos (A), fêmeas (B) e procedentes da Região Metropolitana do Salvador (C) e Sul/Sudeste baiano (D).....	119
Figura 47:	Padrão imunoelétrico das quatro amostras do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> (RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Sul/Sudeste Baiano; ♂ = machos; ♀ = fêmeas; Ba = <i>B. alternatus</i> ; PM = Marcador de Peso Molecular), frente ao soro antibotrópico-crotálico do Instituto Butantan.....	120
Figura 48:	Padrão imunoelétrico das quatro amostras do veneno de <i>Bothrops leucurus</i> (RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Sul/Sudeste Baiano; ♂ = machos; ♀ = fêmeas; PM = Marcador de Peso Molecular), frente ao soro anti- <i>B. leucurus</i> do Instituto Malbrán (A e B).....	121
Figura 49:	Demora na formação de coágulo induzido pelo veneno de <i>Bothrops leucurus</i> procedente da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste baiano e machos e fêmeas, frente ao Soro antibotrópico-crotálico (SABC) do Instituto Butantan (A), Instituto Vital Brazil (B) e da Fundação Ezequiel Dias (C).....	126

RESUMO

Este trabalho trata do estudo farmacológico do veneno de *Bothrops leucurus*, conhecida como jararaca-do-rabo-branco. Objetivou-se caracterizar suas atividades bioquímicas e imunobiológicas, como forma de avaliar o grau de soroproteção conferido pelos anti-venenos produzidos no Brasil e anti-*B. leucurus*, produzido na Argentina. Utilizou-se venenos de duas regiões geográficas da Bahia (Região Metropolitana do Salvador - RMS e Sul/Sudeste baiano - SB) e de machos e fêmeas, a fim de se estabelecer possíveis variações geográficas e sexuais. Procedeu-se a determinação da dosagem protéica, perfil cromatográfico e eletroforético, das atividades tóxica, proteolítica, edemaciante, hemorrágica, necrosante, defibrinante, pró-coagulante, miotóxica e sobre a junção neuromuscular, caracterização imunoquímica e neutralização das atividades biológicas da peçonha, frente aos soros antibotrópico-crotálico (SABC) do Instituto Butantan (IB), Instituto Vital Brazil (IVB), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e Soro anti-*B. leucurus* do Instituto Carlos Malbrán. O perfil eletroforético do veneno caracterizou-se pela presença de 4 bandas e o perfil cromatográfico por 7 picos, sendo semelhantes nos diferentes *pools*. Houve variação regional e sexual, nas atividades biológicas, já que o veneno das serpentes do SB apresentou atividades tóxica, hemorrágica, necrosante e miotóxica maior que da RMS, no entanto, a atividade coagulante desta última foi maior que o da primeira. O veneno das fêmeas foi mais coagulante que o dos machos. Todas as amostras induziram mionecrose, caracterizada por “balonização”, vacuolização, lesões “delta”, hipercontração, condensação das miofibrilas e áreas de degeneração muscular. As amostras, em concentrações a partir de 50 µg/ml, inibiram a transmissão neuromuscular, de maneira dose-dependente e irreversível (com exceção do veneno dos machos), devido às suas ações pós-juncionais. Na dose de 10 µg/ml, veneno de machos e fêmeas induziu aumento na amplitude das respostas musculares, demonstrando ação pré-sináptica. A peçonha de espécimens da RMS foi mais potente em provocar 50% do bloqueio da resposta contrátil que os da SB, assim como o veneno das fêmeas foi mais potente que dos machos. Observou-se inibição da resposta acetilcolínica nas preparações tratadas com 50 e 100 µg/ml das diferentes amostras e da amplitude da resposta muscular, de maneira dose-dependente e irreversível, com variação geográfica e sexual. O ELISA demonstrou que todos os *pools* apresentaram títulos de anticorpos frente a todos os anti-soros testados, sendo maiores frente ao soro específico, com exceção do *pool* da RMS, cuja titulação do

soro específico foi equivalente a do SABC do IB. Dentre os soros inespecíficos, o do IB foi o que apresentou maior titulação, seguido do SABC da FUNED e do IVB. Houve variação na capacidade neutralizante dos soros frente às amostras, e o SABC/IB apresentou maior reatividade cruzada frente ao veneno de machos e da RMS. Os SABC/FUNED e IVB foram melhor reconhecidos pelo veneno de machos, da RMS e SB. O Westernblot demonstrou que o veneno desta espécie apresentou reação cruzada tanto frente ao soro anti-*B. leucurus* quanto ao SABC do IB e que a reação foi mais intensa quando utilizou-se o soro específico. Todos os anti-venenos foram capazes de neutralizar as atividades hemorrágica, necrosante e hemolítica das duas amostras de veneno, apesar da variação regional observada nesta soroneutralização.

2. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, os homens têm se preocupado com os perigos causados por picadas e mordidas de insetos, aranhas, escorpiões, serpentes, peixes e outros animais, mas durante milhares de anos existiu uma completa ignorância e medo destes animais.

O acúmulo de conhecimento neste campo, através da observação e experiências de envenenamento com animais peçonhentos foi um processo lento que se iniciou no Egito antigo (aproximadamente 1600 A.C.), principalmente com os animais de interesse médico. Os estudos com veneno começaram na metade do século XIX, com Lucien Bonaparte utilizando a peçonha de *Vipera berus*. Em 1872, observou-se que existiam diferenças entre os venenos de serpentes e em 1902 identificou-se similaridades antigênicas entre as espécies.

No Brasil, o estudo do envenenamento humano começou em 1867, com a publicação, na Bahia, do clássico trabalho de Otto Wucherer, intitulado “Sobre mordeduras das cobras venenosas e seu tratamento”, na Gazeta Médica da Bahia. O estudo das peçonhas teve como precursor João Batista de Lacerda, que no século XIX, no Museu Nacional, realizou algumas pesquisas sobre a farmacologia do veneno de serpentes brasileiras. Deve-se, entretanto, a Vital Brazil (1906, 1911) o grande desenvolvimento que alcançaram as investigações sobre venenos e envenenamentos, o estudo sobre animais venenosos, a profilaxia e tratamento dos acidentes causados por serpentes, escorpiões e aranhas (Vital Brazil, 1987).

As serpentes têm merecido a atenção do homem desde os tempos mais remotos quando causavam medo e inquietude em virtude de provocarem acidentes, por vezes levando à morte (Leake, 1968). Seus venenos são os fluidos biológicos mais concentrados produzidos por vertebrados, sendo o conteúdo sólido constituído de 90% de proteínas (Stocker, 1990), das quais algumas são enzimas. Essa mistura extremamente complexa pode conter mais de 50 componentes, incluindo carboidratos, lipídios, amins biogenicamente ativas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (Iwanaga & Suzuki, 1979; Bjarnason & Fox, 1988/89; Berger & Bhatti, 1989). Os componentes inorgânicos mais frequentes são Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co, Zn, exercendo função de manter estabilidade estrutural de determinadas proteínas ou agindo como catalisadores em reações enzimáticas (Bjarnason & Fox, 1988/89).

As toxinas encontradas no veneno das serpentes são proteínas que causam interrupção de funções vitais, tais como a transmissão nervosa e atividades autonômicas. As enzimas são componentes do veneno, responsáveis por muitas atividades visíveis, relacionadas com danos patológicos, tais como necrose tissular, atividade coagulante e anticoagulante e dor. Entre as enzimas mais importantes estão a fosfolipase A₂ (PLA₂), L-aminoácidoxidase (presente em todas as peçonhas ofídicas, com exceção das serpentes marinhas) e fosfodiesterase. A diferença entre enzimas e toxinas é que, de fato, muitas toxinas não têm atividade enzimática (Bradley *et al.*, 1989).

Durante a evolução dos venenos, as primeiras substâncias ativas foram provavelmente as enzimas proteolíticas (Kardog, 1979) que auxiliavam na digestão, fazendo com que a alimentação fosse um processo mais fácil e seguro (Kochva, 1987). A presença em venenos de serpentes de enzimas como proteases, peptidases, fosfatases, esterases e lecitinases concordam com esta sugestão; e muitas destas enzimas são também encontradas em “sucos digestivos” de outros animais. Algumas delas podem ser agentes digestivos ou transformaram-se em substâncias altamente tóxicas (Zeppler, 1948, *apud* Casais-e-Silva, 1995). Estudos demonstram que toxinas não enzimáticas encontradas no veneno de serpentes da família Elapidae, se desenvolveram a partir de enzimas digestivas. Como consequência disto, existe uma hipótese de que as glândulas de veneno primeiro produziram enzimas, que já eram secretadas pelo pâncreas da serpente ancestral. Suspeita-se que o veneno das serpentes originou-se das secreções pancreáticas dos ancestrais, que apresentavam primariamente atividades fosfolipásica e ribonucleásica (Strydom, 1979).

As serpentes são portanto répteis cuja estratégia básica de alimentação envolve a subjugação de presas de tamanho relativamente grande, que não são desmembradas nem mastigadas. Enquanto métodos mecânicos, tais como a constricção, podem dominar a presa, o veneno é essencial para facilitar a deglutição e a digestão da mesma. Este último processo é facilitado por secreções digestivas que podem ser introduzidas dentro da presa, levando-a a morte e são distribuídas pela circulação do animal, que acelera o processo digestivo (Minton & Weinstein, 1986). Savitsky (1980, *apud* Minton & Weinstein, 1986) considera esta, a chave adaptativa que determinou o sucesso das modernas serpentes, que evoluiu em uma variedade de formas do corpo e mecanismos locomotores, enquanto que

reteve sua habilidade de ingerir presas comparativamente grandes, que deve ter ocorrido no Mioceno, o período de maior evolução deste grupo.

Para Khova (2000), a adaptação das serpentes para engolir presas grandes pela aquisição de um crânio cinético, um conjunto complexo de músculos na cabeça e uma série extensiva de glândulas orais, representam pontos importantes que podem estabelecer uma conexão com a evolução destes animais.

Segundo a estimativa de Bjarnason & Fox (1988/89) das 2000 a 2500 espécies de serpentes existentes no mundo, somente cerca de 200 são perigosas para o homem. As serpentes brasileiras de importância médica pertencem às famílias Viperidae, representada pelos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Lachesis* (surucucus) e *Crotalus* (cascavéis) e Elapidae, representada pelo gênero *Micrurus* (corais).

As viperídeas, abrigam cerca de 30 gêneros e 230 espécies (Vidal, 2000) e representam um grupo relativamente bem definido que é caracterizado por presas grandes, móveis, totalmente canaliculadas e recobertas por uma bainha, inseridas em uma maxila reduzida e com grande capacidade de rotação. Elas aparentemente evoluíram de serpentes colubrídeas com dentes maxilares posteriores grandes e parcialmente canaliculados, pela supressão do dente maxilar anterior, encurtamento do osso e fechamento completo do canal de veneno (Minton & Weinstein, 1986). Segundo Vidal (2000), este sistema de presas anteriores em algumas serpentes Atractaspididae, todas as Elapidae e todas as Viperidae, evoluiu em alguns momentos independentes e apareceram muito cedo dentro dos Colubroidea. A família Viperidae é facilmente subdividida em duas sub-famílias: Crotalinae e Viperinae, com ou sem fosseta loreal, respectivamente, já que nenhuma forma intermediária existe. O veneno destes dois subgrupos de serpentes parece ter uma grande quantidade de antígenos em comum.

No Brasil, a subfamília Crotalinae abrange os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Lachesis* (surucucu ou pico-de-jaca) e *Bothrops* (jararacas). Estas últimas são encontradas em todo o território nacional e são responsáveis por 90% dos envenenamentos, sendo o acidente de maior importância epidemiológica no País (Puerto, 1992; Brasil, 1999). Baseado na estimativa do Ministério da Saúde, devem ocorrer anualmente em média 18.000

acidentes botrópicos, com letalidade em torno de 0,6% nos casos tratados. A frequência desses acidentes no período de 1990-1993 foi 73,1% e a letalidade 0,31% (Brasil, 1999).

Na Bahia, estudos epidemiológicos realizados por Rodrigues & Machado (1987) no ano de 1985 demonstraram que em 779 dos acidentes ofídicos, o gênero *Bothrops* foi responsável por 94%, seguido pelos gêneros *Crotalus* (4,0%), *Lachesis* (1,1%) e

Micrurus (1,0%), sendo a letalidade 2,6%. Em 1986, dos 1.358 acidentes registrados, *Bothrops* continuou sendo o gênero responsável pelo maior percentual de acidentes e óbitos (94% e 62%, respectivamente) (Rodrigues *et al.*, 1988). Segundo Carmo (1994), a frequência de óbitos observada durante este período refletiu a chamada "crise do soro antiofídico" que o Brasil sofria, devido ao fechamento de um dos laboratórios produtores de soros, levando a um déficit na produção nacional de imunobiológicos. Estudos realizados por Carmo *et al.* (1995) demonstraram que nos anos de 1991 e 1992, os acidentes por *Bothrops* continuaram com um maior percentual (83,5% e 84,5%), seguidos por *Crotalus* (6,3% e 4%), *Lachesis* (1% e 0,9%) e *Micrurus* (0,8% e 0,7%). Houve, no entanto, uma diminuição na letalidade (1,1%).

O Centro de Informações Antiveneno da Bahia, registrou no ano de 1999, 2.535 acidentes ofídicos (incluindo as não peçonhentas) na Bahia, dos quais 84% deles, provocados pelo gênero *Bothrops* (Bahia, 1999).

As jararacas habitam, de preferência, ambientes úmidos (como matas e áreas cultivadas), locais de proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha, etc.), zonas rurais e periferia de grandes cidades. Têm hábitos noturnos ou crepusculares e são consideradas as serpentes mais agressivas encontradas no Brasil, quando se sentem ameaçadas, disferindo botes sem produzir ruídos (Puerto, 1992; Brasil, 1999). O veneno botrópico apresenta 3 ações principais (proteolítica, coagulante e hemorrágica). Estas atividades são responsáveis por causar em vítimas humanas, manifestações locais como dor e edema, acompanhado ou não de equimose, necrose e abscesso, que podem levar à amputação do membro atingido. Além disso, podem provocar manifestações sistêmicas, com alterações da coagulação sanguínea, sangramento ou hemorragia, choque e

insuficiência renal (Ribeiro & Jorge, 1990). Podem ocorrer náuseas, vômitos, sudorese, hipotensão arterial e, mais raramente choque (Brasil, 1999).

Algumas espécies deste gênero apresentam maior importância por sua ampla distribuição geográfica como por exemplo, *B. atrox* (principalmente na região Norte), *B. moojeni* (Brasil Central incluindo as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul), *B. jararaca* (regiões Sul, Sudeste e Sul da Bahia) e *B. erythromelas* e *B. leucurus* (principalmente na região Nordeste) (Brasil, 1999).

A serpente *Bothrops leucurus* (Figura 1) é conhecida popularmente na Bahia, quando filhote, como jararaca-do-rabo-branco e/ou caiçaca, e quando adulta, como malha-de-sapo, cabeça-de-capanga, jaracuçu, jararacuçu, jaracuçu-de-quatro-ventas, caiçaca, patrona e/ou jararaca. Ocorre no Nordeste e Sudeste do Brasil, do estado do Ceará até o Espírito Santo, em ambientes de clima úmido (60 a 20 mm), úmido a sub-úmido (20 a 0 mm) e seco a sub-úmido (0 a -20 mm) (Porto & Teixeira, 1995; Lira-da-Silva *et al.*, 1996a; Duarte *et al.*, 2000). A sua faixa de distribuição vertical na Bahia vai do nível do mar (na Região Metropolitana do Salvador) até cerca de 472 m (no Chapadão Ocidental do São Francisco). Lira-da-Silva *et al.* (1996a) assinalam a ocorrência desta espécie em praticamente todas as regiões do estado da Bahia, com exceção do vale Sanfranciscano, caracterizado por ambiente exclusivamente de caatinga.

É uma espécie terrícola, de médio porte (250-1840 mm) e a composição da dieta caracteriza-se por lagartos (*Cnemidophorus* sp, *C. ocellifer*, *Phylopezus* sp, *P. pollicaris*, *Tropidurus* sp, *T. hispidus* e Teiidae) e anfíbios (Hylidae e Anura) como alimento preferencial dos filhotes e roedores (Muridae) dos adultos. Nos jovens machos, a parte distal da cauda branca ou amarelada, indica o uso de engodo caudal, para atrair presas insetívoras como lagartos e anfíbios, sendo portanto fácil a distinção sexual nesta fase do desenvolvimento, já que as fêmeas possuem a ponta da cauda de coloração cinza (Lira-da-Silva *et al.*, 1996b).

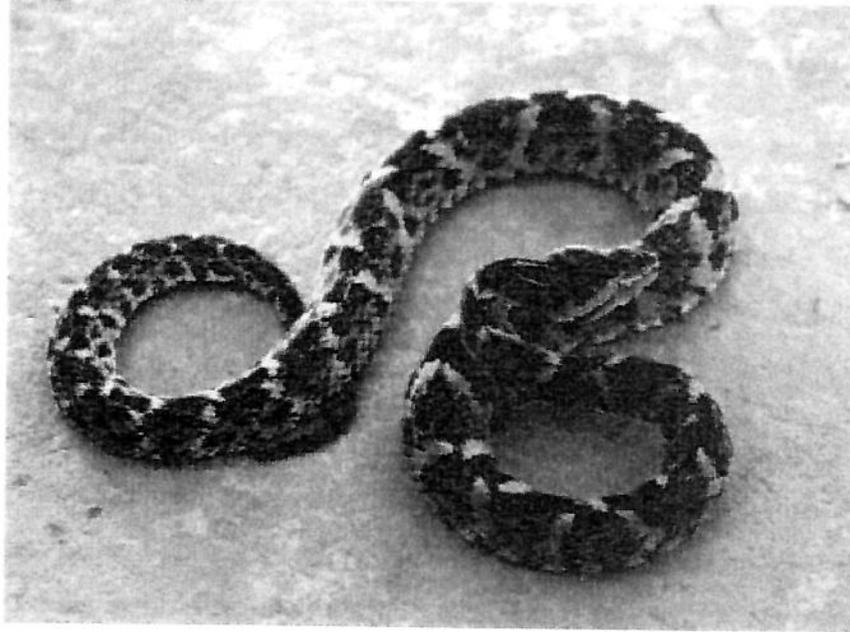


Figura 1: *Bothrops leucurus* WAGLER, 1824.

Seu veneno caracteriza-se por conter 89,9% de proteína, alto conteúdo de metais como Zn, Ca, Cl, Cr, Na e Se e quantidades média de K, Sb e Br (Lira-da-Silva *et al.*, 1996c; Vasconcelos *et al.*, 1996). Apresenta alta atividade fibrinogenolítica, proteolítica, hemorrágica e edemaciante e baixa atividade coagulante quando comparado com *B. jararaca* (veneno referência nacional para produção de soros anti-botrópicos) (Sanchez *et al.*, 1992; Lira-da-Silva *et al.*, 1996c).

Na Região Metropolitana de Salvador, *Bothrops leucurus* é a principal espécie causadora de acidentes (Lira-da-Silva & Nunes, 1993; Lira-da-Silva *et al.*, 1994; Lira-da-Silva, 1996). Esta serpente determina uma alta frequência de sinais locais (dor, edema e necrose), alterações hematológicas e da coagulação, hemorragias, alterações renais, bem como distúrbios neurológicos (visão turva, tremores, cefaléia e tontura), raros em acidentes botrópicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

- Estudar os principais efeitos farmacológicos do veneno da serpente *Bothrops leucurus*, considerando possíveis variações geográficas e sexuais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar bioquimicamente o veneno de *B. leucurus*, especificamente quanto à dosagem protéica, perfil cromatográfico e eletroforético;
- Caracterizar as atividades biológicas do veneno da serpente *B. leucurus*, especificamente as atividades tóxica, proteolítica, hemorrágica, necrosante, pró-coagulante, coagulante, fibrinolítica, edemaciante e miotóxica;
- Caracterizar os efeitos do veneno de *B. leucurus* sobre a junção neuromuscular de mamíferos;
- Caracterizar as atividades imunoquímicas do veneno da serpente *B. leucurus*, especificamente utilizando ELISA e Westernblot;
- Avaliar o grau de soroproteção conferido pelos anti-venenos produzidos no Brasil e anti-veneno específico para *B. leucurus* produzido na Argentina, frente ao veneno desta serpente.

4. JUSTIFICATIVA

4.1. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO REGIONALIZADO DO VENENO DE SERPENTES:

O ofidismo tem se constituído ao longo destes anos, como um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, dada à incidência, à gravidade e às seqüelas que causam (Barraviera, 1993; Brasil, 1999). Estas seqüelas variam de acordo com a proporção e gravidade do caso, devido à ação destruidora dos tecidos causada pelo veneno, principalmente de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis*. Neste caso, o veneno de muitas espécies tem a habilidade para causar, em adição a um grande número de efeitos tóxicos sistêmicos, alterações surpreendentes no local da picada, deixando variáveis graus de danos ao tecido (Ohsaka, 1979, *apud* Lomonte, 1994). Os principais efeitos locais decorrentes da ação do veneno das serpentes são hemorragia, mionecrose e edema. A magnitude destes efeitos depende do tipo do veneno, da via de inoculação e dose de veneno injetada. Em casos graves, o dano tecidual pode deixar sérias seqüelas com perda tecidual permanente, incapacidade e amputação (Rosenfeld, 1971; Nishioka & Silveira, 1992; Ho *et al.*, 1986 e Kerrigan, 1991, *apud* Lomonte, 1994).

Sabe-se hoje, que o veneno compreende uma mistura complexa de diversas enzimas proteolíticas e diversos peptídeos com ação sobre os sistemas circulatório, respiratório, excretor e nervoso; seu estudo tem revelado substâncias promissoras em terapêutica, sendo considerado importante meio para atingir fins relevantes na área da medicina, farmacologia e fisiopatologia. No entanto, das espécies que ocorrem no Nordeste, pouco se sabe; as Instituições que se situam no Centro-Sul do País (Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias e Instituto Vital Brazil) detêm tradicionalmente as investigações sobre as peçonhas e têm ao longo do tempo, contribuído nacional e internacionalmente no que diz respeito aos soros anti-venenos e aos produtos derivados do próprio veneno aproveitados na indústria farmacêutica.

Os estudos regionalizados sobre os diversos tipos de veneno são escassos. Alguns venenos botrópicos como *B. jararaca* e *B. atrox* tem sido extensivamente estudados (Hofmann & Bon, 1987; Mandelbaum *et al.*, 1988; Kamiguti & Cardoso, 1989), no entanto, devido a escassez de grupos de trabalho na região Nordeste do país,

alguns venenos de suma importância epidemiológica (*B. leucurus*) e que podem ser fontes de proteínas que permitam o desenvolvimento de novas drogas (*B. bilineata*, *B. leucurus* e *B. pirajai*), foram escassamente pesquisados. Ressalta-se os estudos que estão sendo realizados em Pernambuco com *B. erythromelas*, pelo grupo da Dr.^a Míriam Camargo Guarnieri.

Dessa maneira, o estudo e caracterização do veneno de *B. leucurus* poderá auxiliar a classificação taxinômica, distribuição geográfica e tratamento de acidentes, possibilitar conhecimento necessário ao desenvolvimento de novas drogas, além de resgatar a lacuna no conhecimento do veneno desta serpente. Isso não só reverterá como auxílio no tratamento dos acidentes, como possibilitará o conhecimento necessário ao início dos processos de purificação de toxinas, úteis no entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na coagulação sangüínea, inflamação, hemorragia, além do possível desenvolvimento de drogas anti-trombóticas, coagulantes, hipotensoras ou como reagentes de diagnóstico.

4.2. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA VARIAÇÃO DO VENENO DE SERPENTES:

A variação no veneno de serpentes foi observada pela primeira vez em casos clínicos na antigüidade, atribuída a fatores extrínsecos. Aristóteles em "*História Animalium*" acreditava que o calor era um fator que predisponha a um aumento na toxicidade do veneno de víboras, quando comparado com os envenenamentos na Grécia e Norte da África, mas a descrição das espécies nunca foi dada (Chippaux *et al.*, 1991).

Quanto às variações intraespecíficas, Ambroise Pare, em 1607 (*apud* Furtado, 1987), emitiu a opinião de que a toxicidade do veneno de víbora deveria ser dependente de vários fatores, notadamente localidade, temperatura, grau de umidade, estação do ano e alimentação.

O veneno das serpentes é uma mistura complexa de componentes que têm uma diversidade de atividades sobre a presa e em vítimas humanas. Estes componentes

representam principalmente proteínas biologicamente ativas, com função primária de matar, imobilizar a presa e também auxiliar na digestão. Nesse sentido, cada população de serpente poderá ter uma necessidade particular e a mistura proporcional dos componentes e suas atividades, será em parte, determinada pelo tipo de presa preferencial. A necessidade da especialização do veneno pode ocorrer independentemente da variação morfológica e pode conter uma variedade de ações: neurotóxica, cardiotoxica, miolítica, coagulante, hemostática, nefrotóxica e hepatotóxica (Chippaux *et al.*, 1991).

Segundo Sasa (1999), o fato do veneno ter um duplo papel de matar e digerir a presa, bem como as diferenças geográficas na composição da peçonha, podem refletir adaptações para presas locais diferentes. Além disso, outras forças evolutivas que não a seleção sobre as presas locais, podem também ser a causa da variação interpopulacional do veneno.

A variação na composição do veneno de serpentes existe e os médicos apontam-na nos achados clínicos. Por exemplo, a sintomatologia e gravidade dos acidentes provocados por *B. leucurus*, demonstram que a variação sexual e ontogenética parecem ser importantes para esta espécie, já que os acidentes diferem marcadamente dentro da mesma população, onde as fêmeas provocaram acidentes mais graves que machos (17,7% e 9,6%, respectivamente) e adultos determinaram uma gravidade maior que filhotes (22,4% e 7,6%, respectivamente) (Lira-da-Silva, 1996, Lira-da-Silva & Carvalho, 1998, 1999). Para alguns autores (Willemse, 1978; Vieira *et al.*, 1988; Adame *et al.*, 1990; Gutierrez, *et al.*, 1990; Chippaux *et al.*, 1991; Williams & White, 1992; Santos *et al.*, 1993; Daltry *et al.*, 1996a, 1996b; Wüster *et al.*, 1998; Sasa, 1999), a questão da variação do veneno de serpentes tem sido estudada de muitos ângulos e tem sido relatadas mudanças de acordo com a idade, origem geográfica, sexual, sazonal, habitat, dieta, coloração do veneno e até mesmo com o método de sua extração e estocagem, além de condições de alimentação, saúde e manutenção do animal em cativeiro. No entanto, a maioria concorda que a composição da peçonha tem controle genético bastante importante.

Segundo Kochva (2000), o problema da regulação do desenvolvimento das glândulas de veneno e secreção de enzima/toxina, ainda não está resolvido. Várias glândulas têm genes reguladores comuns com outros sistemas e que influenciam diferentes órgãos e seu desenvolvimento.

Uma das perguntas exploradas neste trabalho foi a seguinte "Existe variação regional e sexual na toxicidade, perfil cromatográfico e eletroforético e nas atividades biológicas do veneno da espécie *Bothrops leucurus*?".

Os achados desta pesquisa terão implicações importantes na terapia do ofidismo. A variação na composição de venenos de serpentes pode influir nas propriedades imunológicas e tornar possível a produção de um anti-veneno mais efetivo contra estas peçonhas. É necessário que seja mantido um plantel que contemple espécies de serpentes procedentes de diferentes regiões, machos e fêmeas, além de filhotes e adultos.

Terapêuticamente, permitirá um tratamento mais eficaz nas vítimas picadas, com a utilização de soro específico e terapêutica sintomática apropriada, pelo reconhecimento e caracterização do envenenamento provocado pela espécie de determinada região, idade, sexo, etc.

Importante também na preparação de frações farmacologicamente ativas dos venenos secos como instrumento para a pesquisa, já que é essencial que sejam escolhidos venenos que sejam ricos em componentes de interesse, o que aumentará o sucesso da pesquisa pela seleção de grupos que naturalmente sintetizam altas quantidades destes componentes farmacológicos.

A variação intra e interespecífica do veneno pode ter um impacto importante na pesquisa básica e no tratamento de acidentes, pela seleção do antiveneno apropriado que neutralize os efeitos farmacológicos e enzimáticos desta toxinas (Gutiérrez *et al.*, 1980 e Otero *et al.*, 1995, *apud* Sasa, 1999).

Finalmente, a importância da variação dos venenos se estende para a zoologia, no estudo das relações filogenéticas de serpentes em nível de espécies e subespécies e também para a química dos venenos.

4.3. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DOS ANTIVENENOS COMERCIAIS, FRENTE AO VENENO DE SERPENTES:

Os envenenamentos humanos por picadas de serpentes constituem um problema de saúde pública na América. O soro antiofídico foi descoberto em 1894 pelos franceses Phisalix & Bertrand, mas deve-se ao também francês, Calmette, no mesmo ano, a autoria da preparação do primeiro soro no Instituto Pasteur (Brygoo, 1982). No entanto, a especificidade do antiveneno, foi descoberta memorável do brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha em 1911, apresentada em seu trabalho clássico “A defesa contra o ofidismo” (Brazil, 1911).

Desde esta época, vários países tem empreendido na produção de anti-venenos de origem equina para atender este problema sanitário (Chippaux & Goyffon, 1983 *apud* Gutiérrez, 1990). Classicamente, como parte do controle da qualidade a que são submetidos estes anti-venenos, é analisada sua capacidade para neutralizar o efeito letal dos venenos de cada região, mediante uma prova de laboratório, onde o veneno e anti-veneno são incubados previamente à sua administração em ratos (OPS, 1977 *apud* Gutiérrez, 1990).

O complexo de alterações produzidas pelos venenos de serpentes gera a necessidade de avaliar a capacidade dos anti-venenos para neutralizar diversos efeitos farmacológicos e não somente a letalidade (WHO, 1981).

Estudos de reatividade cruzada por exemplo, prestam-se seguramente para determinar similaridades antigênicas entre as proteínas de diferentes venenos de serpentes, quando o antiveneno de uma espécie neutraliza parcialmente as atividades do veneno de outras espécies. Uma das aplicações mais populares dos resultados obtidos da reatividade sorológica cruzada é, sem dúvida, sua aplicação em estudos de filogenia e evolução das serpentes. Como é bem conhecido que a relação entre as serpentes venenosas ainda não está bem caracterizada, existem algumas tentativas de determinar a filogenia das serpentes com base nas seqüências de proteínas conservadas do veneno, tais como a PLA₂, neurotoxinas e citotoxinas. Este tipo de análise assume que proteínas relacionadas evoluíram por divergência de uma proteína ancestral simples, podendo-se inclusive estimar o tempo em que ocorreu a convergência entre duas espécies, por exemplo (Berger & Bhatti, 1989).

Para estes estudos assume-se que o grau de reatividade cruzada está diretamente relacionado com a distância evolutiva entre as serpentes estudadas. No entanto, alguns estudos mostram que este tipo de conclusão evolutiva pode não ser válido. A composição do veneno de *Bothrops atrox*, por exemplo, varia de indivíduo para indivíduo, dependendo da idade e os componentes da peçonha de *Crotalus atrox* podem variar de uma área geográfica para outra (Berger & Bhatti, 1989).

No período de 1985 a 1987, a Bahia apresentou a maior incidência de acidentes ofídicos registrados no País, assim como o maior percentual de óbitos, devido à crise da escassez de soros específicos e às alterações ecológicas provocadas pela construção de barragens em áreas extensas do Estado. Foi ainda registrado que diferentes regiões da Bahia, apresentavam características particulares no seu padrão de acidentes ofídicos, sendo que de maneira geral, o gênero *Bothrops* foi responsável pela maioria dos envenenamentos (94%) e óbitos (62,5%) (Rodrigues *et al.*, 1988). A este respeito, Lira-da-Silva & Nunes (1993), Lira-da-Silva *et al.* (1994) e Lira-da-Silva (1996) relataram que na Região Metropolitana de Salvador, *Bothrops leucurus* é a principal espécie causadora de acidentes, ao lado da *Bothrops neuwiedi lutzi* (Lira-da-Silva *et al.*, 2000b) e *B. jararaca*.

Uma outra pergunta explorada neste trabalho foi a seguinte "Os soros antibotrópico-crotálico produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias neutralizam de maneira mais eficaz o veneno da espécie *Bothrops leucurus* comparado com o soro anti-*Bothrops leucurus* do Instituto Carlos Malbrán (Argentina)?".

O veneno de *B. leucurus* não consta no *pool* de venenos para a preparação de soros anti-ofídicos produzidos comercialmente no Brasil, sendo utilizado um *pool* de cinco espécies: *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*.

Deve-se então avaliar se as doses recomendadas pelo CIAVE são altas por conta do baixo poder neutralizante do anti-veneno produzido ou por outros fatores tais como dificuldade no acesso aos postos de saúde, demora no atendimento médico, precárias condições de cuidado ao paciente, entre outros, que possam ser responsáveis pelo alto percentual de acidentes moderados a graves e coeficiente de letalidade dos acidentes botrópicos.

5. METODOLOGIA

5.1. O VENENO:

O veneno da serpente *B. leucurus* foi obtido pelo método de pressão manual das glândulas dos animais (Belluomini, 1968), mantidos em cativeiro no Laboratório de Animais Peçonhentos (LAP – Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia). As amostras de veneno foram secas em dessecador à vácuo, pesadas em balança analítica, enfrascadas e mantidas a -20° C.

Foram utilizadas 4 amostras incluindo os seguintes “pools” de veneno: *pool* 1: veneno de 4 serpentes procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS), *pool* 2: veneno de 11 serpentes procedentes da região Sul/Sudeste Baiano (SB), *pool* 3: veneno de 5 serpentes machos e *pool* 4: veneno de 4 serpentes fêmeas (Tabela 1).

Tabela 1: Lista das procedências das serpentes *Bothrops leucurus* cujos venenos compõem as amostras: *pool* 1 (Região Metropolitana do Salvador – RMS), *pool* 2 (Sul/Sudeste Baiano – SB), *pool* 3 (Machos - ♂) e *pool* 4 (Fêmeas – ♀) e seus respectivos registros (Rg) no Laboratório de Animais Peçonhentos, Instituto de Biologia/UFBA (LAP/UFBA).

Amostra de veneno	Registro no LAP/UFBA	Procedência
RMS	950	Cabula, Salvador, Bahia
	1296	Fazenda Grande, Salvador, Bahia
	1824	Cabula, Salvador, Bahia
	1830	Simões Filho, Bahia
SB	1431	Camamu, Bahia
	1443	Camamu, Bahia
	1464	Camamu, Bahia
	1468	Camamu, Bahia
	1469	Camamu, Bahia
	1807	Valença, Bahia
	1808	Valença, Bahia
	1809	Valença, Bahia
	1810	Valença, Bahia
	1812	Valença, Bahia
	1814	Valença, Bahia
♂	1147	Alagoinhas, Bahia
	1148	Mata de São João, Bahia
	1431	Camamu, Bahia
	2944	Vera Cruz, Itaparica, Bahia
	2455	Eunápolis, Bahia
♀	1148	Mata de São João, Bahia
	1836	Simões Filho, Bahia
	2682	Centro Industrial de Aratu, Simões Filho, Bahia

5.2. OS ANTI-VENENOS:

Os anti-venenos utilizados neste trabalho foram: I) Soro antibotrópico-crotálico produzido no Instituto Butantan (lote 9810123/A, validade 19/10/2001); II) Soro antibotrópico-crotálico produzido no Instituto Vital Brazil (lote 981103, validade novembro/2001); III) Soro antibotrópico-crotálico produzido na Fundação Ezequiel Dias (lote 960821-42, validade 28/09/2001) e IV) Soro anti-*Bothrops leucurus* produzido em janeiro/2000 no Instituto Carlos R. Malbrán, Argentina.

5.3. OS REAGENTES:

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.4. OS ANIMAIS-TESTE:

Foram utilizados como animais-teste, machos de camundongos albinos cepa CF-1 (*Mus musculus*) de 18-22 g (para os testes de atividade tóxica, segundo Meier & Theakston, 1986, miotóxica e suas respectivas provas de soroneutralização) e ratos Wister (*Rattus rattus*) de 200 a 250 gramas (para os testes das atividades hemorrágica, necrosante e suas respectivas provas de soroneutralização), mantidos em biotério apropriado do Instituto Malbrán com água e ração, *ad libitum* e em período de luz de 6 a 18 h.

Foram utilizados como animais-teste, machos de camundongos albinos (*Mus musculus*) de 18-22 g (para os testes de atividade tóxica - segundo Weil, 1953, edemaciante, defibrinogenante, hemorrágica e necrosante) e 25-35 g (para as preparações nervo frênico diafragma e diafragma cronicamente desnervado de camundongo), fornecidos pela Central de Bioterismo (UNICAMP) e no Biotério Central da Universidade Federal de Pernambuco, mantidos com água e ração, *ad libitum* e em período de luz de 6 a 18 h.

5.5. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA:

5.5.1. Dosagem Protéica:

O Conteúdo protéico do veneno de *B. leucurus* foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), modificado por Miller (1959). Um (1) ml de reagente de tartarato de cobre (Na_2CO_3 10%, NaOH 0,5M, CuSO_4 5%) de sódio e de potássio 1%, na proporção de 100:1:9, respectivamente, foi adicionado a 0,2 ml das amostras nas concentrações de 67,5, 125, 250 e 500 $\mu\text{g/ml}$, mantendo-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 3 ml de reagente de Folin Ciacateau 0,17N, incubando-se a mistura a 50°C por 10 minutos. Após resfriamento, determinaram-se as densidades ópticas a 650 nm. Para a estimativa da concentração protéica, a albumina foi utilizada como padrão.

5.5.2. Determinação do Perfil Cromatográfico:

Para análise da massa molecular das frações protéicas dos venenos de *Bothrops leucurus* procedentes da RMS, SB, machos e fêmeas, em sistema de tampão não desnaturante, as amostras foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em equipamento Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), Pharmacia Biotech.

Foram aplicados 200 μl de cada amostra de veneno (8,5 mg/0,4 ml, diluídos em tampão) em coluna de Superdex 75HR 300 x 10 mm (Pharmacia), equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,01M, pH 5,9 e utilizando para eluição fluxo 0,40 ml/min. Foram observados apenas os perfis de cada veneno.

Este experimento foi realizado no Laboratório de Ionologia do Dr.º Juan Vidal, Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernadino Rivadavia”.

5.5.3. Eletroforese SDS-PAGE:

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizada com o objetivo de definir os padrões protéicos das amostras do veneno de *Bothrops leucurus* procedentes RMS, SB, machos e fêmeas, de acordo com o método de Laemmli (1970).

O SDS-PAGE em gel de acrilamida de 12,5%, pH 8,8, foi realizado em placas de vidro utilizando gel de concentração 2,5% em tampão Tris-HCl (0,5M, pH 6,8) e gel de separação em tampão Tris-HCl, pH 8,8, nas proporções dos reagentes: Acrilamida, Bisacrilamida, Tris-HCl 0,5M pH 6,8, Tris-HCl 0,5M pH 8,8, SDS 12,5%, Sacarose, Água destilada, TEMED (N,N,N',N' Tetrametil etilenodiamida) e Persulfato de amônio a 10%.

Foram aplicadas em cada poço 20 µl das amostras de veneno diluídas em uma concentração de 2 mg/ml. A separação foi feita utilizando uma amperagem de 20 mA e voltagem de 150 V. Como amostras padrão utilizaram-se o veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* e das jararacas *Bothrops alternatus*, *B. moojeni*, *B. asper* e *B. neuwiedi*.

Depois da separação eletroforética, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250 (Bio Rad) 0,25%, metanol 50% e ácido acético 12%, por 48 horas à temperatura ambiente. O descorante utilizado foi o ácido acético 2% e metanol 5%.

5.6. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS:

5.6.1. Atividade Tóxica:

A atividade tóxica do veneno foi avaliada pela determinação da DL₅₀ e seus limites de confiança (95%) em camundongos machos (18-22 g), segundo Weil (1953). Diferentes concentrações do veneno (16, 24, 36, 54 e 81 mg/kg) foram dissolvidas em 0,85% de NaCl, inoculadas por via intravenosa, em um volume de 0,5 ml e as mortes foram anotadas após um período de observação de 24 h. Foram utilizados seis animais para cada dose.

A toxicidade foi também avaliada segundo o método de Meier & Theakston (1986), utilizando-se camundongos (cepa CF-1, 18-22 g, n = 10 animais). Foram injetadas intraperitonealmente doses 2,5 a 40 µg do veneno de serpentes *Bothrops leucurus* procedentes da RMS, SB, machos e fêmeas, dissolvido em 0,85% de NaCl (0,15M) e o tempo de morte, depois da injeção de veneno, foi medido. A DL₅₀ intraperitoneal foi calculada a partir da representação gráfica da dose em função da [dose/tempo de morte]. A análise por regressão linear se efetuou utilizando o Software Prisma (Graf Pad Software, Inc. San Diego, Califórnia, U.S.A.).

5.6.2. Atividade Proteolítica sobre Caseína:

A atividade proteolítica do veneno de *B. leucurus* foi determinada pelo método de Lomonte & Gutiérrez (1983), que preconizaram a utilização da caseína como substrato. Determinadas concentrações de veneno (50, 100, 150, 200, 300 e 400 µg/ml) foram incubadas com 2 ml de caseína 1%, em tampão fosfato 0,1M, pH 8,0 por 30 minutos à 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 4 ml de ácido tricloroacético 5% e após 30 minutos, à temperatura ambiente, o precipitado foi removido por centrifugação a 4500 rpm, durante 15 minutos. Os produtos ácido-solúveis foram quantificados por absorvância em 280 nm e a atividade caseinolítica específica, expressa em atividade por mg de veneno (U/mg).

5.6.3. Atividade Hemorrágica:

A atividade hemorrágica foi determinada segundo a técnica descrita por Kondo *et al.* (1960), pela medição, com paquímetro (0,05 mm de precisão), da área hemorrágica produzida pelo veneno na pele de ratos (cepa Wister, 200-250 g, 4 animais por dose). Foram injetadas intradermicamente doses de 12,5, 25, 50, 100, 200 e 300 µg do veneno de serpentes *Bothrops leucurus* procedentes da RMS e SB, em um volume de 100 µl da concentração de veneno diluído em NaCl 0,15M. Três horas depois do inóculo, os animais foram sacrificados com éter etílico, a pele, previamente depilada, foi retirada e estendida entre placas de vidro e a área hemorrágica medida.

A Dose Mínima Hemorrágica (DMN) foi considerada como a menor quantidade de veneno necessária para produzir uma área hemorrágica de 10 mm de diâmetro, 3 h após o inóculo.

Esta atividade foi também testada utilizando-se o método de Kondo *et al.* (1960), modificado por Theakston & Reid (1983). Grupos de 6 camundongos (20-25 g) foram inoculados, no dorso previamente depilado, por via intradérmica, com diferentes doses de veneno (300, 600, 900, 1200 e 1500 µg/ml), sem separação por *pools*. A hemorragia foi quantificada pelo produto das medidas transversal e longitudinal da lesão e a partir daí, determinou-se a atividade hemorrágica específica (AHE), expressa em atividade por mg de veneno (U/mg).

A atividade hemorrágica foi quantificada ainda, pelo método de de Roodt *et al.* (2000), pela dosagem do conteúdo de hemoglobina presente na área hemorrágica.

Três horas depois do inóculo, os animais foram sacrificados e a área hemorrágica da pele foi retirada e estocada em tubo de ensaio de 10 ml, contendo solução fisiológica (NaCl 0,15M). As amostras permaneceram por 72 horas à -4°C. Após este período as peles foram retiradas, as soluções foram centrifugadas, por 15 minutos, a 1500 rpm.

Os sobrenadantes foram cuidadosamente retirados e a quantidade de hemoglobina foi medida em espectrofotômetro Metrolab M1700 V1.05R, à densidade óptica de 550 nm. O cálculo da quantidade de hemoglobina (Hb) liberada na área hemorrágica (Absorbância 550 nm), segundo a dose de veneno (µg), foi obtida por análise de regressão linear da curva padrão, onde se utilizou o Software Prisma (Graf Pad Software, Inc. San Diego, Califórnia, U.S.A.).

5.6.4. Atividade Necrosante:

A atividade necrosante foi determinada pelo inóculo de diferentes concentrações (12,5, 25, 50, 100, 200 e 300 µg) de veneno de serpentes procedentes da RMS e SB, intradermicamente no dorso de ratos (cepa Wister, 200-250 g, 5 a 4 animais por dose), previamente depilados, segundo Theakston & Reid (1983). Após 72 horas, a pele dos animais foi retirada, estendida entre placas de vidro e a área necrótica medida com paquímetro (0,05 mm de precisão). A Dose Mínima Necrosante (DMN) foi considerada como a menor quantidade de veneno necessária para produzir uma área necrótica de 10 mm de diâmetro, 72 h após o inóculo.

Esta atividade foi também avaliada utilizando-se o mesmo método, com a diferença de que foi testada em grupos de 6 camundongos (20-25 g), que foram inoculados, no dorso previamente depilado, por via intradérmica, com diferentes doses de veneno (300, 600, 900, 1200 e 1500 µg/ml), sem separação por *pools*. A necrose foi quantificada pelo produto das medidas transversal e longitudinal da área necrótica e a partir daí, determinou-se a atividade necrosante específica (AHE), expressa em atividade por mg de veneno (U/mg).

5.6.5. Atividade Edemaciante:

A capacidade do veneno de induzir edema foi quantificada pelo método de Yamakawa *et al.* (1976), modificado por Sanchez *et al.* (1992), pela determinação da DE₃₀, que corresponde à dose de veneno que produz um aumento de 30% no peso da pata.

Grupos de 6 camundongos (18-22 g), foram inoculados com diferentes doses de veneno (5, 10, 20, 30, 40 e 80 µg/ml), sem separação por *pools*, em uma das patas posteriores e com salina na pata contralateral. Quinze minutos após o inóculo, os animais foram sacrificados, as patas cortadas na altura da articulação e pesadas em balança analítica. A percentagem de aumento de peso da pata causada pelo edema, foi calculada pela expressão:

$$E = (Pe - Pc)/Pe \times 100,$$

Onde (E) corresponde a percentagem de edema, (Pe) ao peso da pata experimental (veneno) e (Pc) ao peso da pata controle (salina).

5.6.6. Atividade Pró-coagulante:

A atividade pró-coagulante foi avaliada pela determinação da dose mínima coagulante (DMC), definida como a dose de veneno que produz a coagulação do substrato em 60 segundos. Utilizou-se solução de fibrinogênio bovino (DMC-F), segundo o método de Theakston & Reid (1983). À solução de fibrinogênio (20 mg/ml em volume de 0,20 ml por tubo e pré-aquecida a 37°C), foram adicionados 0,50 ml de diferentes concentrações de veneno (25, 50, 100, 200 e 400 µg/ml), procedentes da RMS e SB, machos e fêmeas. Os tempos de coagulação foram determinados por cronômetro (Agat 15 Jewels), quando da formação do coágulo.

5.6.7. Atividade Coagulante:

A atividade coagulante foi avaliada pela determinação da Dose Mínima Coagulante sobre o Plasma (DMC-P), definida como a dose de veneno que produz a coagulação do substrato em 60 segundos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Foi utilizado o plasma humano citratado, segundo o método de Theakston & Reid (1983). Amostras de plasma humano citratado (1 ml de citrato de sódio 3,8% para 9 ml de sangue), em volume de 0,3 ml, pré-aquecidas a 37°C, foram incubadas a 0,75 ml nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/ml, sem separação por *pools*. Após a adição do veneno ao tubo contendo o plasma, foi acionado o cronômetro, determinando-se o tempo de coagulação (formação da rede de fibrina) de cada amostra.

5.6.8. Atividade Fibrinolítica ou Anti-coagulante:

A atividade fibrinolítica ou defibrinante ou anti-coagulante foi determinada utilizando-se o método de Theakston & Reid (1983). Camundongos (18-22 g) foram inoculados com diferentes concentrações de veneno (15, 23, 51 e 77 µg/ml), sem separação por *pools*, por via endovenosa caudal. Uma hora após o inóculo do veneno, o sangue dos animais foi coletado pelo plexo ocular e determinada a Dose Mínima Defibrinante (DMD), definida como a menor dose de veneno capaz de tornar o sangue incoagulável, 1 hora após a injeção do veneno.

5.6.9. Atividade Miotóxica:

O grau de lesão muscular causado pela ação do veneno de *B. leucurus* procedentes da RMS e SB foi estudado por meio da determinação da enzima creatina quinase (CK) no músculo de camundongos (cepa CF-1, 18-22 g), segundo o método de Gutierrez *et al.* (1980) utilizando o “kit” UV otimizado (IFCC) para a determinação de CK em soro ou plasma.

Injetaram-se 0,5 ml de uma concentração de 100 µg de veneno, no músculo gastrocnêmio direito, intra-muscular, de 2 camundongos para cada amostra de veneno. Quatro horas após o inóculo, os animais foram anestesiados com éter etílico e feita a sangria pelo coração. Colocou-se 1 ml de sangue em Ependorff e deixou-se em banho-maria por 2 horas. Após, centrifugou-se a 1000 rpm à 25 minutos, retirou-se o sobrenadante e colocou-se em outro Ependorff. A enzima CK foi quantificada em espectrofotômetro a uma absorbância de 550 nm, usando o kit CK-NAC UVI, Wiener lab.

O cálculo foi feito baseado na média da variação da absorbância por minuto (A/min) aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade enzimática (nmoles/ml/min)} = \frac{(\Delta A/\text{min} \times 100)}{6,22} \times 1000$$

6,22 → valor do NADH em nmoles/min

5.6.10. Atividade sobre a Junção Neuromuscular:

A atividade sobre a junção neuromuscular do veneno de *B. leucurus* foi avaliada a partir das preparações nervo frênico músculo diafragma (NFD) e diafragma cronicamente desnervado (DCD) isolados de camundongo.

5.6.10.1. Preparação Nervo Frênico Músculo Diafragma (NFD) de Camundongo:

Após anestesia com hidrato de cloral a 10% (0,3 ml/100g), camundongos (com 30 g aproximadamente) foram sacrificados pela secção dos vasos cervicais. A preparação (músculo diafragma, juntamente com seu nervo motor, o nervo frênico) foi cuidadosamente retirada segundo a técnica de Bülbring (1946) modificada, colocada em cuba contendo 5 ml de solução Tyrode (com composição em mM de: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e C₆H₁₂O₆ 11,1) e, em seguida, presa, através dos músculos da costela, por dois ganchos existentes na base da cuba. A temperatura foi mantida a 37° C e a preparação aerada com carbogênio (mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂).

O registro da força de contração muscular, em resposta a estímulos supramaximais, foi realizado através de transdutor isométrico Load Cell BG-10GM, acoplado a um fisiógrafo Gould Univelsal Amplifier RS 3400.

O músculo foi submetido à tensão constante de 5 g/cm (por meio de um fio preso à porção tendinosa e ao transdutor isométrico) e à estimulação indireta (nervo frênico), com pulsos supramaximais, gerados por estimulador S48F (Grass Instruments), de 0,2 ms de duração e 0,1 Hz de frequência, por um período de 20 minutos para estabilização. Após esse período, foi adicionado ao banho, o veneno bruto nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml das 4 diferentes amostras, afim de verificar os seus efeitos.

5.6.10.2. Preparação Músculo Diafragma Cronicamente Desnervado (DCD) de Camundongo:

Camundongos foram desnervados seguindo-se a técnica descrita por Vital Brazil (1965) para ratos. Esta técnica consistiu na secção do nervo frênico esquerdo, e para proceder a desnervação, colocou-se o animal anestesiado pelo éter etílico em decúbito lateral direito, praticando-se uma incisão de aproximadamente 0,5 cm, perpendicular à linha mediana no terço inferior da região lateral do tórax esquerdo, previamente depilada. A incisão compreendeu a pele e a camada muscular delgada que recobre esta região. Ao longo do espaço intercostal cortou-se então, com tesoura, os músculos intercostais. Com um bastão de vidro com extremidade recurvada, prendeu-se o nervo frênico e procedeu-se a sua secção com uma tesoura, após sua exposição pelas bordas do corte. Em seguida, suturou-se a pele por meio de um ou dois pontos, conforme a extensão do corte. Decorridos 15 a 20 dias, retirou-se o segmento em leque do hemidiafragma esquerdo e montou-se a preparação, segundo a técnica adotada no caso da preparação NFD. A solução nutritiva, o volume e a temperatura do banho, assim como o processo de registro das contrações, foram iguais aos já descritos anteriormente. Para a estimulação elétrica, usou-se os mesmos eletrodos que serviram à excitação direta do músculo na preparação NFD.

Fez-se a excitação elétrica do diafragma desnervado com pulsos de 2 ms de duração, 0,1 c/s de frequência e 30 a 70 mV de intensidade. A preparação foi incubada com os diferentes *pools* de veneno de *B. leucurus* (50 e 100 µg/ml), registrando-se a contratura por eles provocada.

A curva dose-resposta da Acetilcolina (Ach) foi realizada antes da adição das amostras das peçonhas (condição controle) e após 120 minutos de incubação (condição-teste). Após cada adição de Ach, e observação da resposta contraturante do diafragma, procederam-se 3 lavagens da preparação com solução Tyrode.

5.6.10.3. Alterações morfológicas e ultra-estruturais de diafragma de camundongo (lesões musculares), em microscopia óptica:

Após a retirada da preparação segundo as técnicas descritas nos itens 5.6.10.1 e 5.6.10.2., os hemidiafragmas foram colocados em uma placa de Petri, fixados com alfinetes sobre o fundo preenchido com cera utilidade (uso odontológico) e fixados com Bouin (2 ml de Bouin + 100 µl de ácido acético). Após 24 horas nesta solução as preparações foram lavadas com água destilada, afim de retirar o excesso de Bouin e posteriormente devidamente etiquetadas e conservadas em álcool a 70%.

Após a fixação, os músculos diafragmas foram desidratados, “over-night”, em série crescente de 7 baterias de álcool (sendo 1 hora em cada bateria), diafanizados em 2 baterias de xilol e embebidos em 2 baterias de parafina, utilizando-se o Automatic Tissue Processor/Histokinette 2000®.

A inclusão dos músculos diafragma em parafina, em blocos, foi feita à temperatura ambiente, utilizando-se o Tissue Embedding Center/Reichert-Jung®. Após a confecção dos blocos, foram feitos os cortes histológicos, em micrótomo Leika® (modelo Jung RM2045), e as secções (4 µm de espessura) ficaram em estufa Fabre®.

Após este procedimento, as secções foram coradas em hematoxilina-eosina (HE), como a seguir: 10 minutos no xilol, 5 minutos em álcool a 80%, 5 minutos em água corrente, 2 minutos em hematoxilina, 7 minutos em lavagem com água corrente, 30 segundos em eosina, 3 minutos em água corrente, 5 minutos em álcool a 80%, 5 minutos em álcool a 90%, 5 minutos em álcool absoluto e 10 minutos em xilol.

Após coloração, as lâminas foram montadas colocando-se os cortes nas mesmas, limpando-se a lamínula com xilol, colocando-se bálsamo na lamínula, colocando-se a lamínula sobre a lâmina, deixando-se secar, limpando-se e colocando-se a etiqueta de identificação.

A análise histológica das lesões musculares foi feita utilizando-se Microscópio óptico Leica modelo Microstar IV e as fotomicrografias foram tiradas em microscópio óptico Leica modelo Recichert Polyvar 2. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPGM/FIOCRUZ).

5.7. CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA:

5.7.1. Elisa:

Realizou-se segundo a técnica descrita por Higashi *et al.* (1989). Empregaram-se placas de 96 poços (Corning) sensibilizadas com 100 µl veneno/poço de *Bothrops leucurus* procedentes da RMS, SB, machos e fêmeas (1,0 µg/ml diluído em tampão carbonato pH 9,6 força iônica 0,1) e incubadas a 4°C por 24 horas. Após, as placas foram lavadas com 300 µl de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 e 10% de leite desnatado como solução de bloqueio, por 5 vezes. Os poços foram incubados (45 minutos a 37°C), sucessivamente, com diluições (1:100 a 1:150.000) de diferentes antivenenos (anti-*Bothrops leucurus* do Instituto Carlos R. Malbrán, antibotrópico-crotálicos do Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias) e uma diluição de 1:10.000 de conjugado IgG anti-equino de coelho, conjugado com peroxidase (Sigma). O revelado foi feito com o-fenilendiamina (Sigma) e peróxido de hidrogênio pH 5,7 durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 3,0 N. Determinou-se a absorbância a 492 nm em leitor de ELISA Multiskan Plus versão 1.43. Empregou-se como controles negativos poços sensibilizados com veneno, omitindo-se a incubação com anti-veneno ou incubados com soro equino normal.

5.7.2. Westerblot:

Realizou-se o SDS-PAGE utilizando-se a técnica de Laemmli (1970) como descrito no item 5.5.2. As amostras separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BIO RAD), de acordo com Towbin *et al.* (1979), utilizando-se marcadores de peso molecular SIGMA VII-S.

5.8. NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICAS:

Para o estudo da neutralização do veneno desta serpente, determinou-se a dose desafio do veneno correspondente ao poder de neutralização dos anti-venenos botrópico-crotálicos produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias e anti-*Bothrops leucurus* do Instituto Malbrán (Argentina).

5.8.1. Soroneutralização da Atividade Hemorrágica:

A neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *B. leucurus*, foi avaliada pelo método de Ownby *et al.* (1984). Para tanto, utilizaram-se 5 DMH (400 µg para o veneno de serpentes procedentes da RMS e 200 µg para o veneno da SB).

Ratos (cepa Wister, 200-250 g, 4 a 6 pontos por dose) foram injetados intradermicamente com misturas de dose de veneno constante e diferentes doses (12,5, 25, 50 e 100 µl) de soros antibotrópico-crotálicos do Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias, previamente incubados a 37°C durante 30 minutos com NaCl 0,15M, em um volume de 100 µl/ponto. Três horas depois do inóculo, os animais foram sacrificados com éter etílico e a pele, previamente depilada, foi retirada e estendida entre placas de vidro e a área hemorrágica medida com paquímetro (precisão 0,05 mm), como descrito por Ferreira *et al.* (1992a, 1992b). Determinou-se um valor de 100% à média da área hemorrágica produzida no grupo controle positivo (somente com o veneno). A expressão da capacidade neutralizante (Dose eficaz 50% - DE₅₀) dos anti-venenos foi determinada pela razão anti-veneno/veneno em que o efeito é neutralizado em 50%, por regressão não linear da curva da área hemorrágica em função da quantidade de antiveneno.

5.8.2. Soroneutralização da Atividade Necrosante:

A neutralização da atividade necrosante do veneno de *B. leucurus*, foi avaliada pelo método de Theakston & Reid (1983). Para tanto, utilizaram-se 5 DMN (1500 µg para o veneno de serpentes procedentes da RMS e 1210 µg para o veneno da SB).

Ratos (cepa Wister, 200-250 g, 4 a 6 pontos por dose) foram injetados intradermicamente com misturas de dose de veneno constante e diferentes doses (6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µl) de soros antibotrópico-crotálicos do Instituto Butantan e Fundação Ezequiel Dias, previamente incubados a 37°C durante 30 minutos com NaCl 0,15M, em um volume de 100 µl/ponto. Setenta e duas horas depois do inóculo, os animais foram sacrificados com éter etílico e a pele, previamente depilada, foi retirada e estendida entre placas de vidro e a área necrosada medida com paquímetro (0,05 mm de precisão). Determinou-se um valor de 100% à média da área necrosada produzida no grupo controle positivo (somente com o veneno). A expressão da capacidade neutralizante (Dose eficaz 50% - DE₅₀) dos anti-venenos foi determinada pela razão anti-veneno/veneno em que o efeito é neutralizado em 50%, por regressão não linear da curva da área necrótica em função da quantidade de anti-veneno.

5.8.3. Soroneutralização da Atividade Pró-coagulante:

A neutralização da atividade pró-coagulante sobre o fibrinogênio bovino do veneno de *B. leucurus*, foi avaliada pelo método de Theakston & Reid (1983), modificado por Ferreira *et al.* (1992a). Para tanto, utilizaram-se 5 DMC-f (250 µg para os venenos de serpentes procedentes da RMS, SB, machos e fêmeas).

Incubaram-se 0,40 µg de solução de veneno com diferentes doses (25 e 100 µl) de soros antibotrópico-crotálicos do Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias, previamente incubados a 37°C durante 30 minutos. Um volume de 0,50 ml desta mistura foi adicionada à 0,20 ml de fibrinogênio bovino pré-aquecido a 37° C e determinaram-se os tempos de coagulação dos controles positivos (somente o veneno em NaCl) e dos controles negativos (veneno + anti-veneno).

A expressão da capacidade neutralizante (Dose eficaz 50% - DE₅₀) dos anti-venenos foi determinada pela inibição da atividade pró-coagulante por pré-incubação com anti-veneno a partir do aumento no tempo requerido para a formação do coágulo.

5.8.4. Soroneutralização da Atividade Hemolítica Indireta em Meio Líquido:

A neutralização da atividade hemolítica indireta em meio líquido do veneno de *B. leucurus* procedentes da RMS e SB foi avaliada pelo método de Al-Abdulah *et al.* (1991) modificado.

As amostras contendo 100 µg de veneno foram pré-incubadas durante 30 minutos a 37° C com NaCl ou com diferentes quantidades (9,38 18,75 37,5, 75, 100, 150, 300 e 600 µl) de soros antibotrópico-crotálicos do Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias, em um volume final de 0,3 ml. Às amostras, adicionaram-se 10 ml de uma mistura contendo 0,5 ml de hemácias humanas lavadas, 0,5 ml de gema de ovo e 100 µl de CaCl₂ 0,1 M em NaCl 0,15 M e incubou-se a mistura durante 1 hora a 37° C. A reação foi interrompida com 0,10 ml de EDTA a 10%. As misturas foram centrifugadas a 1000 rpm por 15 minutos e determinou-se a absorbância em espectrofotômetro à 550 nm (Metrolab M1700 V1.05R).

Empregou-se como branco a mesma mistura incubada com 0,3 ml de NaCl 0,15 M e como controles positivos, a mesma mistura da reação incubada com 100 g de veneno em 0,30 ml de NaCl 0,15 M. Com todas as amostras, calculou-se a média das leituras da absorbância, onde se determinou um valor de 100% e a DE₅₀ de cada antiveneno foi determinada por regressão não linear da curva da absorbância em função da quantidade de veneno.

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Foram utilizadas medidas de tendência central (média aritmética) e de dispersão (desvio padrão e erro padrão). Para comparação de médias utilizou-se o teste “t” de Student.

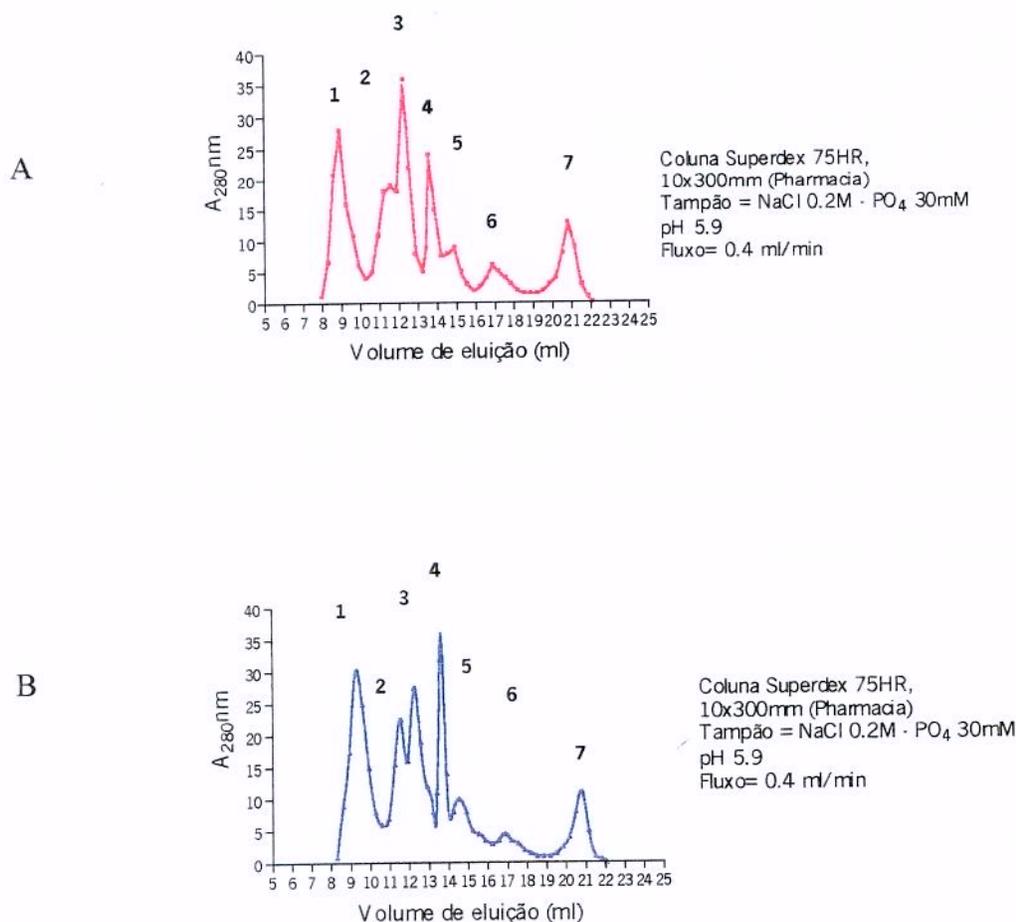
Os cálculos foram realizados utilizando os pacotes estatísticos: Software Prisma (Graf Pad Software, Inc. San Diego, Califórnia, U.S.A.), MicroCal Oringin 2.94 (1991-1993), Microcal Sftware Inc e o Aseasy.

6. RESULTADOS

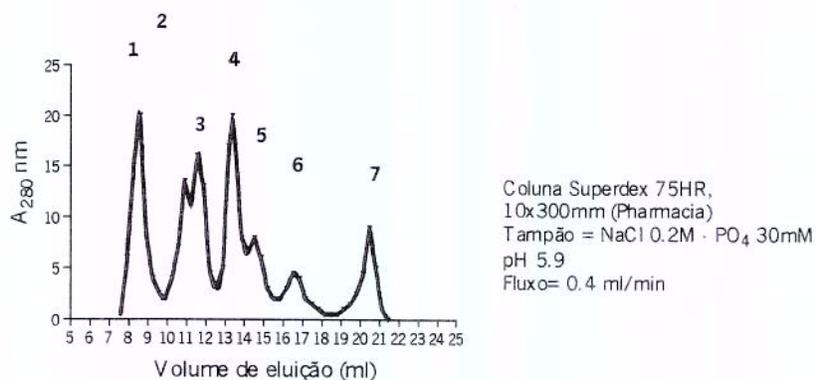
6.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA:

O teor protéico de veneno de *B. leucurus* foi estimado a partir de uma curva padrão de albumina bovina, caracterizado por $1798 \pm 0,082$ mg/ml, o que representa 89,9% de proteína.

Os perfis cromatográficos do veneno de *B. leucurus* procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS), Sul/Sudeste Baiano (SB), machos (♂) e fêmeas (♀), estão demonstrados nas Figuras 2 e 3. Os cromatogramas demonstraram que não houve diferença nos perfis das diferentes amostras de veneno, já que todos os venenos apresentarem 7 picos e os componentes começarem a eluir em torno de 8 ml. Apesar disso, uma pequena diferença foi observada no perfil dos picos 2 e 3 do veneno de machos em relação às outras amostras.



C



D

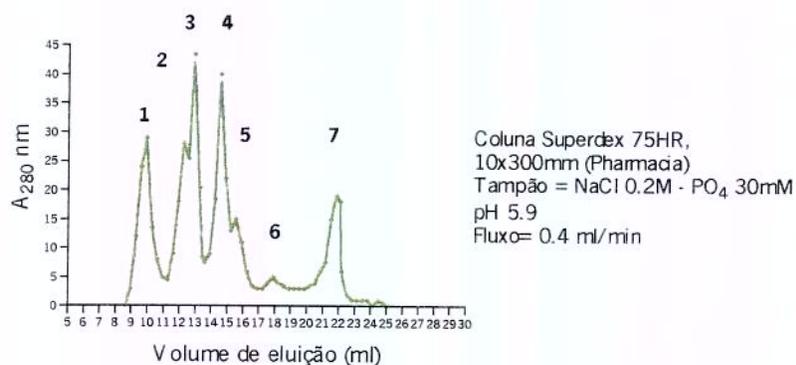


Figura 2: Cromatografia em Superdex 75HR (Sistema FPLC) do veneno de *Bothrops leucurus* machos (A), fêmeas (B) e procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS) (C) e Sul/Sudeste Baiano (SB) (D), Bahia, Brasil. Foram aplicadas 200 μ l de cada amostra em tampão Acetato de Sódio 0,01 M, pH 5,9. Velocidade: 0,40 ml/min.

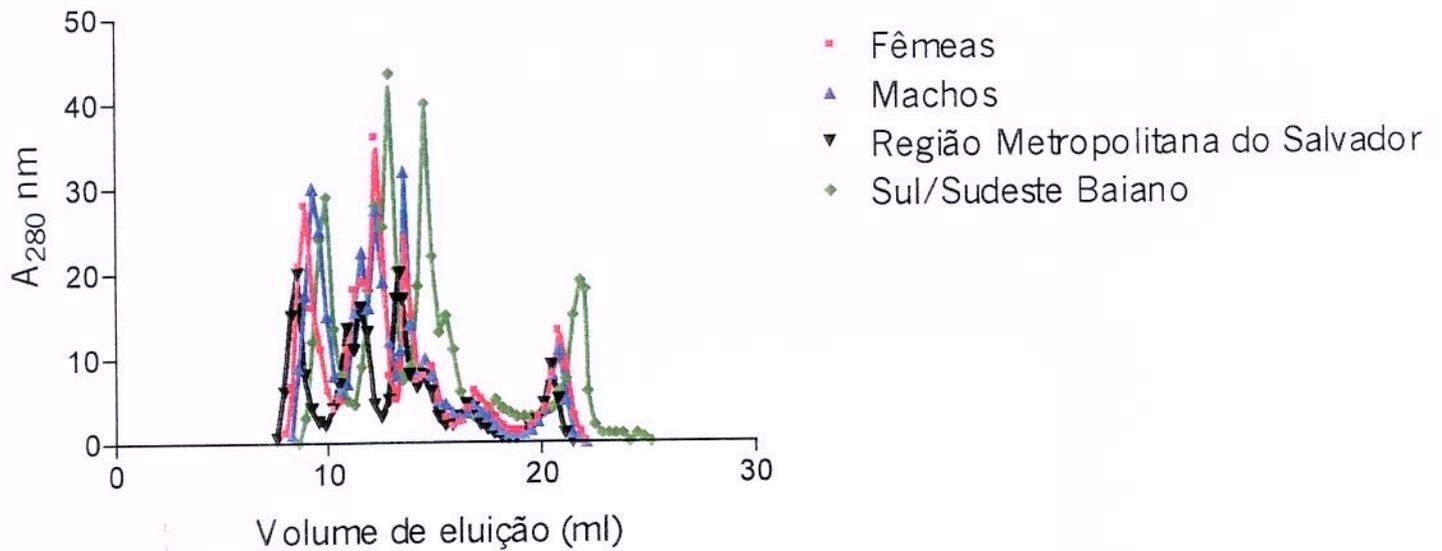


Figura 3: Cromatografia em Superdex 75HR (Sistema FPLC) do veneno de *Bothrops leucurus* machos, fêmeas e procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e Sul/Sudeste Baiano (SB), Bahia, Brasil. Foram aplicadas 200 μ l de cada amostra em tampão Acetato de Sódio 0,01 M, pH 5,9. Velocidade: 0,40 ml/min.

A Figura 4 demonstra o padrão eletroforético (SDS-PAGE) das quatro amostras do veneno de *B. leucurus* (RMS, SB, ♂ e ♀), em gel poliacrilamida na presença de SDS.

As amostras apresentaram-se semelhantes entre si e claramente distintas dos demais venenos analisados (*B. asper*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus*), justificando serem analisadas em um grupo à parte. Todos os venenos apresentaram 4 bandas, semelhante à peçonha de *B. neuwiedi*.

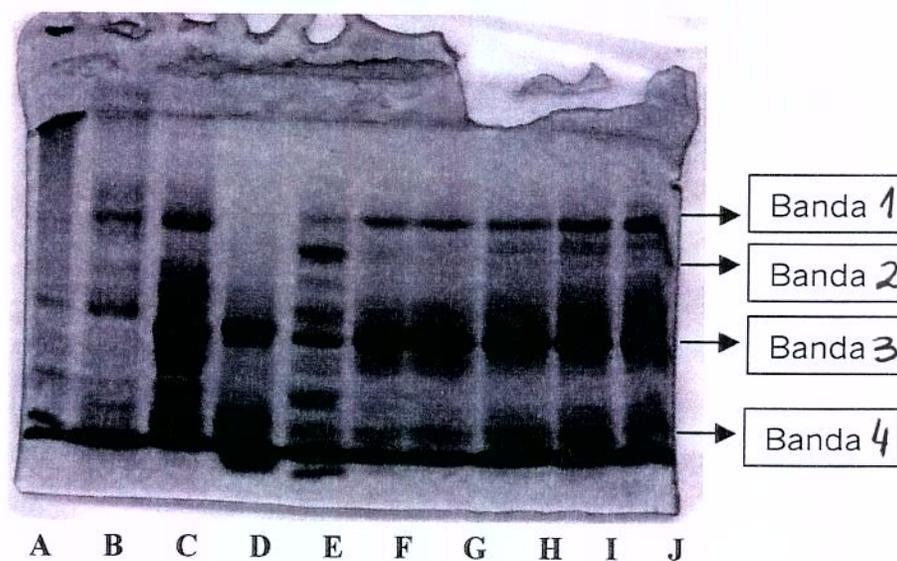


Figura 4: Padrão eletroforético das quatro amostras do veneno de *Bothrops leucurus* (J = RMS; I = SB; H= ♂; G e F = ♀), E = *B. asper*; D = *B. moojeni*; C = *B. neuwiedi*; B = *Crotalus durissus terrificus*; A = Marcador de peso molecular.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS:

Os dados contidos na Tabela 2 demonstram os valores da DL₅₀ e seus limites de confiança de 95% da toxicidade do veneno de *B. leucurus* procedentes das regiões RMS e SB e machos e fêmeas, segundo o método de Weil (1953), via intravenosa. Os valores obtidos foram 2,5 (1,9 a 3,3) para o *pool* de venenos da RMS, 1,5 (1,2 a 1,8) para o *pool* de venenos do SB, 1,3 (1,2 a 1,4) para o *pool* de veneno de machos e 1,7 (1,3 a 2,1) mg/kg por camundongo para o de fêmeas. O *pool* de veneno da SB foi significativamente mais tóxico que o da RMS ($P < 0.05$), enquanto que esta diferença na toxicidade da peçonha de machos e fêmeas não foi estatisticamente significativa.

Tabela 2: Valores da DL₅₀ e seus limites de confiança da toxicidade do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil) e machos e fêmeas.

Amostra de veneno	DL ₅₀ mg/kg
RMS	2,5 (1,9 a 3,3)
SB	1,5 (1,2 a 1,8)
Machos	1,3 (1,2 a 1,4)
Fêmeas	1,7 (1,3 a 2,1)

RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Região Sul/Sudeste Baiano.

Em nível de $P < 0.05$ as médias foram significativamente diferentes.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A Tabela 3 demonstra a caracterização geral das atividades biológicas do veneno de *B. leucurus*, sem a separação por *pools* e utilizando-se como animal de experimentação o camundongo. Observamos que a DMC-P (Dose mínima coagulante sobre plasma humano) foi de 85,98 mg/l, a DE₃₀ (Dose do veneno que produz um aumento de 30% no peso da pata) foi 0,50 µg/camundongo, a DMD (Dose mínima defibrinante) foi 4,25 µg/camundongo, DMH (Dose mínima hemorrágica) foi 11,02 ± 4,87 U/mg, DMN (Dose mínima necrosante) foi 3,02 ± 0,65 U/mg e atividade proteolítica de 228,95 ± 115,8 U/mg.

Tabela 3: Atividades enzimáticas e biológicas do veneno de *Bothrops leucurus*.

Atividades Enzimáticas e Biológicas	
Coagulante sobre plasma humano (DMC-p)	85,98 mg/l
Edemaciante (DE ₃₀)	0,50 µg/camundongo
Defibrinante (DMD)	4,25 µg/camundongo
Hemorrágica (DMH)	11,02 ± 4,87 U/mg
Necrosante (DMN)	3,02 ± 0,65 U/mg
Proteolítica sobre caseína	228,95 ± 115,8 U/mg

DMC-p = Dose Mínima Coagulante sobre plasma humano citratado; DE₃₀ = Dose do veneno que produz um aumento de 30% no peso da pata; DMD = Dose Mínima Defibrinante; DMH = Dose Mínima Hemorrágica; DMN = Dose Mínima Necrosante.

A Tabela 4 mostra os valores de DL₅₀ segundo o método de Meier & Theakston (1986), via intraperitoneal, Dose Mínima Hemorrágica (DMH), Dose Mínima Necrosante (DMN), Dose Mínima Coagulante sobre fibrinogênio bovino (DMC-f) e Miotoxicidade do veneno de *B. leucurus* procedentes da RMS, SB, ♂ e ♀.

Tabela 4: Atividades biológicas do veneno de *Bothrops leucurus* machos, fêmeas procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste Baiano, Bahia, Brasil.

Amostras de veneno	Atividades biológicas				
	DL ₅₀ (µg/g)	DMH (µg/rato)	DMN (µg/rato)	DMC-f (mg/l)	Miotoxicidade (nmoles/ml/min)
RMS	8,9±1,4 (5,6 a 12,2)	79,0±3,0	300±48	41,0±1,7	87,8±33,3
SB	5,0±0,5 (3,8 a 6,1)	39,8±1,2	242±79	53,1±1,3	74,0±22,7
Machos	13,9±3,2 (6,0 a 22,0)	-	-	54,3±1,5	-
Fêmeas	14,2±2,6 (7,7 a 20,6)	-	-	48,7±1,4	-

DL₅₀ = Dose Letal 50%, testada frente camundongos, via intra-peritoneal (i.p.); DMH = Dose Mínima Hemorrágica; DMN = Dose Mínima Necrosante; DMC-f = Dose Mínima Coagulante sobre fibrinogênio bovino; Miotoxicidade = pico de aumento do nível da enzima Creatina-quinase (CK) no soro de camundongos; (-) = Atividades não testadas para estas amostras.

Os valores de DL_{50} obtidos foram $8,9 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$ para o *pool* de venenos de RMS, $5,0 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$ para o *pool* de venenos de SB, $13,9 \pm 3,2 \mu\text{g/g}$ para o *pool* de venenos de \square e $14,2 \pm 2,6 \mu\text{g/g}$ para o *pool* de venenos de \square , demonstrando que houve uma variação regional, mas não sexual na toxicidade do veneno desta espécie. Ou seja, o veneno de serpentes procedentes do SB foi quase 2 vezes mais tóxico que o da RMS. Não foram observadas diferenças na toxicidade dos venenos dos machos em relação ao das fêmeas.

O veneno das serpentes da SB também apresentou atividades hemorrágica (tanto utilizando-se a técnica de dosagem de hemoglobina por espectrofotômetro – Figura 5, quanto a observada na medição da área hemorrágica), necrosante e miotóxica maior que da RMS, no entanto, a atividade coagulante desta última foi maior que o da primeira (Figura 6). Por outro lado, o veneno das fêmeas apresentou atividade coagulante maior que o de machos (Figura 6).

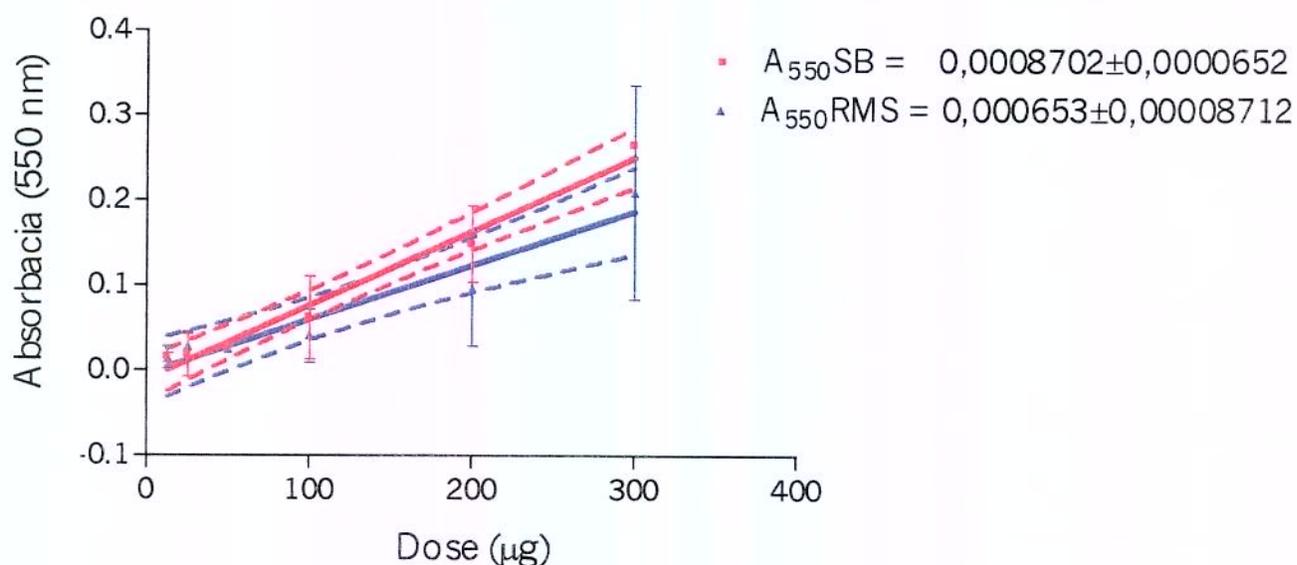


Figura 5: Hemoglobina detectada na área hemorrágica provocada pelos venenos de *Bothrops leucurus* procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste baiano, Bahia, Brasil.

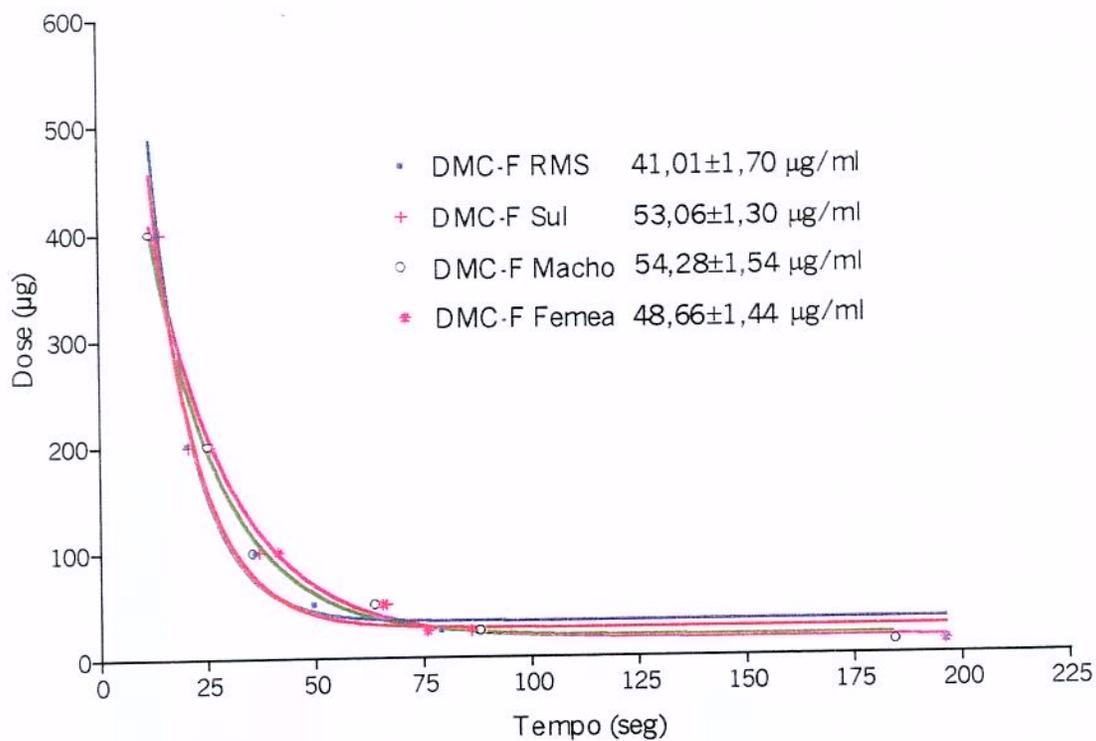


Figura 6: Dose Mínima Coagulante em Fibrinogênio Bovino (DMC-F) do veneno de *Bothrops leucurus* procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste baiano, Bahia, Brasil e machos e fêmeas.

A Figura 7 demonstra uma atividade miotóxica equivalente à *B. moojeni* e *B. asper* e menor que a atividade demonstrada pela *B. neuwiedi*, todas de mesmo grupo taxinômico (grupo ATROX) e filogeneticamente próximas. Não houve diferença nesta atividade, entre veneno das espécimens de *B. leucurus* procedentes da RMS e SB.

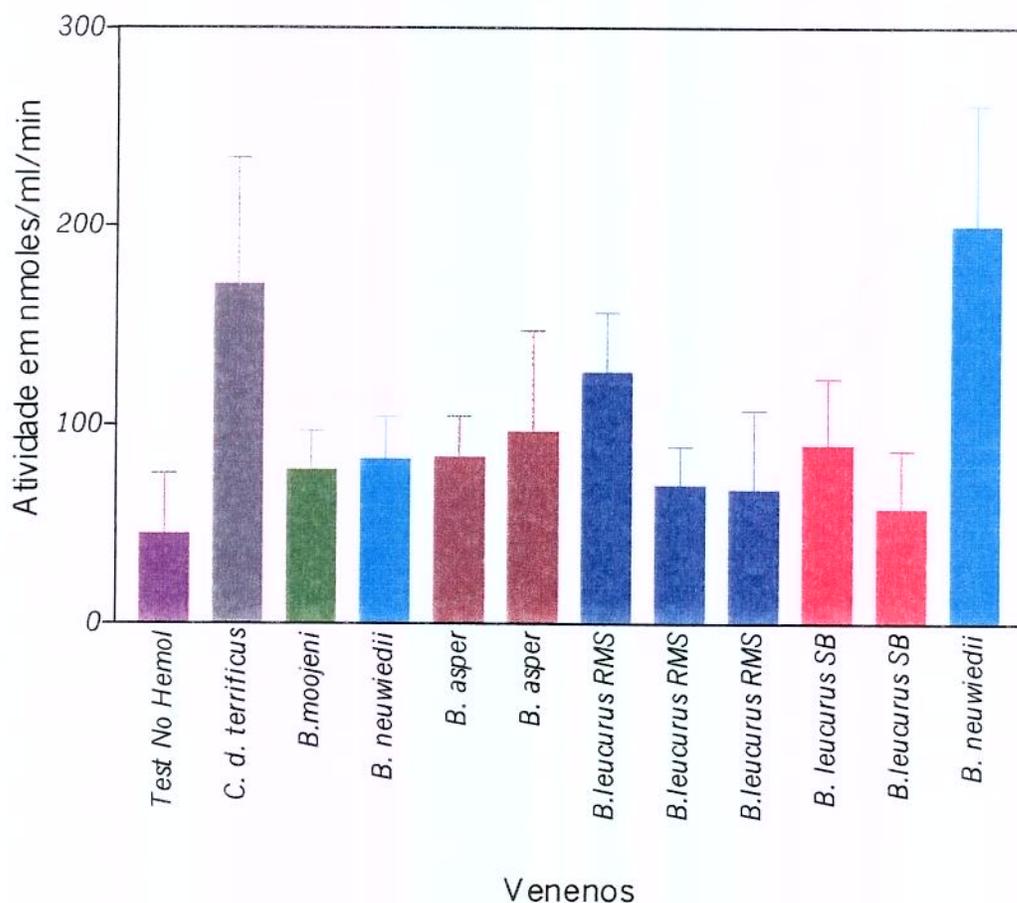
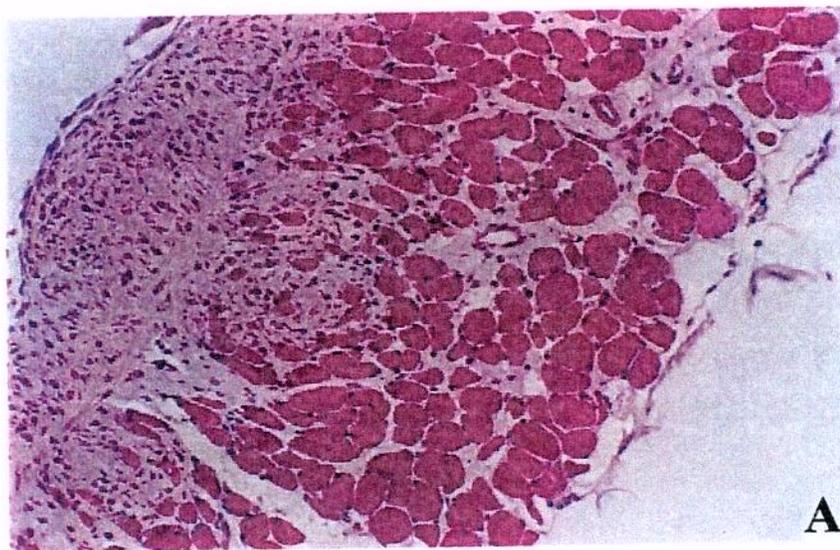


Figura 7: Níveis de Creatinoquinase (CK) no plasma de camundongos 3 horas após inoculação de diferentes venenos de Crotálidos da América do Sul, incluindo *Bothrops leucurus* procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e Sul/Sudeste (SB) baiano, Bahia, Brasil.

À análise histopatológica, através de microscopia óptica, os músculos diafragmas dos animais controles (apenas em solução Tyrode) apresentaram aspecto normal das fibras musculares, com estrias transversais normais, feixes de fibras com aspecto poligonal normal e organização histológica típica de músculo esquelético (Figura 8).



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Figura 8: Cortes histológicos (A) e (B) de músculo diafragma de camundongo controle, incubado com solução Tyrode, corados com Hematoxilina Eosina. Aumento 250 vezes.

Todas as amostras do veneno de *B. leucurus* (procedentes da RMS e SB, ♂ e ♀) mostraram atividade miotóxica, induzindo lesões musculares em todas as doses testadas nos diafragmas das preparações NFD (10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml) e DCD (50 e 100 µg/ml), mas com diferenças qualitativas entre elas, tanto na intensidade quanto na extensão das lesões necróticas.

O veneno dos quatro *pools*, na dose de 10 µg/ml (Figuras 9, 10, 11 e 12), induziu mionecrose, tal como alterações do tipo edemaciada ou “swollen”, que a partir de agora chamaremos “balonização” (célula muscular intumescida, com perfil arredondado), lesões “delta” sobre a membrana celular, vacuolização, regiões de hipercontração e condensação das miofibrilas, alternado-se com espaços vazios no sarcoplasma. Esta dose caracterizou-se pela presença de áreas focais de degeneração das fibras musculares e a presença de uma grande quantidade de células com vacuolização ou “balonizadas”.

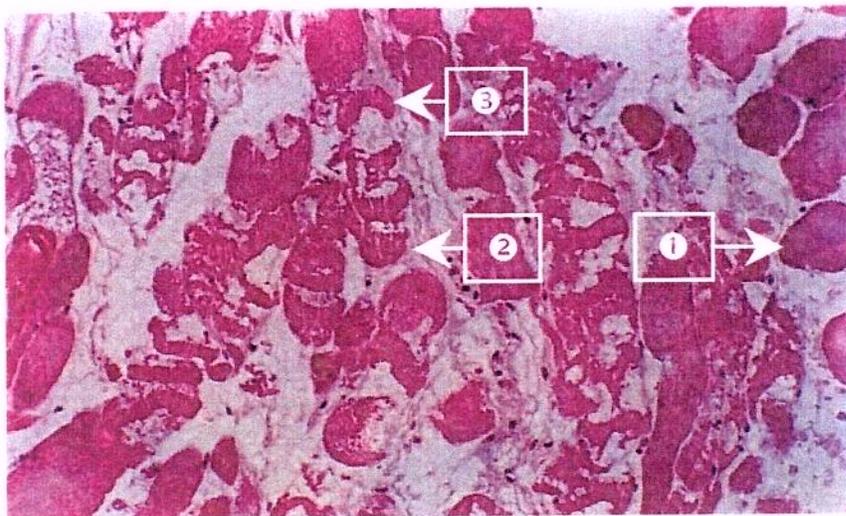


Figura 9: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 10 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente da Região Metropolitana do Salvador, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”.

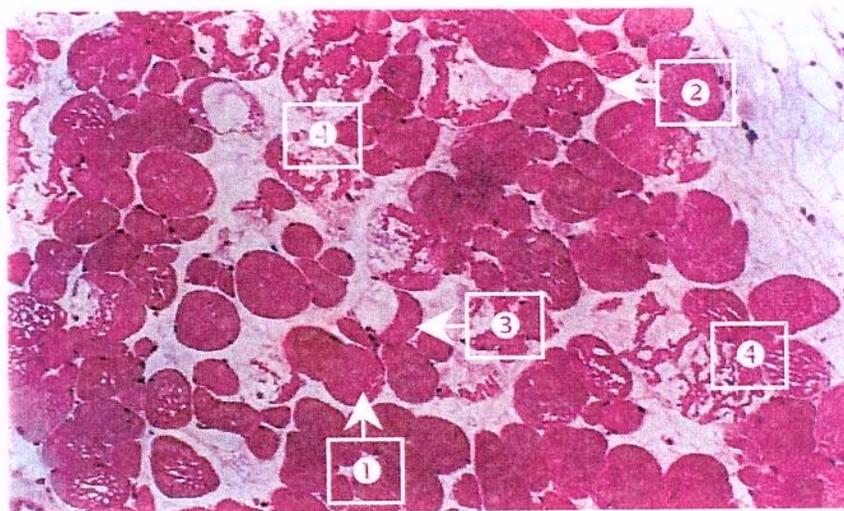


Figura 10: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 10 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Área focal de destruição das fibras musculares.

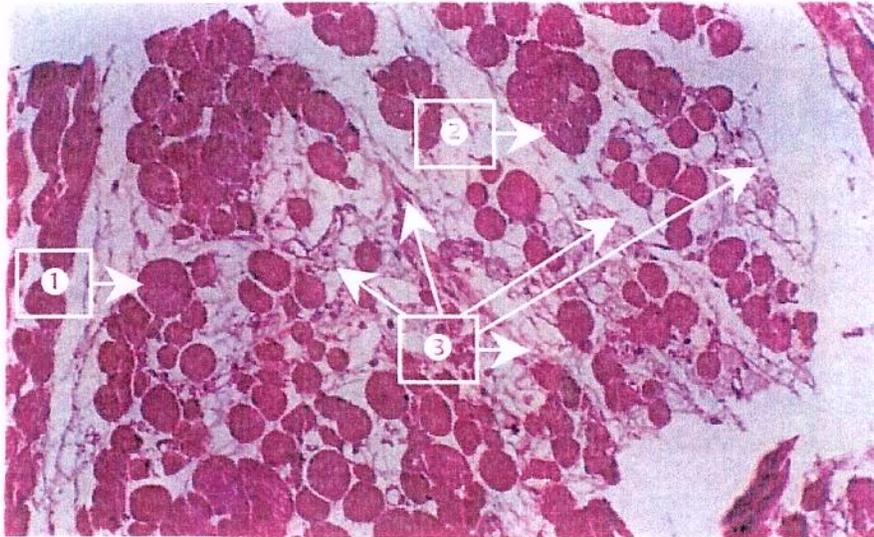


Figura 11: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 10 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Área focal de destruição das fibras musculares.

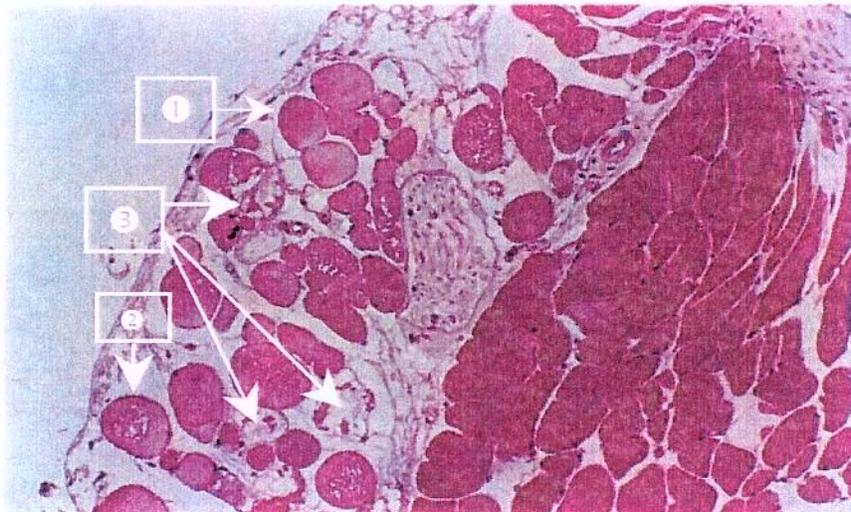


Figura 12: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 10 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* macho, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Área focal de destruição das fibras musculares.

A dose de 20 µg/ml (Figura 13) das quatro amostras de veneno induziu mionecrose, caracterizando-se pela presença de vacuolização, células edemaciadas ou “balonizadas”, lesões “delta” sobre a membrana celular, áreas focais de degeneração das fibras musculares com extensão menor que a provocada pela dose de 10 µg/ml, além de edema intersticial, presente em todas as preparações.

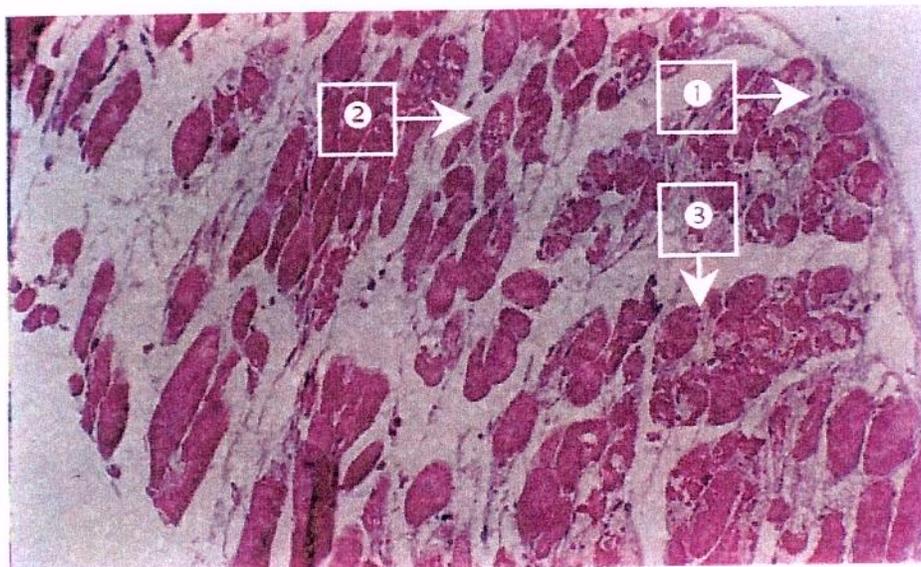


Figura 13: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 20 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Edema intersticial.

A indução de mionecrose foi observada na dose de 50 µg/ml (Figuras 14, 15, 16 e 17) das quatro amostras de veneno, caracterizando-se pela presença de menor quantidade de vacuolização e de células edemaciadas ou “balonizadas”, menor frequência lesões “delta” sobre a membrana celular, presença de grandes áreas de degeneração das fibras musculares, além de intenso edema intersticial presente na maioria das preparações, edema dentro da fibra muscular e infiltrado inflamatório mononuclear.

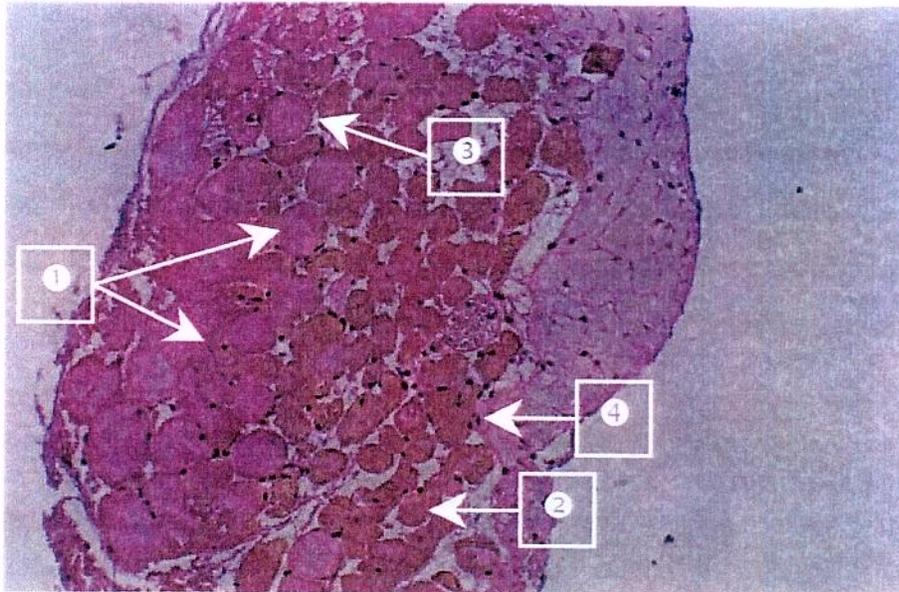


Figura 14: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 50 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente da Região Metropolitana do Salvador, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Filete nervoso íntegro.

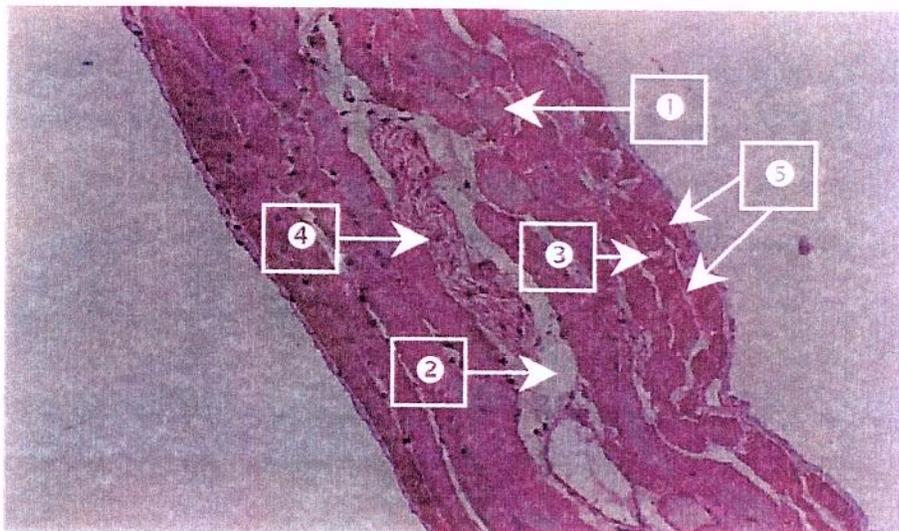


Figura 15: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 50 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Edema intersticial, ❸ Lesões “delta”, ❹ Filete nervoso íntegro, ❺ Área focal de destruição de fibras musculares.

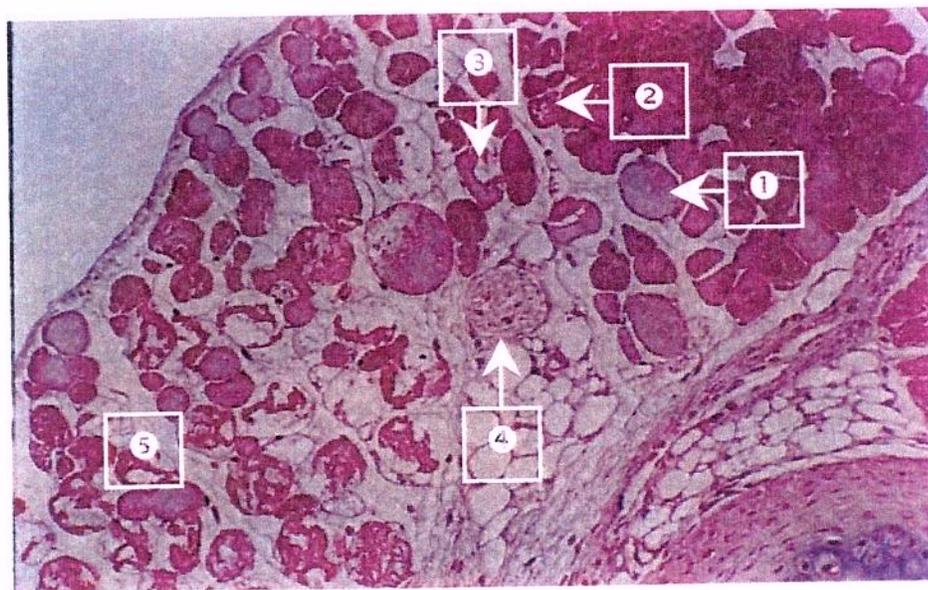


Figura 16: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 50 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Filete nervoso íntegro, ❺ Área extensa de destruição de fibras musculares.

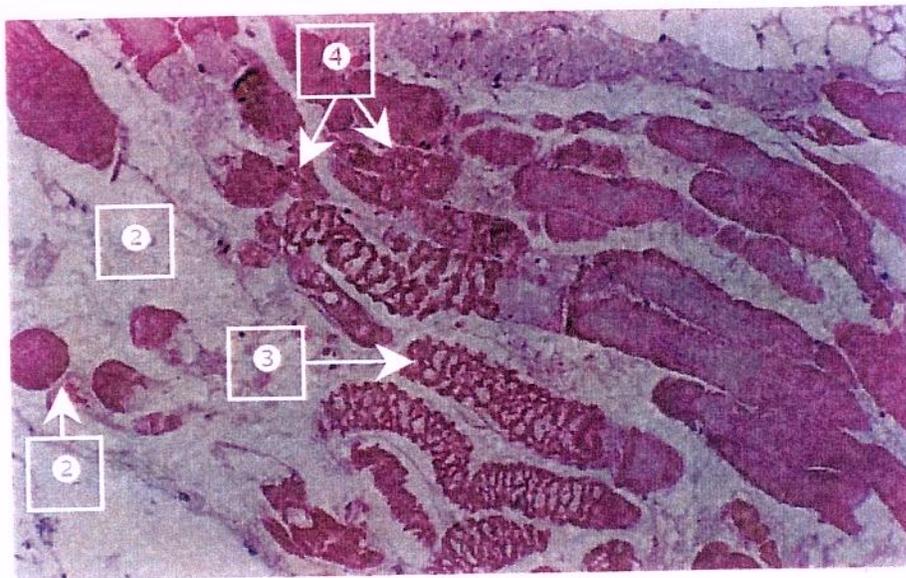


Figura 17: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 50 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* macho, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Edema intersticial, ❸ Hipercontração das fibras, ❺ Área focal de destruição de fibras musculares.

A mionecrose foi observada na dose de 100 µg/ml (Figuras 18, 19 e 20) das quatro amostras de veneno, caracterizando-se pela presença de menor quantidade de vacuolização e de células edemaciadas ou “balonizadas”, menor frequência de lesões “delta” sobre a membrana celular, regiões de hipercontração e condensação das miofibrilas alternado-se com espaços vazios no sarcoplasma, presença de grandes áreas focais de degeneração das fibras musculares, extensas áreas de degeneração de aspecto rendilhado, além de edema intersticial presente na maioria das preparações.

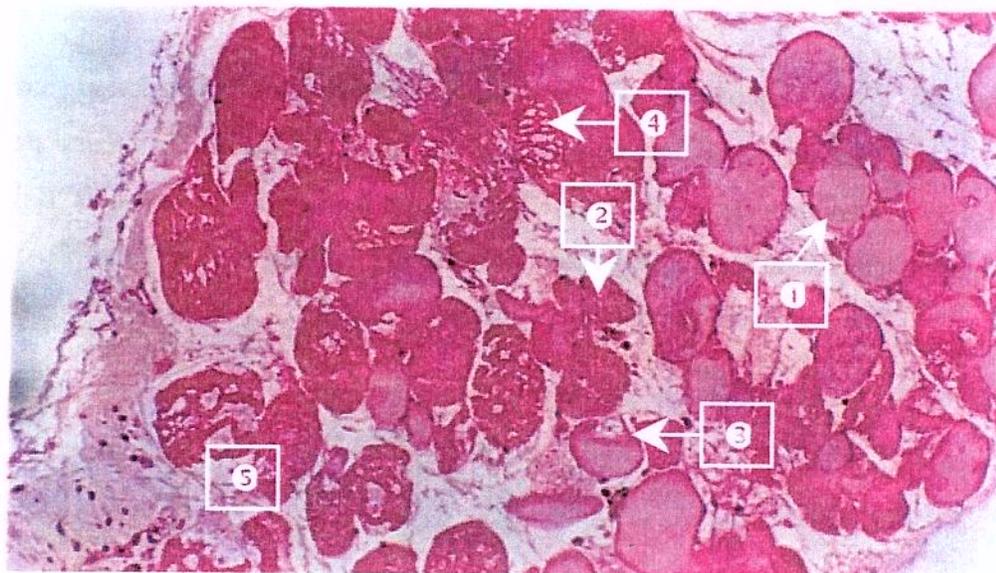


Figura 18: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente da Região Metropolitana do Salvador, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Hipercontração, ❺ Área focal de destruição de fibras musculares.

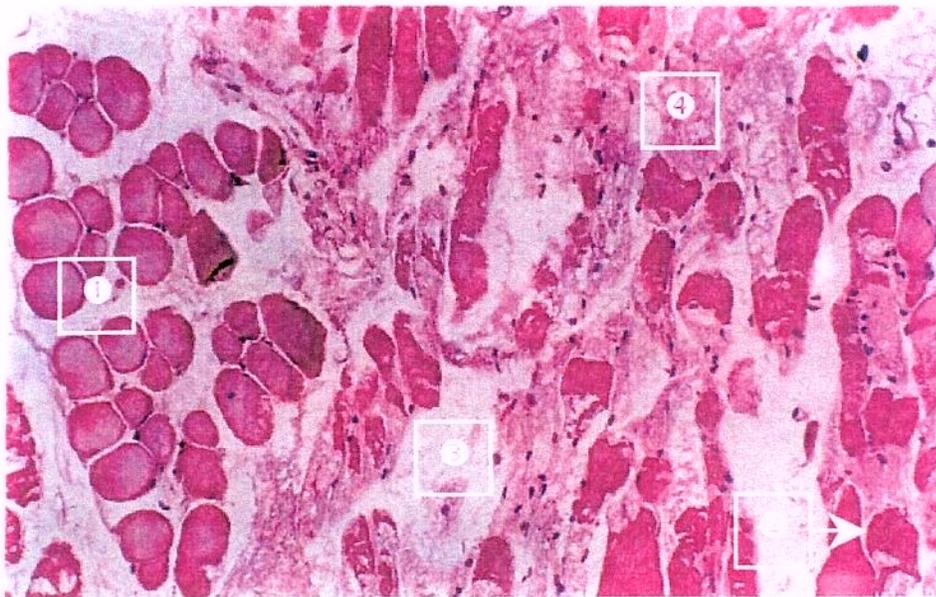


Figura 19: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Lesões “delta”, ❸ Edema intersticial, ❹ Área extensa de destruição de fibras musculares.



Figura 20: Corte histológico longitudinal de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ Hipercontração, ❷ Edema intersticial, ❸ Área focal de destruição de fibras musculares.

A mionecrose observada na dose de 200 µg/ml (Figuras 21, 22, 23 e 24) das quatro amostras de veneno, caracterizou-se pela presença de menor quantidade de vacuolização e de células edemaciadas ou “balonizadas”, menor frequência de lesões “delta” sobre a membrana celular, regiões de hipercontração, condensação das miofibrilas alternado-se com espaços vazios no sarcoplasma, extensas áreas de degeneração das fibras musculares, além de importante edema intersticial presente na maioria das preparações.

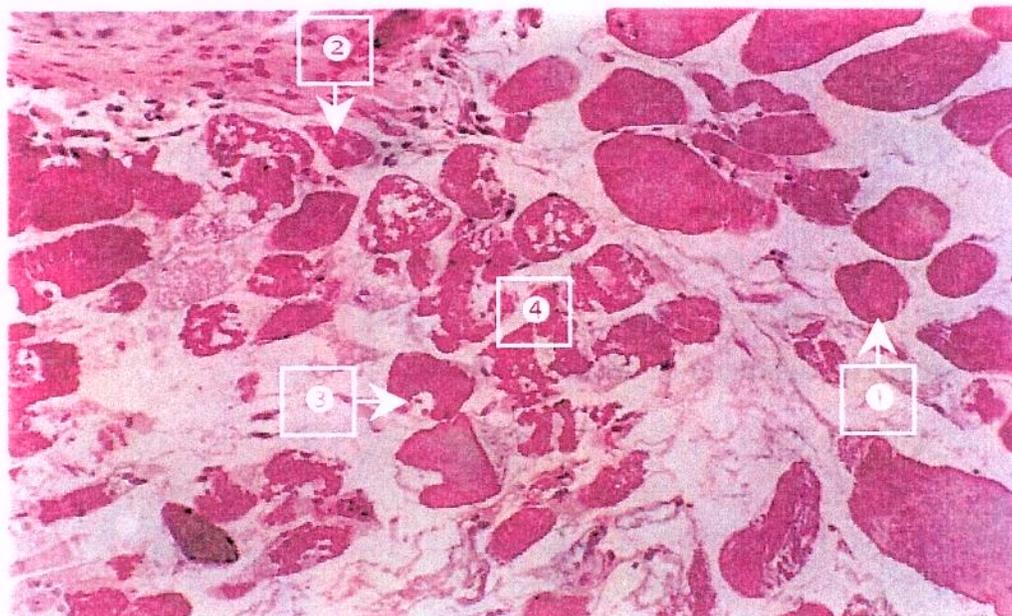


Figura 21: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 200 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* procedente da Região Metropolitana, durante 120 minutos, mostrando mionecrose severa e porções onde as fibras foram totalmente destruídas. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Área extensas de necrose de fibras musculares.

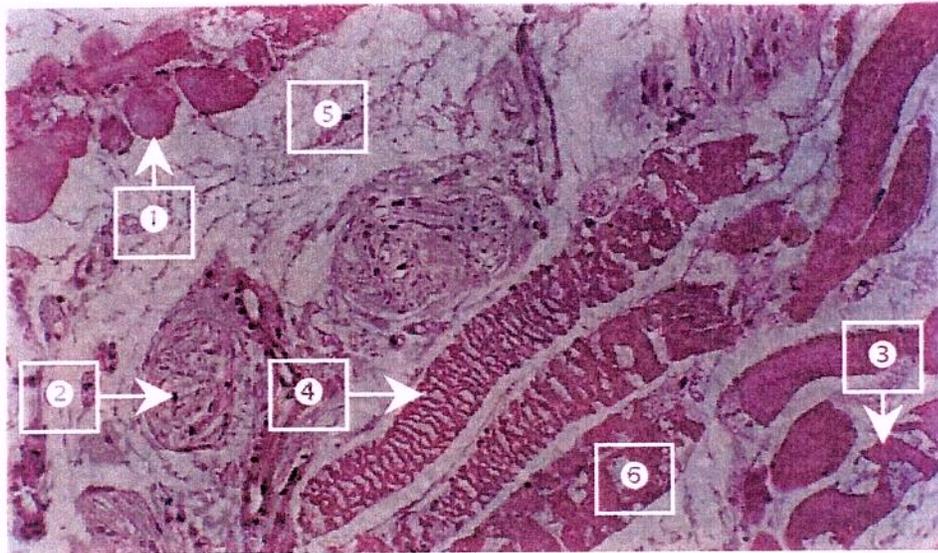


Figura 22: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 200 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* procedente do Sul/Sudeste baiano, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Filete nervoso íntegro, ❸ Lesões “delta”, ❹ Hipercontração, ❺ Edema intersticial, ❻ Área extensa de necrose de fibras musculares.

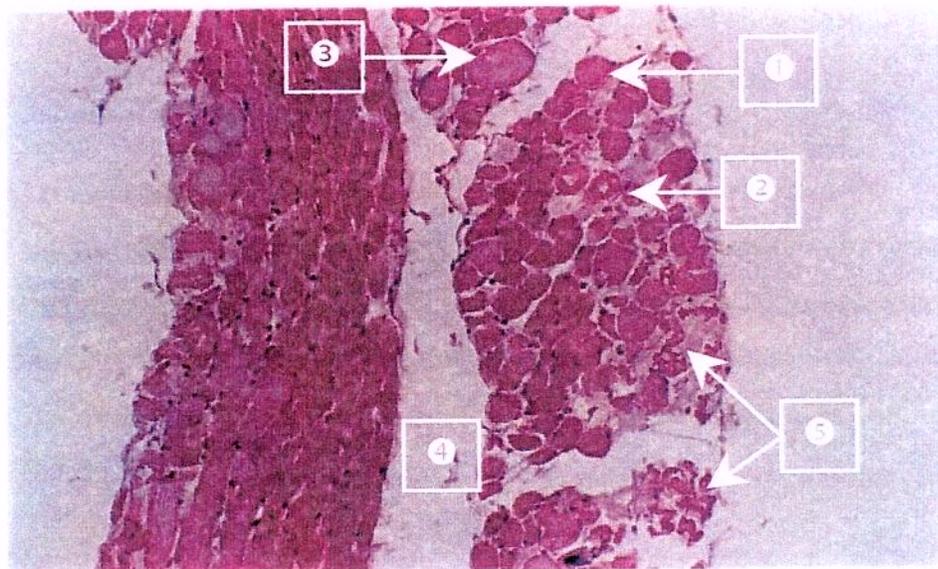


Figura 23: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 200 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Edema intersticial, ❺ Área focal de necrose de fibras musculares.

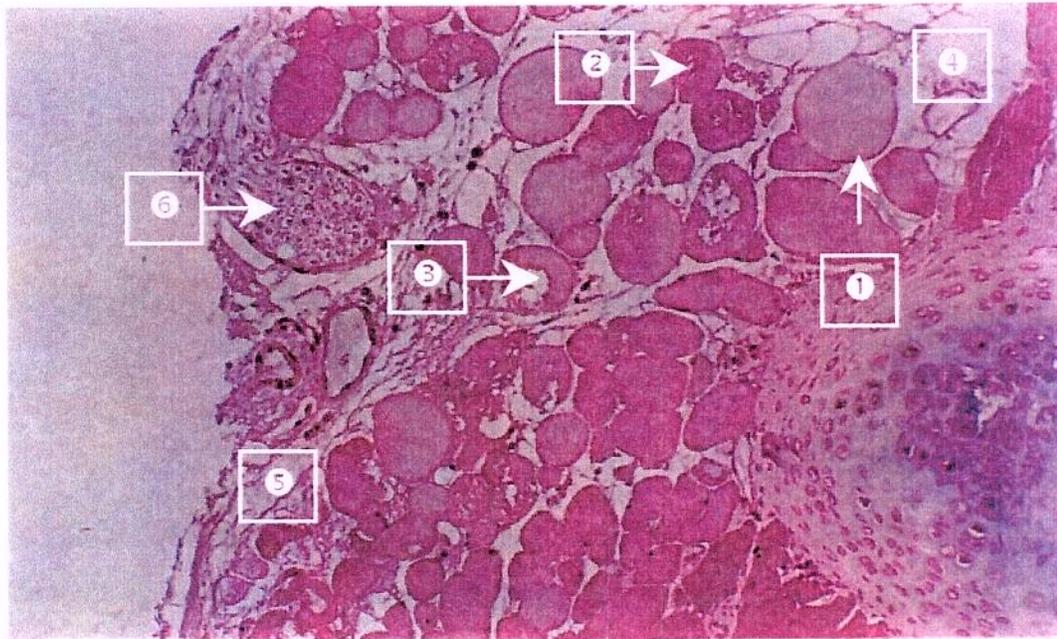


Figura 24: Corte histológico de músculo diafragma de camundongo, corado com Hematoxilina Eosina, após incubação de 200 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* fêmea, durante 120 minutos. Aumento 250 vezes. ❶ “Balonização”, ❷ Vacuolização, ❸ Lesões “delta”, ❹ Edema intersticial, ❺ Área focal de necrose de fibras musculares, ❻ Filete nervoso íntegro.

Não se observou diferenças na capacidade das diferentes amostras do veneno de *B. leucurus* em induzir mionecrose, com exceção da dose 200 µg/ml de serpentes procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS), que foi a mais ativa dentre todas as amostras. O dano muscular, de maneira geral, mostrou-se dose dependente sendo que a dose de 200 µg/ml foi a que causou destruição maciça das fibras localizadas na porção central do músculo, revelada pelos grandes espaços vazios no interior da célula.

Os aspectos de vacuolização, lesões “delta” e células intumescidas ou balonizadas, embora presentes em todas as concentrações testadas, foram mais frequentes nas doses mais baixas (10 e 20 µg/ml), enquanto que hipercontratilidade, condensação das miofibrilas alternado-se com espaços vazios no sarcoplasma, áreas focais e extensas de degeneração das fibras musculares foram observadas com maior frequência na doses mais altas (50, 100 e 200 µg/ml).

A presença de edema intersticial, em praticamente todas as doses, indicou que não houve preservação das propriedades das células musculares. A integridade dos filetes nervosos, mesmo em doses mais altas, aponta para uma destruição específica e exclusiva das células musculares, caracterizando assim a miotoxicidade deste veneno.

Utilizando-se a preparação Nervo Frênico Diafragma de Camundongo (NFD), obteve-se um estudo miográfico que demonstrou que em baixas concentrações (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ dos pools da RMS e SB e 20 $\mu\text{g/ml}$ dos pools de veneno de machos e fêmeas), a adição do veneno causou nenhum ou um baixo decréscimo progressivo da amplitude das contrações musculares. Na maioria (4 em 6 – amostras de veneno de fêmeas e 3 em 4 – amostras de veneno de machos) dos experimentos, onde foram aplicados estímulos indiretos, observou-se um visível aumento da amplitude das contrações musculares com posterior diminuição desta amplitude, quando utilizada a dose de 10 $\mu\text{g/ml}$.

A Tabela 5 ilustra o efeito do veneno de *B. leucurus* de diferentes regiões e machos e fêmeas nas doses de 50, 100 e 200 µg/ml sobre as respostas do diafragma à estimulação elétrica indireta. Observou-se um efeito dose-dependente em todas as concentrações e uma diferença estatisticamente significativa em nível de 95% de confiança, na capacidade dos diferentes “pools” de veneno da RMS e SB em promover o bloqueio neuromuscular nas doses de 100 e 200 µg/ml. Dessa maneira, o veneno de serpentes da região RMS teve maior capacidade de induzir 50% do bloqueio neuromuscular que o da SB (Figura 25). Apesar do veneno das fêmeas ter se mostrado mais ativo na indução de 50% do bloqueio neuromuscular que o veneno de machos, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 26).

Tabela 5: Tempo para 50% do bloqueio neuromuscular do veneno total de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil) e machos e fêmeas, sob estimulação indireta.

Amostra de veneno	Dose (µg/ml)	Tempo para bloqueio de 50% (min)	n
RMS	50	35 ± 11,8	6
	100*	25 ± 5,4	6
	200*	19 ± 3,0	6
SB	50	59 ± 6,9	4
	100*	30 ± 4,6	4
	200*	20 ± 4,2	4
Machos	50	-	3
	100	40 ± 2,3	3
	200	25 ± 1,5	3
Fêmeas	50	68 ± 13,3	4
	100	27 ± 4,3	5
	200	19 ± 2,8	4

RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Região Sul/Sudeste Baiano.

(-) = Não foi observado bloqueio de 50% (min) nesta dose.

*Em nível de $P < 0.05$ as médias foram significativamente diferentes.

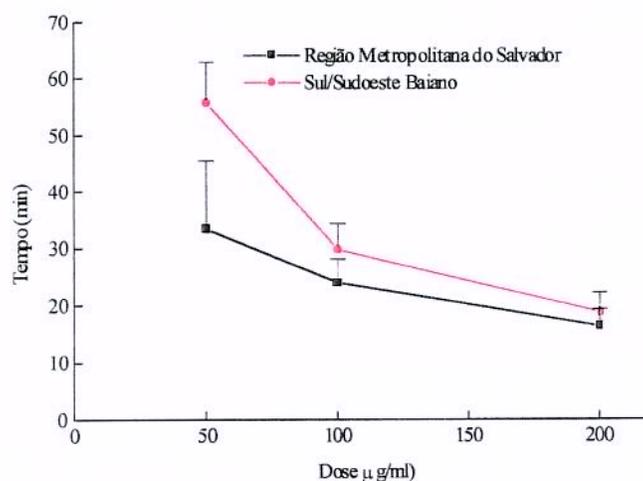


Figura 25: Curva dose-efeito (50% de bloqueio da resposta contrátil) do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil), em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3, 4 ou 5 experimentos ($P < 0.05$).

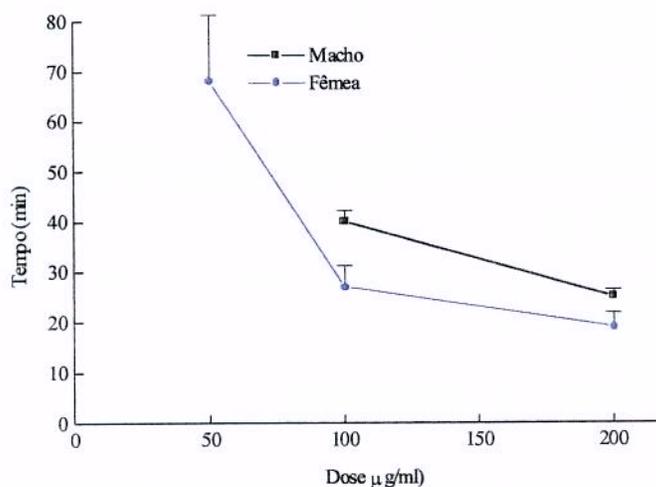
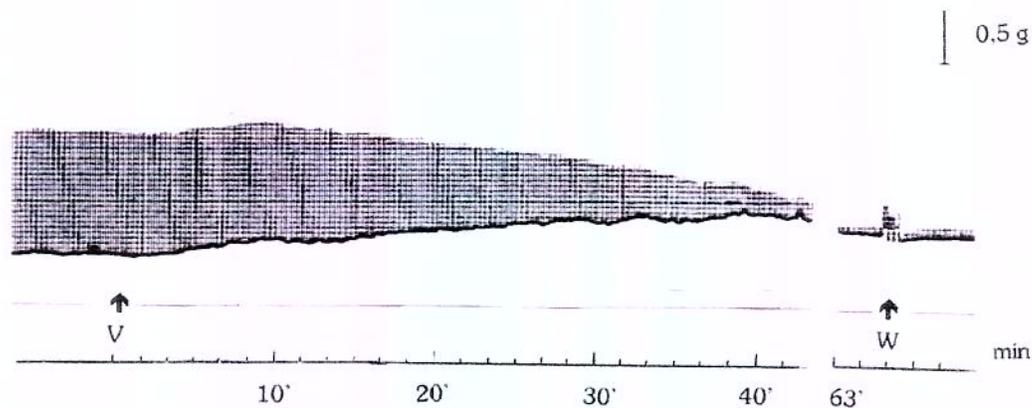
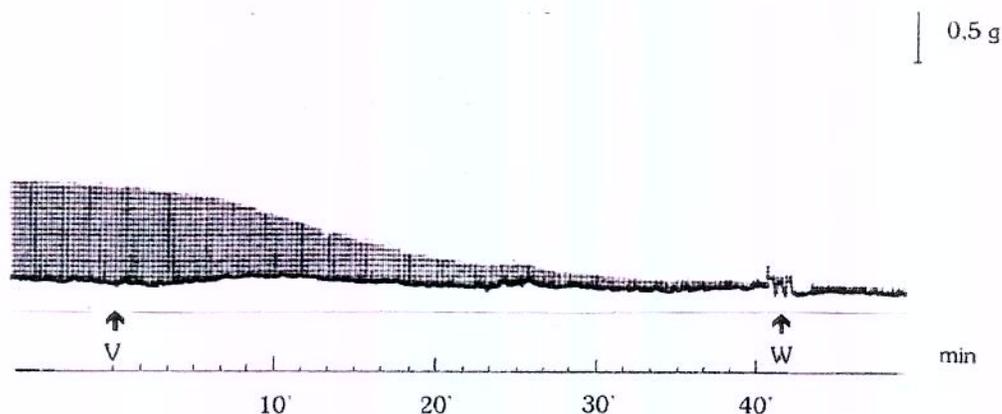


Figura 26: Curva dose-efeito (50% de bloqueio da resposta contrátil) do veneno de *Bothrops leucurus* de machos e fêmeas, em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3, 4 ou 5 experimentos ($P < 0.05$).

Nos *pools* de veneno da RMS e SB (nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$) houve um bloqueio irreversível das preparações mesmo após repetidas lavagens. Uma leve contratura esteve presente em praticamente todos os experimentos na dose de 100 $\mu\text{g/ml}$ e uma intensa contratura foi observada em todas as preparações em que se utilizou a dose de 200 $\mu\text{g/ml}$ (Figuras 27, 28 e 29).

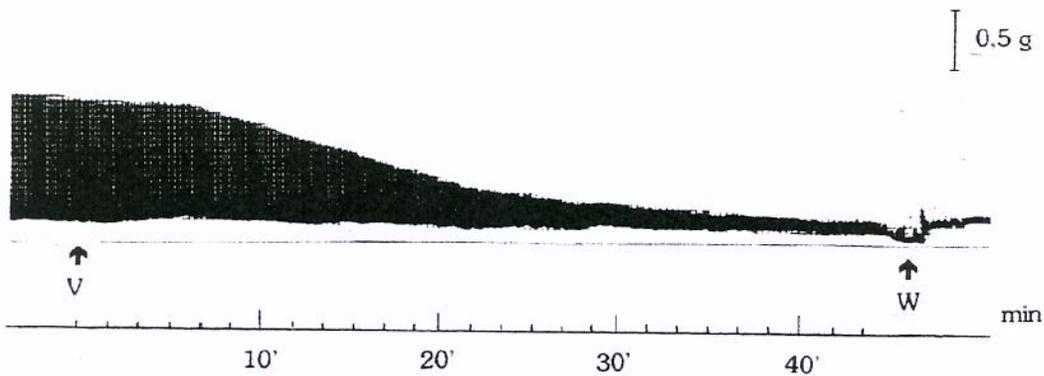


❶ Veneno de *Bothrops leucurus* da RMS (50 $\mu\text{g/ml}$)

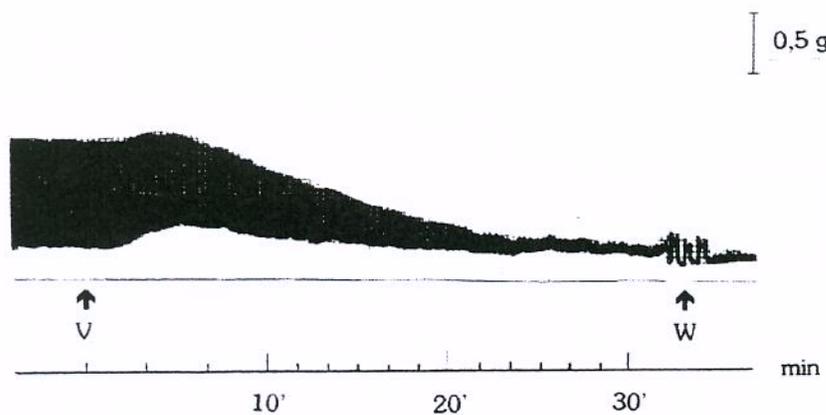


❷ Veneno de *Bothrops leucurus* do SB (50 $\mu\text{g/ml}$)

Figura 27: Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 50 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil).
❶ Ilustra o perfil miográfico do veneno da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e ❷ do veneno da Região Sul/Sudeste da Bahia (SB). V = veneno; W = lavagem.

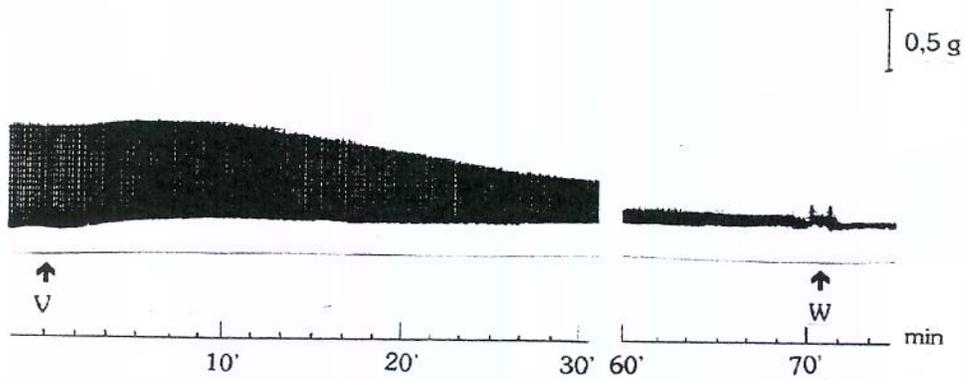


❶ Veneno de *Bothrops leucurus* da RMS (100 $\mu\text{g/ml}$)

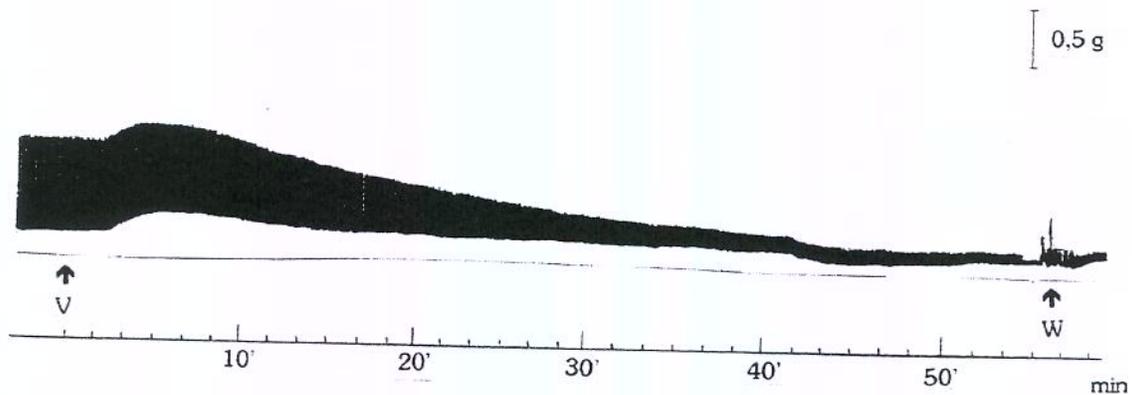


❷ Veneno de *Bothrops leucurus* do SB (100 $\mu\text{g/ml}$)

Figura 28: Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 100 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil). ❶ Ilustra o perfil miográfico do veneno da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e ❷ do veneno da Região Sul/Sudeste da Bahia (SB). V = veneno; W = lavagem.



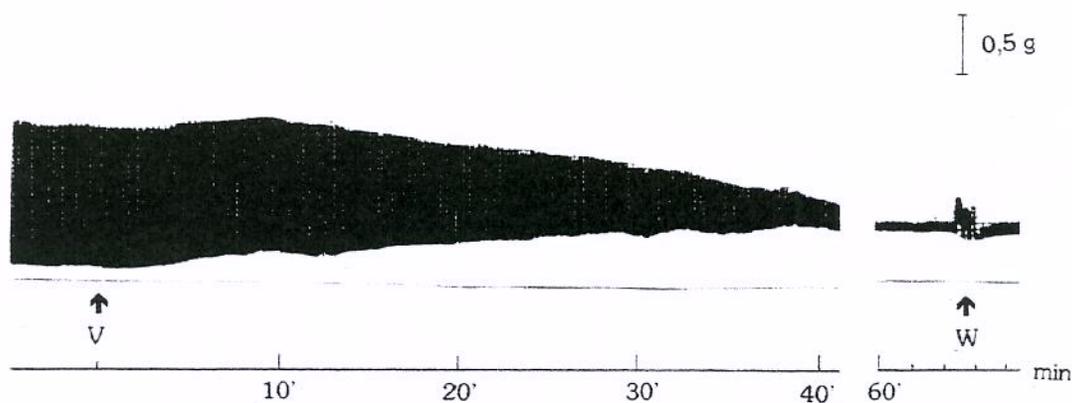
① Veneno de *Bothrops leucurus* da RMS (200 $\mu\text{g/ml}$)



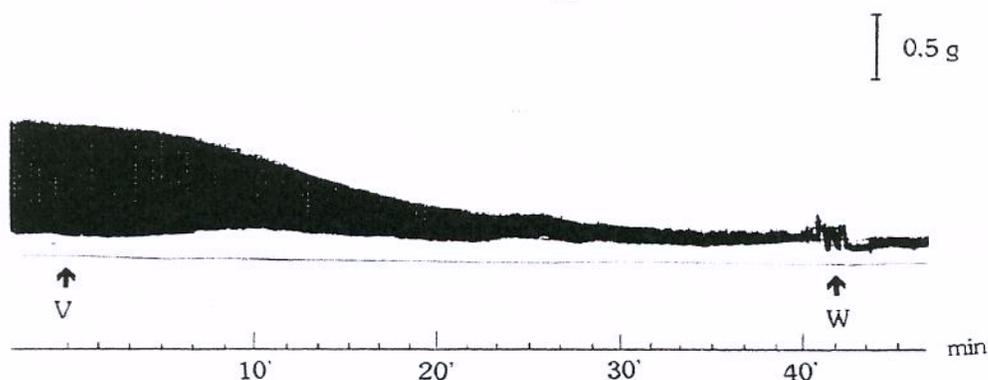
② Veneno de *Bothrops leucurus* do SB (200 $\mu\text{g/ml}$)

Figura 29: Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 200 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil). ① Ilustra o perfil miográfico do veneno da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e ② do veneno da Região Sul/Sudeste da Bahia (SB). V = veneno; W = lavagem.

Nos *pools* de veneno de machos (nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$) e fêmeas (nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$) houve um bloqueio irreversível das preparações mesmo após repetidas lavagens. Contratura moderada só foi observada nas preparações em que se utilizou a dose de 200 $\mu\text{g/ml}$ dos dois *pools* de veneno (Figuras 30, 31 e 32).

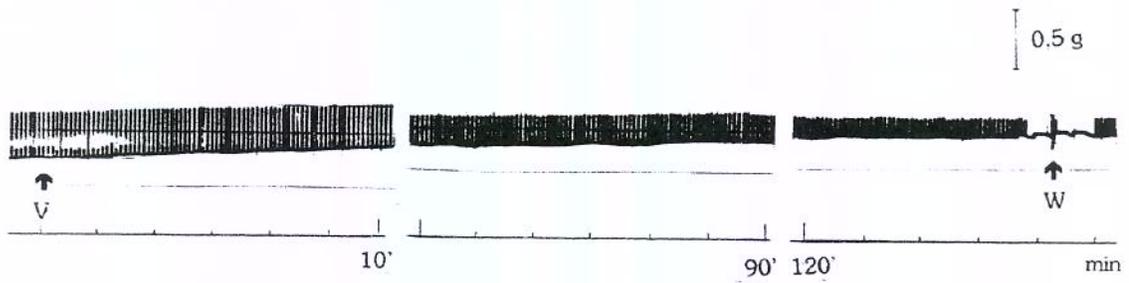


❶ Veneno de *Bothrops leucurus* machos (50 $\mu\text{g/ml}$)

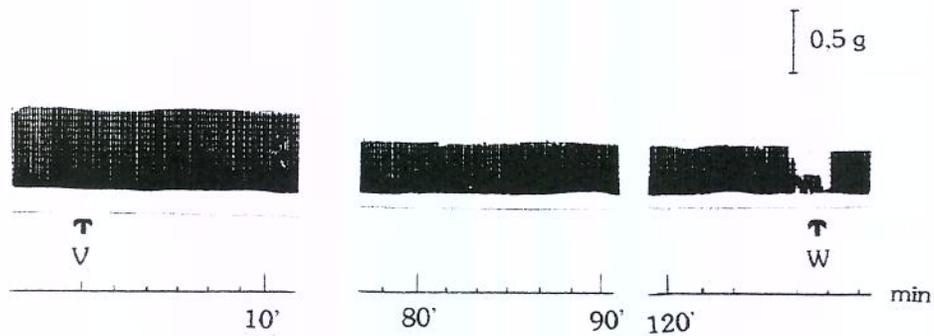


❷ Veneno de *Bothrops leucurus* fêmeas (50 $\mu\text{g/ml}$)

Figura 30: Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 50 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* machos e fêmeas. ❶ Ilustra o perfil miográfico do veneno de machos e ❷ do veneno de fêmeas (SB). V = veneno; W = lavagem.

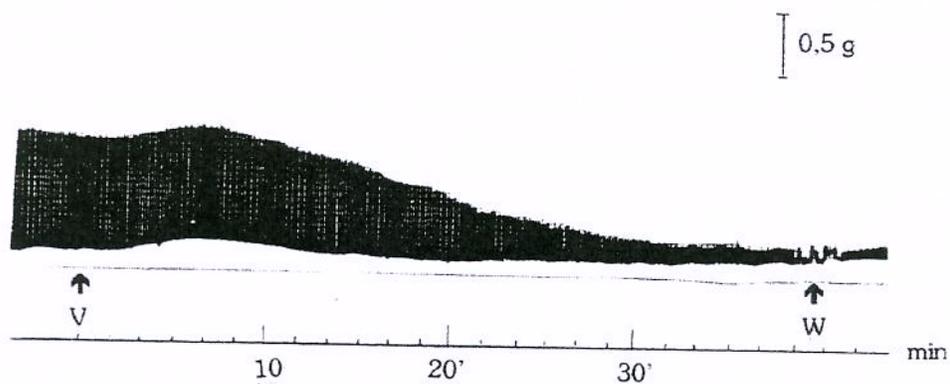


① Veneno de *Bothrops leucurus* machos (100 $\mu\text{g/ml}$)

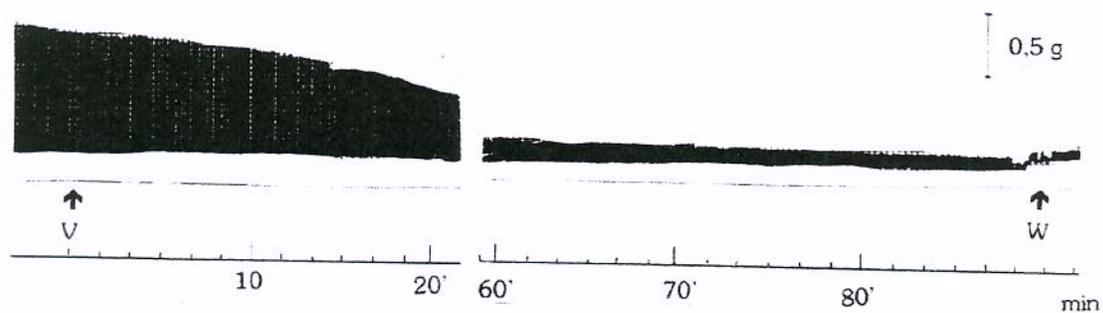


② Veneno de *Bothrops leucurus* fêmeas (100 $\mu\text{g/ml}$)

Figura 31: Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 100 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* de machos e fêmeas. ① Ilustra o perfil miográfico do veneno de machos e ② do veneno de fêmeas (SB). V = veneno; W = lavagem.



① Veneno de *Bothrops leucurus* machos (200 µg/ml)



② Veneno de *Bothrops leucurus* fêmeas (200 µg/ml)

Figura 32: Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo (estímulo indireto), após adicionado 200 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* de machos e fêmeas. ① Ilustra o perfil miográfico do veneno de machos e ② do veneno de fêmeas (SB). V = veneno; W = lavagem.

As figuras 33, 34, 35 e 36 ilustram os ensaios realizados com veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia e de machos e fêmeas, em preparações nervo frênico diafragma de camundongo. Os dados demonstram um efeito dose-dependente da resposta contrátil da preparação, sob estimulação indireta, ao longo de 120 minutos de observação, frente as diferentes doses utilizadas (10, 20, 50 100 e 200 µg/ml) marcadamente nos *pools* da SB e de fêmeas. Houve diferença significativa em nível de 95% de confiança na resposta contrátil entre todas as doses, comparadas dentro das amostras de veneno da RMS e SB, sendo este último mais ativo. No entanto, quando comparou-se a resposta contrátil em relação a cada dose de veneno procedente da RMS com o SB, esta diferença não foi estatisticamente significante ($P < 0,05$).

O veneno das fêmeas mostrou-se mais potente que o dos machos em determinar bloqueio das respostas musculares, nas doses de 20, 50, 100 e 200 µg/ml. O contrário aconteceu na dose de 10 µg/ml, onde o veneno dos machos foi mais ativo. Observou-se em alguns experimentos, um aumento na amplitude das contrações musculares induzido pelo veneno de machos e fêmeas na concentração de 10 µg/ml (Figura 37).

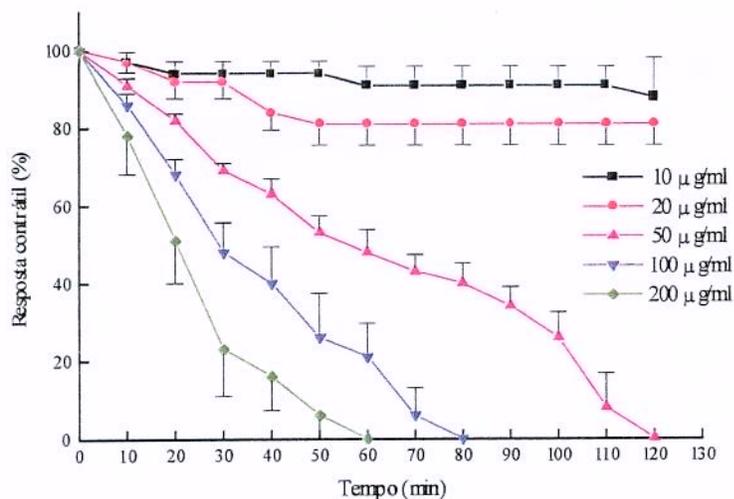


Figura 33: Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* da Região Metropolitana do Salvador sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3, 4 ou 5 experimentos ($P < 0.05$).

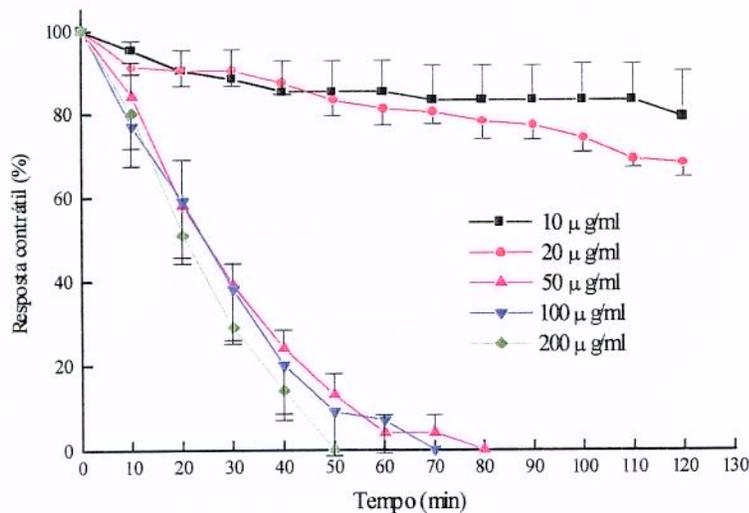


Figura 34: Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* do Sul/Sudoeste baiano sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 ou 4 experimentos ($P < 0.05$).

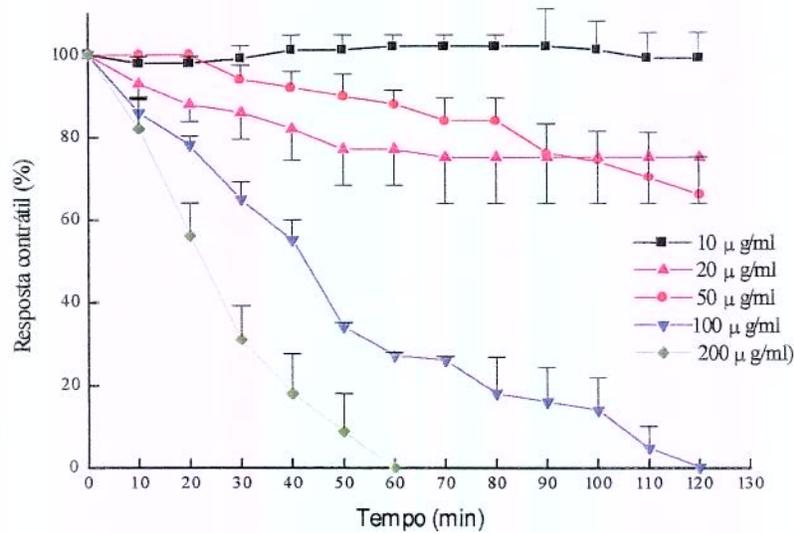


Figura 35: Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* machos sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 ou 4 experimentos ($P < 0.05$).

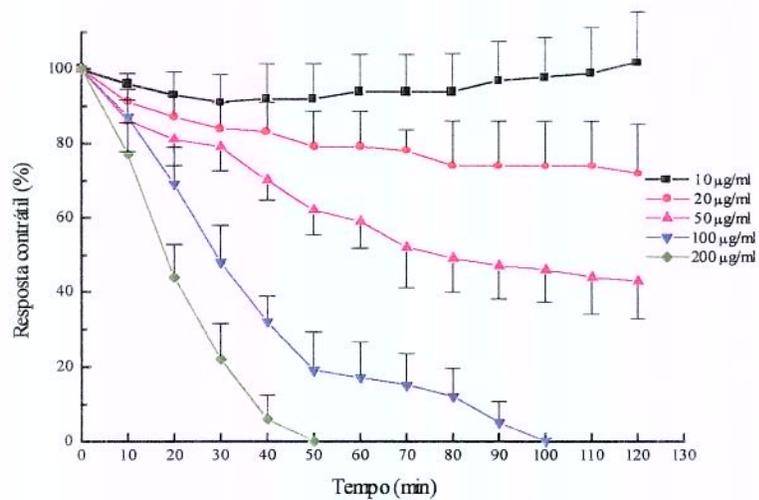
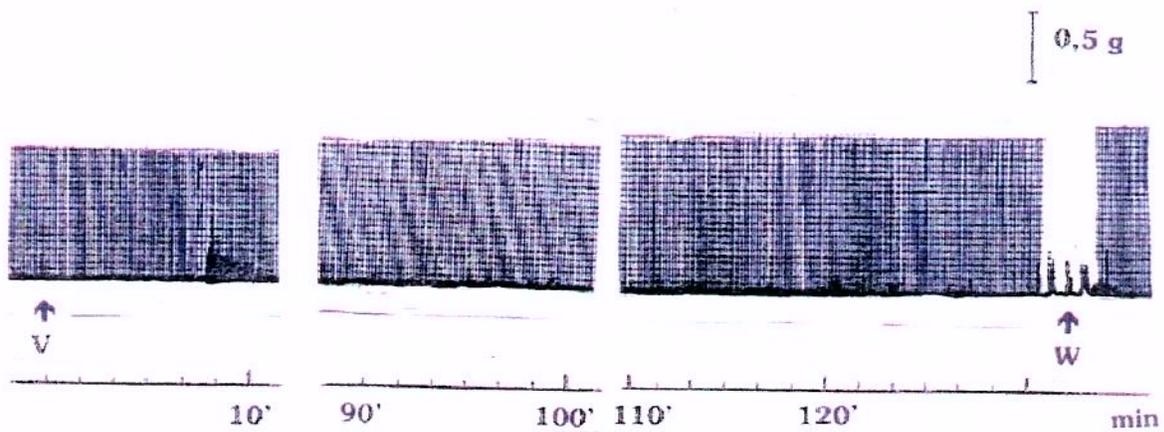
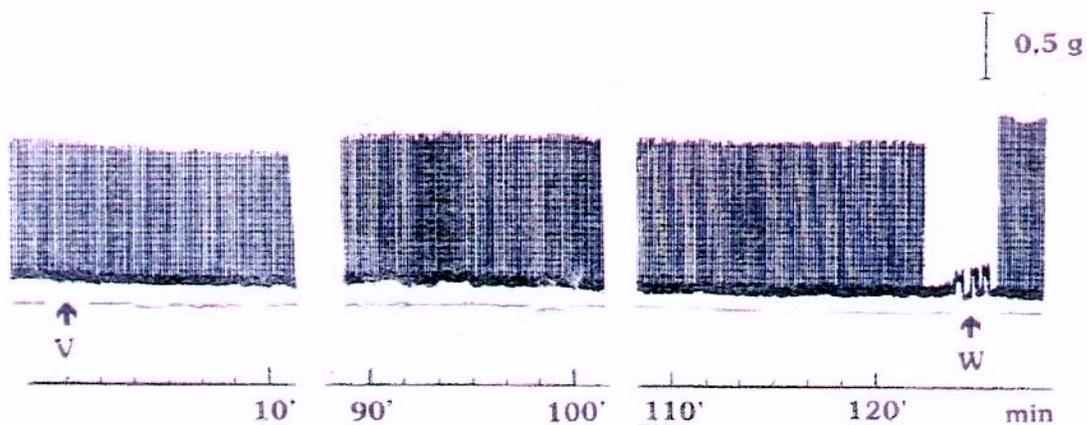


Figura 36: Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* fêmeas sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação indireta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3, 4,5 ou 6 experimentos ($P < 0.05$).



① Veneno de *Bothrops leucurus* machos (10 $\mu\text{g/ml}$)



② Veneno de *Bothrops leucurus* fêmeas (10 $\mu\text{g/ml}$)

Figura 37: Registros da força de contração muscular em preparação nervo frênico músculo diafragma de camundongo NFD (estímulo indireto), após adicionado 10 $\mu\text{g/ml}$ do veneno de *Bothrops leucurus* de machos e fêmeas. ① Ilustra o perfil miográfico do veneno de machos e ② do veneno de fêmeas (SB). V = veneno; W = lavagem.

A Tabela 6 demonstra o efeito do veneno de *B. leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia e de machos e fêmeas, quanto à resposta da contração acetilcolínica à estimulação direta de preparação músculo diafragma desnervado de camundongo. Verificou-se que a resposta à Ach, após a adição de veneno, foi inibida em todas as amostras, de maneira dose-dependente e irreversível. O veneno das serpentes da RMS provocou uma redução estatisticamente significativa maior ($P<0,05$) na amplitude da resposta muscular que o veneno do SB (Figura 38). O veneno de machos apresentou uma atividade maior que o das fêmeas, mas não estatisticamente significativa ($P<0,05$) (Figura 39).

Tabela 6: Resposta da contração acetilcolínica (%) do veneno total de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil) e de machos e fêmeas, à estimulação direta da preparação músculo diafragma desnervado de camundongo.

Amostra de veneno	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Resposta acetilcolínica (%)	n
RMS	50*	36 \pm 8,7	3
	100*	22 \pm 2,7	3
SB	50*	39 \pm 14,4	3
	100*	27 \pm 3,4	3
Machos	50	33 \pm 12,4	3
	100	16 \pm 4,9	3
Fêmeas	50	53 \pm 21,1	3
	100	20 \pm 5,9	3

RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Região Sul/Sudeste Baiano.

*Em nível de $P<0.05$ as médias foram significativamente diferentes.

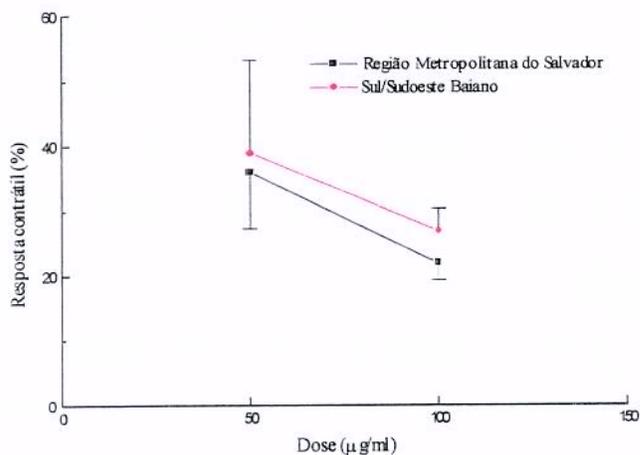


Figura 38: Curva dose-efeito do bloqueio da resposta contrátil à Acetilcolina do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia, Brasil, em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo, sob estimulação direta. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 ou 4 experimentos ($P < 0.05$).

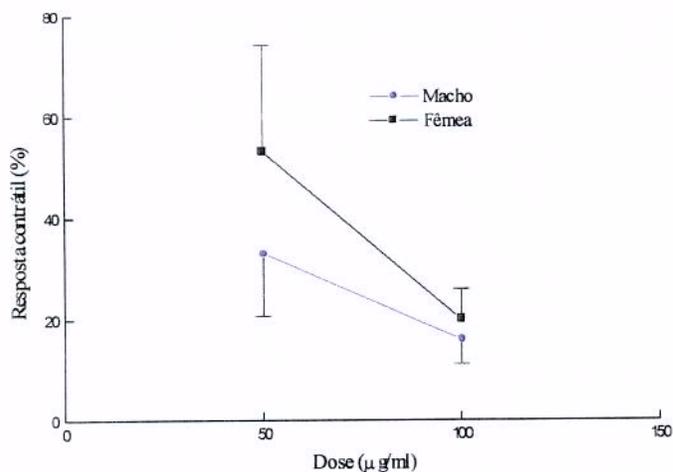
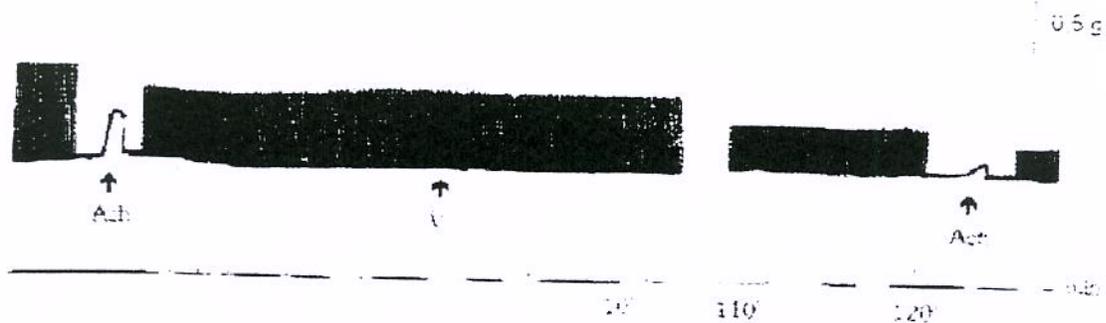


Figura 39: Curva dose-efeito do bloqueio da resposta contrátil à Acetilcolina do veneno de *Bothrops leucurus* machos e fêmeas, em preparação em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo, sob estimulação direta. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 experimentos ($P < 0.05$).

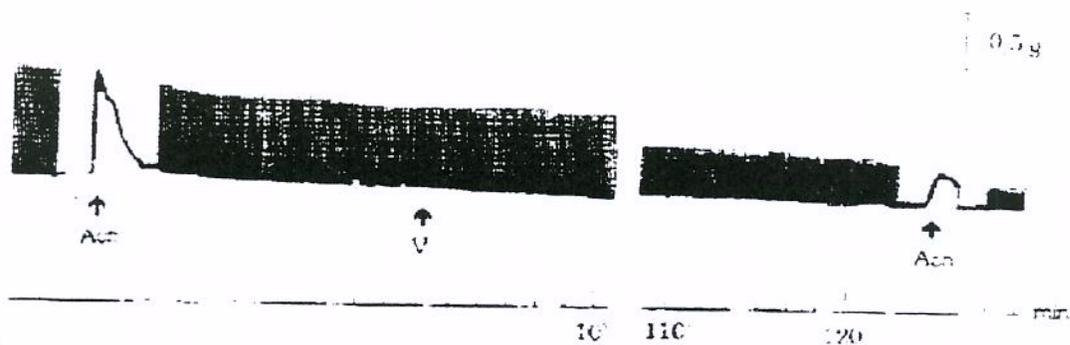
Observou-se uma inibição da resposta acetilcolínica e da contratatura produzida pelo músculo diafragma, nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, das quatro amostras de veneno (Figuras 40, 41, 42 e 43). Após 120 minutos de contato com as preparações, a dose de 50 µg/ml do veneno da RMS, condicionou redução média de 29% ($71 \pm 7,2\%$) na amplitude das respostas musculares e a dose de 100 µg/ml, uma redução média de 39% ($61 \pm 11,35\%$) (Tabela 7).

A peçonha de machos e fêmeas de *B. leucurus* também reduziu a resposta contrátil da preparação músculo cronicamente desnervado de camundongo (41% - $59 \pm 10,1\%$ e 46% - $54 \pm 12,5\%$ nas doses de 50 e 100 µg/ml do veneno de machos, respectivamente e 61% - $39 \pm 10,3\%$ e 44% - $56 \pm 7,4\%$ nas doses de 50 e 100 µg/ml do veneno de fêmeas, respectivamente) (Tabela 7).

Não se observou uma curva dose-resposta quanto à variável sexo, como a demonstrada nas amostras de veneno das diferentes regiões geográficas, já que o veneno das fêmeas foi mais ativo na concentração de 50 µg/ml do que na concentração de 100 µg/ml. Nesta última dose, não houve diferença entre *pool* de veneno de machos e fêmeas, apenas quando utilizou-se a dose de 50 µg/ml é que o veneno das fêmeas apresentou maior atividade (Figuras 44 e 45).

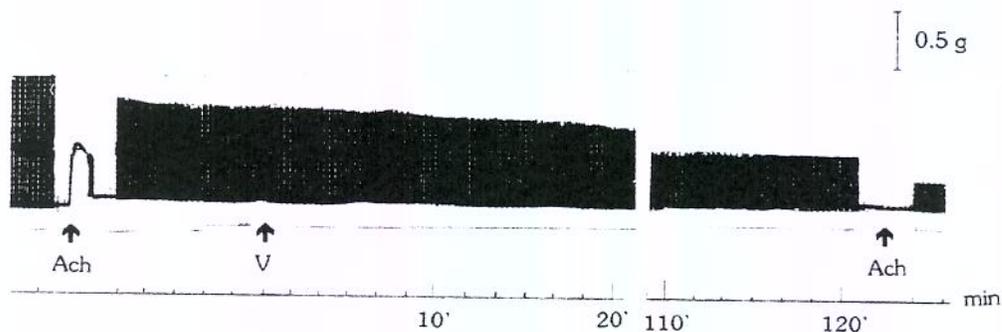


① Veneno de *Bothrops leucurus* da RMS (50 µg/ml)

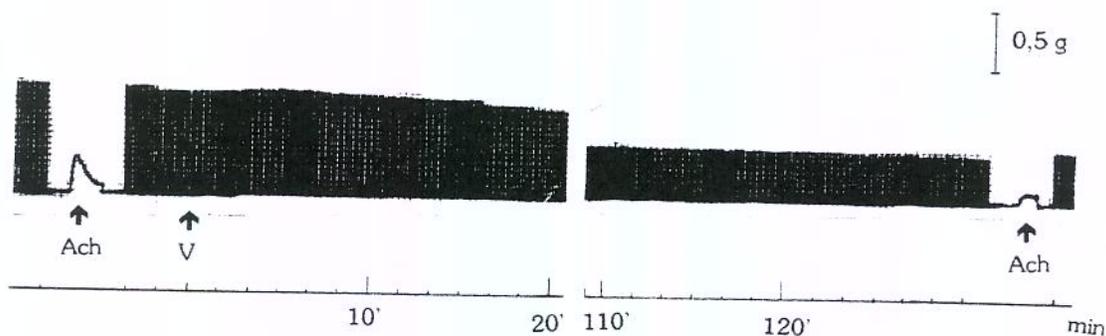


② Veneno de *Bothrops leucurus* do SB (50 µg/ml)

Figura 40: Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 50 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil). ① Ilustra o perfil miográfico do veneno da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e ② do veneno da Região Sul/Sudeste da Bahia (SB). V = veneno; W = lavagem.

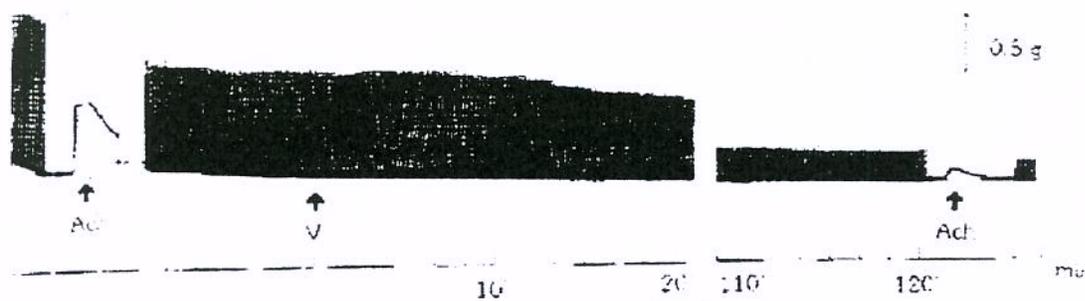


❶ Veneno de *Bothrops leucurus* da RMS (100 µg/ml)

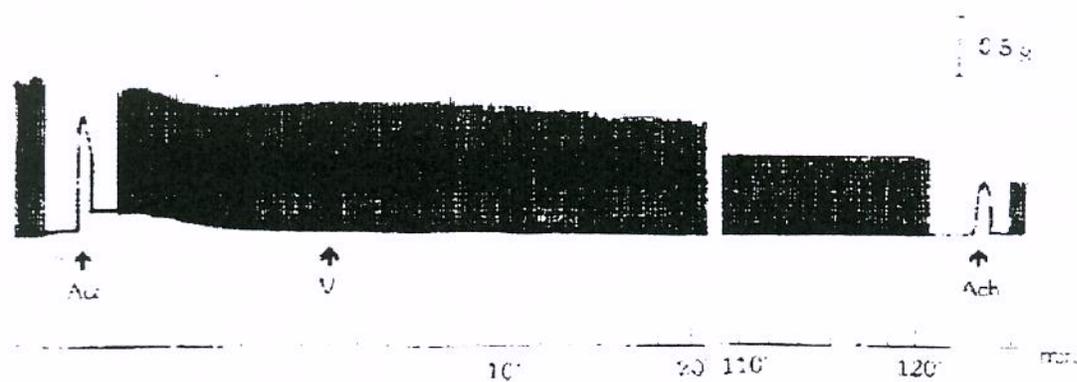


❷ Veneno de *Bothrops leucurus* do SB (100 µg/ml)

Figura 41: Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* de diferentes regiões do estado da Bahia (Brasil). ❶ Ilustra o perfil miográfico do veneno da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e ❷ do veneno da Região Sul/Sudeste da Bahia (SB). V = veneno; W = lavagem.

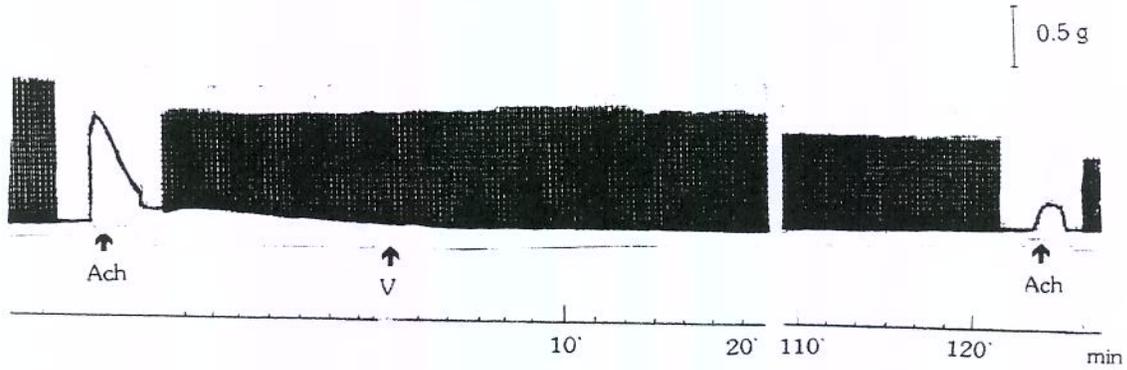


① Veneno de *Bothrops leucurus* machos (50 μ g/ml)

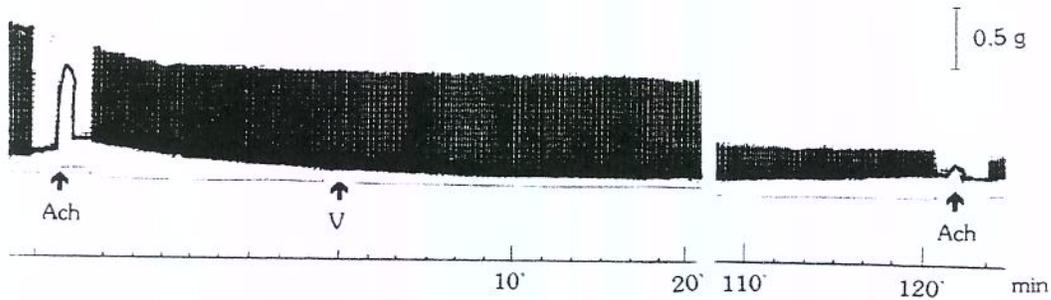


② Veneno de *Bothrops leucurus* fêmeas (50 μ g/ml)

Figura 42: Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 50 μ g/ml do veneno de *Bothrops leucurus* machos e fêmeas. ① Ilustra o perfil miográfico do veneno de machos e ② do veneno de fêmeas. V = veneno; W = lavagem.



① Veneno de *Bothrops leucurus* machos (100 µg/ml)



② Veneno de *Bothrops leucurus* fêmeas (100 µg/ml)

Figura 43: Registros da força de contração muscular em preparação músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo (estímulo direto) e a resposta acetilcolínica (%), após adicionado 100 µg/ml do veneno de *Bothrops leucurus* machos e fêmeas. ① Ilustra o perfil miográfico do veneno de machos e ② do veneno de fêmeas. V = veneno; Ach = Acetil colina.

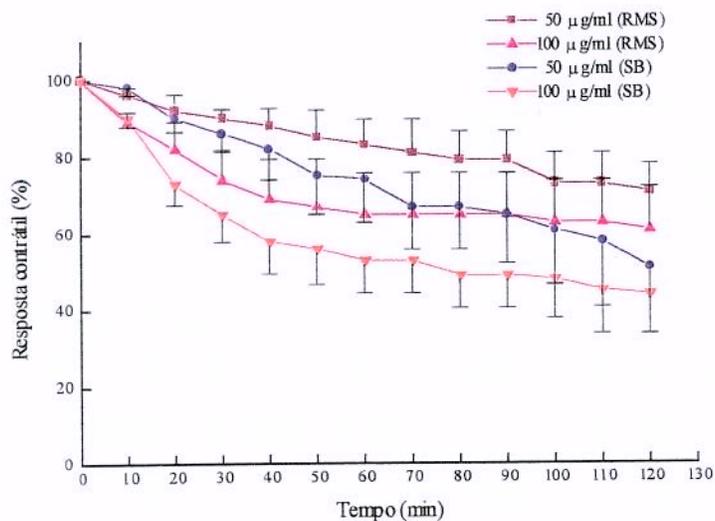


Figura 44: Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* da Região Metropolitana de Salvador (RMS) e Sul/Sudoeste Baiano (SB) sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação direta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 ou 4 experimentos ($P < 0.05$).

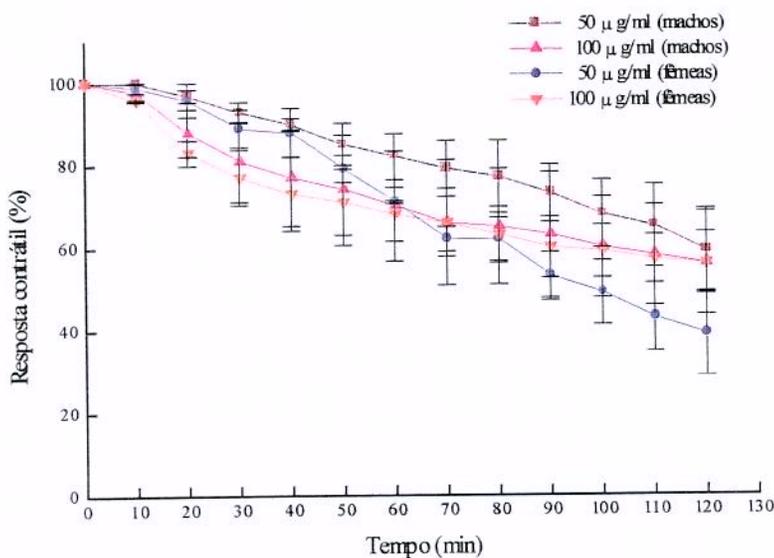


Figura 45: Efeito do veneno de *Bothrops leucurus* machos e fêmeas sobre a preparação nervo frênico diafragma de camundongo, sob estimulação direta, durante 120 minutos. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão de 3 experimentos ($P < 0.05$).

6.3. CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA:

O ensaio de ELISA mostrou o grau de reatividade das 4 amostras (♂,♀, RMS e SB) do veneno de *B. leucurus* frente aos 4 soros disponíveis: Soros antibotrópico-crotálicos (SABC) do Instituto Butantan (IB), Instituto Vital Brazil (IVB), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e Soro anti-*B. leucurus* do Instituto Malbrán (Argentina). Os resultados demonstraram que todas as amostras apresentaram títulos de anticorpos frente a todos os anti-soros testados. No entanto, a titulação foi maior frente ao soro específico anti-*B. leucurus* para todas as amostras, com exceção da RMS, onde a titulação deste soro foi equivalente a do SABC do IB (Figura 46).

Dentre os soros inespecíficos (SABC) o que apresentou maior titulação foi o do IB, seguido do SABC da FUNED e do IVB. O SABC/IB apresentou maior titulação de anticorpos frente ao veneno de machos e da RMS e menor frente ao veneno de fêmeas e da SB. Os SABC/FUNED e IVB foram melhor reconhecidos pelo veneno de serpentes machos, da RMS e SB do que pelo veneno de fêmeas (Figura 46).

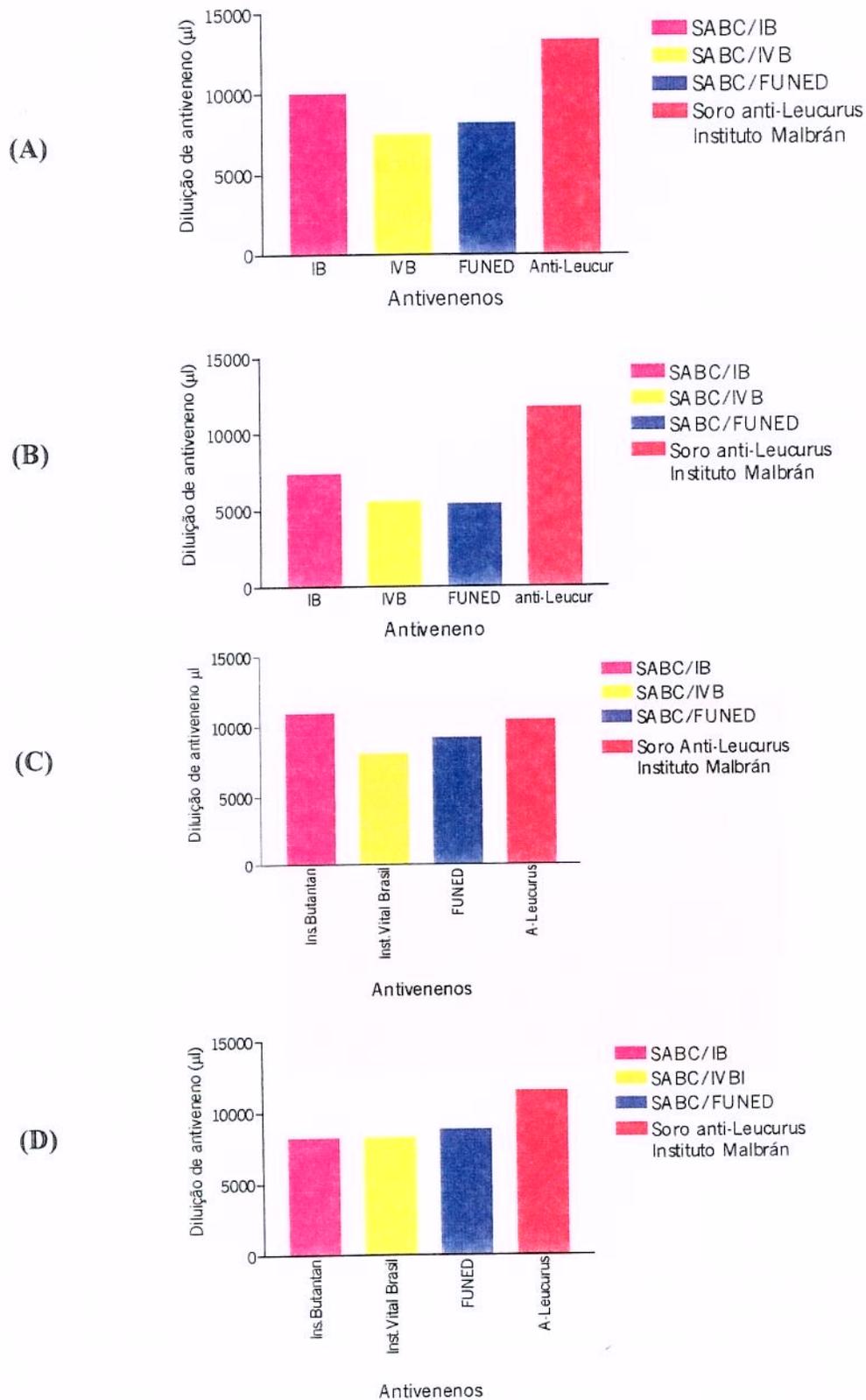


Figura 46: Diluição de diferentes soros antiofídicos que diminuí em 50% a A_{490} , em ELISA, referente ao veneno de *Bothrops leucurus* machos (A), fêmeas (B) e procedentes da Região Metropolitana do Salvador (C) e Sul/Sudeste baiano (D).

O Westernblot revelou a caracterização imunológica das 4 amostras (♂,♀, RMS e SB) do veneno de *B. leucurus* frente ao Soro antibotrópico-crotálico (SABC) do Instituto Butantan (IB) e Soro anti-*B. leucurus* do Instituto Malbrán (Argentina). Os resultados demonstraram que o veneno desta espécie apresentou reação cruzada, tanto frente ao soro anti-*B. leucurus* quanto ao SABC do IB, embora não seja utilizado como imunógeno no “pool” para a fabricação deste último soro. Apesar disso, a reação foi mais intensa quando utilizou-se o soro específico. Todas as amostras apresentaram perfil semelhante quanto ao complexo antígeno-anticorpo, moléculas antigênicas que migraram para a membrana de celulose (Figuras 47 e 48).

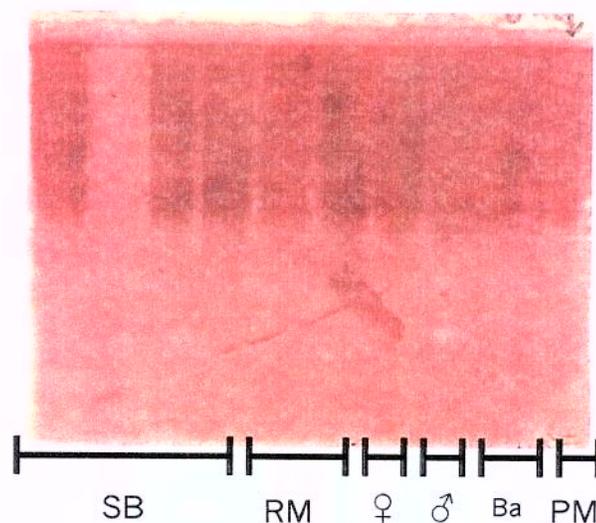


Figura 47: Padrão imunoeletroforético das quatro amostras do veneno de *Bothrops leucurus* (RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Sul/Sudeste baiano; ♂ = machos; ♀ = fêmeas; Ba = *B. alternatus*; PM = Marcador de Peso Molecular), frente ao soro antibotrópico-crotálico do Instituto Butantan.

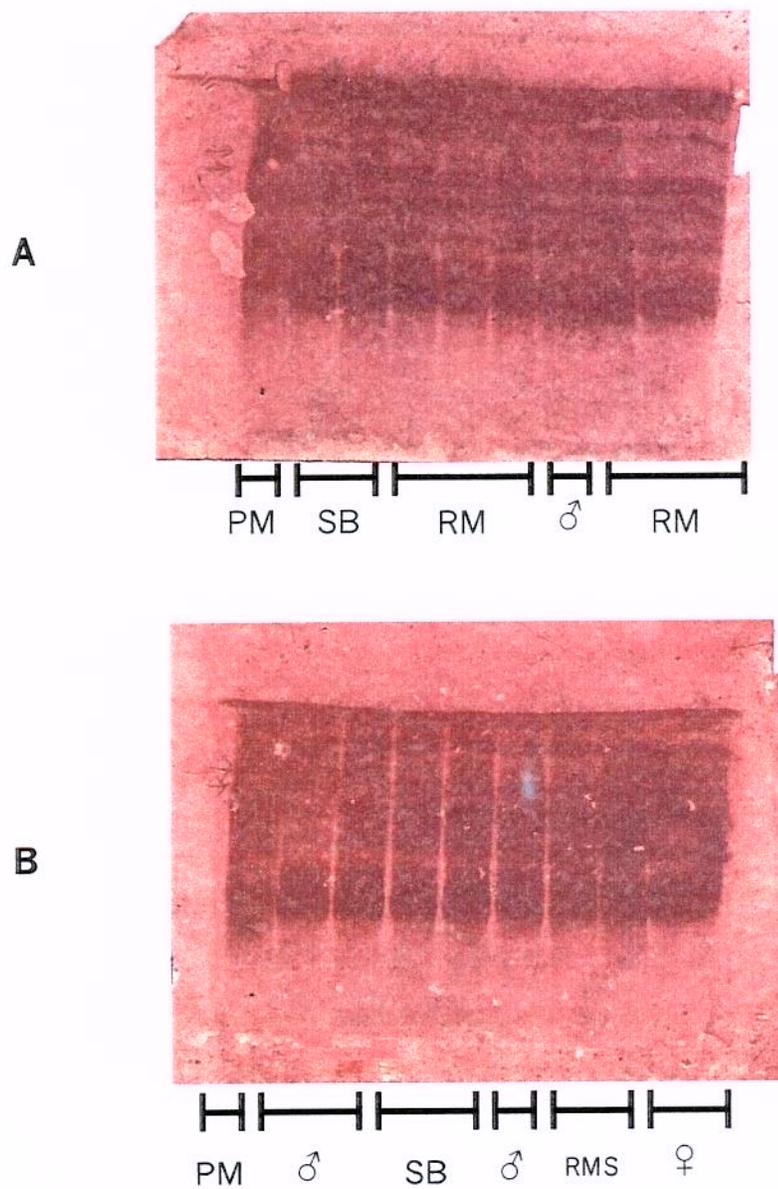


Figura 48: Padrão imunoeletroforético das quatro amostras do veneno de *Bothrops leucurus* (RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Sul/Sudeste baiano; ♂ = machos; ♀ = fêmeas; PM = Marcador de Peso Molecular), frente ao soro antibotrópico-crotálico do soro anti-*B. leucurus* do Instituto Malbrán (A e B)

6.4. NEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICAS:

A Tabela 7 demonstra que todos os antivenenos foram capazes de neutralizar as atividades hemorrágica, necrosante e hemolítica das 2 amostras de veneno de *B. leucurus*. Apesar disso, houve variação da capacidade neutralizante dos diferentes soros produzidos no País frente as amostras utilizadas. De maneira geral, o SABC produzido pelo IB foi mais eficiente para neutralizar as atividades hemorrágica e hemolítica indireta quando comparado com os soros da FUNED e IVB.

Todos os soros neutralizaram mais a atividade hemorrágica do veneno de serpentes procedentes do SB que da RMS. Dentre eles, o mais eficiente para esta atividade foi o produzido pelo Instituto Butantan para as duas amostras de veneno (Tabela 7).

Por outro lado, o SABC produzido pela FUNED neutralizou mais a atividade necrosante do veneno das serpentes da RMS que da SB ($36,3 \pm 3,2$ e $70,1 \pm 8,5$ μ l, respectivamente), enquanto que o resultado obtido com o soro produzido pelo IB mostrou que ele teve poder de neutralização equivalente, frente aos veneno da SB e da RMS ($47,9 \pm 2,1$ e $48,3 \pm 1,5$ μ l, respectivamente) (Tabela 7).

Dados contidos na Tabela 3 mostram que o SABC do IB foi 47 e 33 vezes mais potente na soroneutralização da atividade hemolítica indireta do veneno de *B. leucurus* da RMS que da SB (4,5 e 93,2 μ l, respectivamente). Os SABC do IVB e FUNED neutralizaram de maneira mais eficiente esta atividade tanto para amostras da RMS quanto SB, sendo que para esta última a capacidade neutralizante foi maior.

Tabela 7: Capacidade neutralizante (DE₅₀) dos antivenenos comerciais antibotrópico-crotálico produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias frente às principais atividades biológicas do veneno da serpente *Bothrops leucurus* procedentes da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste Baiano, Bahia, Brasil.

Atividade Biológica	Soro	DE ₅₀ frente às amostras de veneno (µl)	
		RMS	SB
Hemorragica	IB	18,3±2,2	12,5±2,0
	IVB	25,0±2,0	20,0±2,0
	FUNED	27,0±2,0	20,0±2,0
Necrosante	IB	48,3±1,5	47,9±2,1
	IVB	-	-
	FUNED	36,3±3,2	70,1±8,5
Hemolítica indireta	IB	4,5 (2,7 a 7,7)	93,2 (50 a 173)
	IVB	212,0 (209 a 215)	166,0 (118 a 230)
	FUNED	149,0 (139 a 158)	130,0 (109 a 155)

RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Sul/Sudeste Baiano; DE₅₀ = Dose Efetiva 50% de soro; SABC = Soro antibotrópico-crotálico; IB = Instituto Butantan; IVB = Instituto Vital Brazil; FUNED = Fundação Ezequiel Dias; (-) = Atividades não testadas para estas amostras.

A Tabela 8 e a Figura 49 demonstram a capacidade neutralizante dos antivenenos antibotrópico-crotálico (SABC) produzidos pelo Instituto Butantan (IB), Instituto Vital Brazil (IVB) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED) frente à atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino, do veneno de *Bothrops leucurus* machos, fêmeas e procedentes da Região Metropolitana do Salvador (RMS) e Sul/Sudeste Baiano (SB).

A Dose de 100 µl de todos os soros utilizados foi mais eficiente em neutralizar a atividade coagulante deste veneno, do que a dose de 25 µl.

Na dose de 100 µl, o SABC do IB neutralizou melhor a atividade coagulante do veneno de serpentes procedentes da RMS e SB (1800±0 e 1800±0 segundos, respectivamente) do que a atividade do veneno de machos e fêmeas (999±0 e 1018±0 segundos, respectivamente), que foram neutralizados de maneira equivalente. O SABC do IVB, no entanto, se mostrou o mais eficiente em neutralizar a atividade coagulante do veneno de serpentes da RMS (1395±361 segundos) e neutralizou igual o veneno de serpentes da SB, machos e fêmeas (1212±38,9, 1220±26,9 e 1199±57,3 segundos, respectivamente). O SABC da FUNED não mostrou diferença na capacidade neutralizante desta atividade frente as diferentes amostras de veneno (1207±0, 1218±0, 1246±25,5 e 1244±0 segundos para RMS, SB, machos e fêmeas, respectivamente).

O antiveneno produzido pela FUNED foi o que melhor neutralizou o veneno de todas as amostras na dose de 25 µl, mostrando-se mais eficiente frente a atividade do veneno de serpentes da RMS, seguido de SB, machos e fêmeas. Nesta mesma dose, os SABC do IB e IVB neutralizaram de maneira equivalente a atividade do veneno das 4 amostras.

Tabela 8: Capacidade neutralizante (DE₅₀) dos antivenenos comerciais antibotrópico-crotálico produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias frente à atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino, do veneno da serpente *Bothrops leucurus* machos, fêmeas e procedentes da Região Metropolitana do Salvador, Sul/Sudeste Baiano, Bahia, Brasil.

Veneno (µg/tubo)	Soro antibotrópico-crotálico (µl)						Controle
	IB		IVB		FUNED		
	25	100	25	100	25	100	
RMS	90±0	1800±0	120±6,6	1395±361	300±0	1207±0	36±3,5
SB	95±0	1800±0	120±0	1212±38,9	240±0	1218±0	40±4,2
Machos	98±0	999±0	125±0	1220±26,9	171±0	1246±25,5	18±0,7
Fêmeas	77±3,5	1018±0	106±0	1199±57,3	93±0	1244±0	14±1,4

RMS = Região Metropolitana do Salvador; SB = Sul/Sudeste baiano; DE₅₀ = Dose Efetiva 50% de soro; SABC = Soro antibotrópico-crotálico; IB = Instituto Butantan; IVB = Instituto Vital Brazil; FUNED = Fundação Ezequiel Dias; (-) = Atividades não testadas para estas amostras. * Os dados estão demonstrados em segundos.

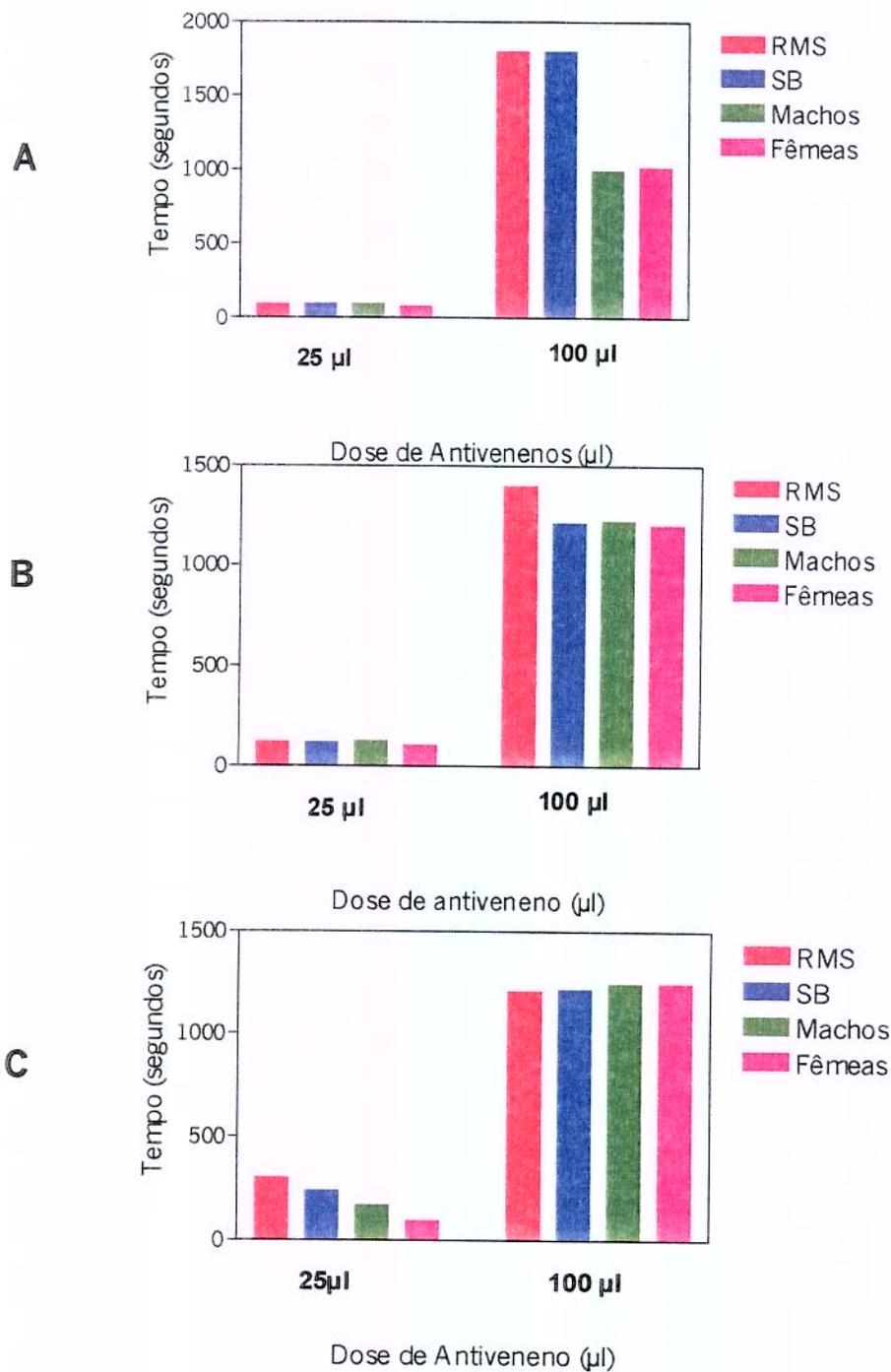


Figura 49: Demora na formação de coágulo induzido pelo veneno de *Bothrops leucurus* procedente da Região Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste baiano e machos e fêmeas, frente ao Soro antibotrópico-crotálico (SABC) do Instituto Butantan (A), Instituto Vital Brazil (B) e da Fundação Ezequiel Dias (C).

7. DISCUSSÃO

7.1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA:

Venenos de serpentes constituem-se em um conjunto complexo de proteínas com diferentes atividades farmacológicas (Moura-da-Silva, 1992).

Segundo Chippaux *et al.* (1991), métodos bioquímicos têm sido extensivamente utilizados em estudos de caracterização de peçonhas e diferenciação e classificação de espécies de serpentes. Alguns autores sugerem que as diferenças quantitativas nas propriedades bioquímicas, têm valor limitado e argumentam que as propriedades do veneno não são aplicáveis, uma vez que estão sujeitas a grande variação individual na sua composição, devido a diferenças geográficas, estacionais, de coloração do veneno, de idade, sexo e dieta da serpente, além de diferenças quanto ao procedimento de secagem e/ou estocagem a que foi submetido o veneno. (Willemse, 1978; Gutiérrez *et al.*, 1980; Lomonte *et al.*, 1983; Meier, 1986; Minton & Weinstein, 1986; Furtado, 1987; Chippaux *et al.*, 1991; Furtado *et al.*, 1991; Tan & Ponnudurai, 1992; López-Lozano *et al.*, 1997a, 1997b; Sasa, 1999). Vários autores como Jiménez-Porras (1964, 1967, *apud* Perrone *et al.*, 1989) concluem que as variações nos venenos são de origem genética. Apesar disso, Saint-Girons & Detrait (1978, *apud* Perrone *et al.*, 1989), estudando a antigenicidade dos venenos das serpentes européias, coloca-os como caracteres válidos para fins sistemáticos, embora este problema ainda não tenha sido resolvido, considerando que várias glândulas têm genes reguladores comuns a outros sistemas e que influenciam diferentes órgãos e seu desenvolvimento (Kochva, 2000)

O teor protéico do veneno de *B. leucurus* foi estimado a partir de uma curva padrão de albumina bovina, contendo 89,9% de proteínas, dado que concorda com Bjarnason & Fox (1988/89), Devi (1990) e Stocker (1990) que referem que o veneno de serpentes contém de 70 a 90% de proteína, constituindo-se nas principais frações tóxicas das peçonhas. Furtado (1987) e Vasconcelos (1996) referem um conteúdo menor de proteínas do veneno da *B. moojeni* e *B. erythromelas*, quando comparado com o obtido por nós para *B. leucurus* (78,8%, 83,7% e 89,9% de proteínas, respectivamente).

Furtado *et al.* (1991) analisaram o conteúdo protéico das peçonhas de 8 espécies do gênero *Bothrops* e observaram que a maioria delas apresentava de 1,0 a 1,5 mg de proteínas totais por mg de veneno. Esta superestimativa foi explicada pelo uso de um

padrão que continha uma menor quantidade de aminoácidos aromáticos em relação às peçonhas. A única exceção foi a *B. cotiara* cujo valor protéico foi 0,85 mg de proteína por mg de veneno, sendo similar ao obtido por nós para a *B. leucurus*, e para *B. erythromelas*, obtido por Vasconcelos (1996).

Estas proteínas podem ter peso molecular variável, serem básicas ou ácidas, dotadas ou não de atividades enzimáticas. São de modo geral, as principais frações tóxicas dos venenos da maioria dos animais (cerca de 85%). Já a L-amino oxidase, por exemplo, é uma enzima com riboflavina como parte de seu grupo prostético, que dá a coloração amarela aos venenos (Stocker, 1990), desprovida de toxicidade.

A eletroforese em gel de poliacrilamida tem sido empregada por numerosos pesquisadores na separação e identificação dos componentes protéicos dos venenos ofídicos. Devido ao alto poder de resolução, este método permite a separação dos componentes revelando um perfil eletroforético com bandas de coloração e migração relativas, altamente reprodutíveis e características dos venenos de determinadas espécies (Furtado, 1987). A taxonomia das serpentes está usualmente baseada em aspectos morfológicos e este método bioquímico pode servir como uma técnica auxiliar na classificação dos gêneros e espécies das famílias Elapidae e Viperidae e na detecção de variabilidade qualitativa inter ou intraespecífica (Soares *et al.*, 1998).

Gonçalves & Vieira (1950, citados por Perrone *et al.*, 1989), analisando os venenos de serpentes brasileiras, verificaram variações geográficas nas peçonhas de *Crotalus durissus terrificus*, demonstrando que as amostras procedentes do Sul do Brasil e da Argentina, apresentam crotamina, enquanto que os de outras regiões não apresentam. Aragon & Gubensek (*apud* Perrone *et al.*, 1989) observaram que o veneno de *Bothrops asper* diferia em função de sua zona de ocorrência. No entanto, Monteiro *et al.* (1997) demonstraram, através da eletroforese, que a produção de botrojararina de serpentes do gênero *Bothrops*, de mesma região, não apresentava variação sazonal.

As 4 amostras do veneno de *Bothrops leucurus* (procedentes da Região Metropolitana do Salvador, Sul/Sudeste baiano e de machos e fêmeas) apresentaram-se semelhantes entre si, já que todos os venenos apresentaram 4 bandas (sendo que o veneno das fêmeas apresentaram a banda 2 um tanto esmaecida, quase ausente) e uma banda (3) bem nítida.

Estes resultados concordam com os obtidos por Perrone *et al.* (1989) para os venenos de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* procedentes de São Paulo e Paraná que não demonstraram diferenças quanto aos perfis eletroforéticos. No entanto, estes mesmos autores encontraram variações nos perfis do veneno de *B. jararacussu* destas mesmas regiões. Casais-e-Silva (1995) também observou diferenças populacionais no perfil eletroforético de *Micrurus lemniscatus* procedentes das regiões Metropolitana do Salvador e Sul/Sudeste Baiano), tanto no número de bandas como peso molecular das mesmas.

Borja-Oliveira (1998) também não encontrou diferenças entre as amostras de veneno de *B. neuwiedi* procedentes dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, que pudessem ser atribuídas às procedências.

O padrão eletroforético de *B. leucurus* foi diferente do perfil do veneno de *B. erythromelas*, que apresentou um número maior de bandas (6, obtido por Vasconcelos, 1996 e 7, obtido por Bezerra, 2000) e assemelhou-se com o de *B. atrox* referido por Mourada-Silva (1992) e Soares *et al.* (1998). Estas duas últimas espécies, juntamente com *B. isabelae*, *B. marajoensis*, *B. moojeni* e *B. pradoi* fazem parte do Grupo ATROX e têm sido extensivamente estudadas por Wüster *et al.* (1998), que sugerem que possam tratar-se de mesma espécie, e que as diferenças morfológicas entre elas representem variações populacionais, embora isto ainda não esteja claro pelas análises de DNA mitocondrial realizadas.

Santoro *et al.* (1997) também observaram diferenças marcantes no perfil eletroforético de três subespécies de *Crotalus durissus* (*C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*), sugerindo uma revisão na classificação desta espécie, que hoje se baseia no aspecto da morfologia externa e distribuição geográfica.

Observou-se semelhança do veneno de *B. leucurus* com os perfis dos venenos de *B. cotiara* e *B. erythromelas*, que também apresentaram 4 bandas e diferenciou-se dos venenos de *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* (estas duas últimas espécies, pertencentes ao mesmo grupo taxonômico da *B. leucurus* – Grupo ATROX) que apresentaram de 7 a 11 bandas, em estudo referido por Moura-da-Silva (1992). Segundo Siles-Villaruel *et al.* (1973), a diferença no padrão eletroforético da peçonha de diferentes espécies de serpentes, pode ser consequência da tecnologia aplicada e também da origem dos venenos utilizados, principalmente geográfica.

Para de Roodt *et al.* (1997), o padrão eletroforético em acetato de celulose, por exemplo, permite a clara e rápida diferenciação do veneno das serpentes do gênero *Bothrops*. Por outro lado, o SDS-PAGE também permite uma diferenciação do veneno de espécies deste gênero. As pequenas diferenças que podem ser observadas são devidas a utilização do gradiente do gel, que permite a melhor visualização de bandas de menor peso molecular.

Segundo Dessauer & Fox (1956, 1958, *apud* Casais-e-Silva, 1995), o procedimento de eletroforese permite uma análise mais direta dos constituintes do veneno e tem sido usada como auxílio taxonômico na análise de proteínas do plasma de serpentes. Dessa forma, mesmo a constatação de diferenças intra e interespecíficas em venenos não impede sua utilização como parâmetro de análise para a diferenciação das espécies.

Os cromatogramas também demonstraram similaridade já que todos os venenos apresentarem 7 picos e os componentes que começarem a eluir em torno de 8 ml. Resultado similar foi obtido por Andrião-Escarso *et al.* (2000) demonstrando que o fracionamento do veneno de *Bothrops neuwiedi* procedentes de São Paulo, por cromatografia de troca iônica, produziu 7 picos. Já o veneno desta mesma espécie procedente de Minas Gerais, apresentou um número de frações menor (6).

O perfil da espécie por nós estudada, mostrou-se diferente do obtido por Zappellini (1991) para o veneno de *B. erythromelas*, cujo perfil cromatográfico caracterizou-se por 3 picos (utilizando Sephadex G-75) e 4 picos (utilizando Sephadex G-100).

7.2. TOXICIDADE:

A função venenosa das serpentes está dirigida fundamentalmente para a conservação da espécie, utilizando o veneno de suas glândulas, principalmente, para matar e digerir as presas preferenciais que constituem seu alimento, e em segundo lugar, como meio de defesa contra seus agressores (Haad, 1980/81).

De fato, os camundongos são mais sensíveis do que as aves ao veneno da *B. leucurus*, já que esta espécie apresenta os roedores como alimento preferencial durante a sua fase adulta (Lira-da-Silva *et al.*, 1996b; Prianti, 2000a). Estes dados diferem dos encontrados por Zamunér (1997) e Borja-Oliveira *et al.* (1998) para o veneno de *B. neuwiedi*, que se mostrou mais ativo em aves. Já os obtidos por Cogo *et al.* (1993) demonstraram uma atividade maior da peçonha de *B. insularis* também em aves, corroborando a relação veneno-tipo de alimento, considerando que esta espécie é arborícola e alimenta-se exclusivamente de pássaros.

A toxicidade do veneno de serpentes tem sido estudada extensivamente nas investigações desta variabilidade. A comparação tem sido dificultada pelos diferentes animais empregados (pombos, ratos, cobaias, grilos, lagartos, cães, coelhos, etc.), sendo que o modelo mais comum é o camundongo. A via de administração também varia (intra-peritoneal, intramuscular, subcutânea e intravenosa. Silles-Villaruel *et al.* (1978/79a) referem que os camundongos se prestam satisfatoriamente para a determinação da toxicidade dos venenos botrópicos, quando estes são inoculados por via intra-peritoneal, eliminando mortes imediatas devidas à atividade coagulante destas peçonhas.

A DL₅₀ obtida em cada uma das 4 amostras de veneno de *B. leucurus* (SB = 1,5; RMS = 2,5; machos = 1,3 e fêmeas = 1,7 mg/kg), utilizando-se o método de Weil (1953), via intravenosa, foram concordantes com o valor encontrado por Sanchez *et al.* (1992) (1,83 mg/kg) utilizando uma amostra de veneno procedente da Bahia. O veneno desta espécie apresentou toxicidade maior que o veneno referência nacional de *B. jararaca* (1,67 mg/kg) e que outros venenos botrópicos, tais como *B. alternatus* (Minas Gerais - 2,24 mg/kg e Argentina - 3,51 mg/kg), *B. atrox* (Pará - 2,24 mg/kg, Argentina - 3,51 mg/kg e Peru - 7,65 mg/kg), *B. castelnaudi* (Pará - 3,10 mg/kg) e *B. erythromelas*

(Bahia – 2,60 mg/kg). No entanto, a sua toxicidade foi menor quando comparada com o veneno de *B. alternatus* (Rio Grande do Sul – 1,50 mg/kg), *B. moojeni* (Minas Gerais – 0,78 mg/kg) e *B. neuwiedi urutu* (Minas Gerais – 1,21 mg/kg) (Sanchez *et al.*, 1992).

A DL₅₀ obtida em cada uma das 4 amostras de veneno de *B. leucurus* (SB = 5,0; RMS = 8,9; machos = 13,9 e fêmeas = 14,2 µg/g), segundo o método de Meier & Theakston (1986), via intraperitoneal, foram discordantes do valor encontrado por Sanchez *et al.* (1992) (4,28 µg/g) utilizando uma amostra de veneno procedente da Bahia, sem definir a localidade. O veneno desta espécie apresentou toxicidade menor que a do veneno referência nacional de *B. jararaca* (2,34 µg/g) e que todos os venenos botrópicos testados por Sanchez *et al.* (1992), inclusive que *B. moojeni* (Minas Gerais – 6,82 µg/g), *B. atrox* (Pará – 6,54 µg/g e Peru - 5,54 µg/g) e *B. neuwiedi urutu* (Minas Gerais – 2,89 µg/g), como referido anteriormente, espécies de mesmo grupo taxinômico.

Uma explicação para isto pode estar nos diferentes métodos utilizados por nós (Meier & Theakston, 1986, pela determinação aproximada da DL₅₀ usando 10 animais no experimento) e Sanchez *et al.* (1992), que utilizou o método clássico de Theakston & Reid (1983), com o uso de 12 animais por 5 grupos experimentais. Segundo Meier & Theakston (1986), alguns valores obtidos por seu método adaptado de Molinengo (1979, *apud* Meier & Theakston, 1986), diferem marcadamente dos obtidos pelo uso clássico de determinação da toxicidade em outros laboratórios. No entanto, um grande estudo organizado em 1977 pela Comissão da Comunidade Européia em 65 diferentes laboratórios que usaram o ensaio clássico para determinação de DL₅₀, também encontrou diferenças consideráveis nos valores obtidos. Portanto, o método utilizado neste trabalho é considerado vantajoso, científico, econômico e ético, pelo pequeno número de animais utilizados. Segundo Dias da Silva *et al.* (1989, *apud* Vasconcelos, 1996), a letalidade das peçonhas pode variar em diferentes espécies cerca de cinco vezes no valor da DL₅₀.

Utilizando-se os dois métodos, nossos dados demonstraram que o veneno de *B. leucurus* procedente da SB foi significativamente mais tóxico do que o procedente da RMS. Estes achados são contrários com os de Casais-e-Silva (1995) que estudou o veneno de *Micrurus lemniscatus* das mesmas regiões do estado da Bahia, por nós estudadas, concluindo que a amostra de veneno da RMS é três vezes mais tóxica que a da SB, confirmando as diferenças entre as duas populações.

Estudo clínico-epidemiológico realizado por Lira-da-Silva (1996) e Lira-da-Silva & Carvalho (1998, 1999), com 126 acidentes provocados pela *B. leucurus* na região metropolitana do Salvador, no período de 1982 a 1996, demonstrou a ausência de letalidade por esta espécie. Os autores sugerem que esta benignidade pode estar associada ao fato de que a maioria dos acidentes foram provocados por filhotes (73,4%) e machos (75,%), que provocaram os acidentes mais leves (64,1%), a precocidade no atendimento (menor que 3 horas em 73,9% dos casos) e a neutralização satisfatória do antiveneno botrópico utilizado. Neste estudo, podemos acrescentar a menor toxicidade do veneno de serpentes procedentes desta região (RMS), como mais um fator que pode ter contribuído para a ausência de óbitos nos acidentes.

Glenn & Straight (1978, 1985) e Glenn *et al.* (1983 *apud* Chippaux *et al.*, 1991) referem variação geográfica em veneno de serpentes elapídeas e do gênero *Crotalus* tendo como base a toxicidade. Jayanti & Veerabasappa Gowda (1988 *apud* Chippaux *et al.*, 1991), referem variação geográfica na composição e atividade letal do veneno de *Vipera russeli*, com alta atividade proteolítica e baixa letalidade nos espécimens das regiões norte e ocidental da Índia, contrariamente ao veneno dos espécimens do Sul. Estudos clínicos confirmaram a variação geográfica na composição da peçonha desta serpente com sintomatologia variando com a localidade (Warrel, 1985; Warrel *et al.*, 1989; Theakston *et al.*, 1989, *apud* Chippaux *et al.*, 1991).

López-Lozano *et al.* (1997a, 1997b) relataram variação intrasubespecífica, geográfica, ontogenética e da coloração do veneno de *C. d. ruruima*, coletadas em diferentes áreas do estado de Roraima. Estes autores demonstraram que exemplares adultos desta subespécie e com veneno branco, apresentaram toxicidade maior que filhotes e com veneno amarelo.

Sanchez *et al.* (1992) também encontraram variação geográfica na toxicidade dos venenos de *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. jararaca* e diferentes subespécies de *B. neuwiedi* de diferentes regiões do Brasil, Argentina, Bolívia e Peru. Bezerra (2000) refere que o veneno de exemplares de *B. erythromelas*, procedentes de Pernambuco, foi 2 mais tóxico, que a peçonha das procedentes da Bahia, em estudo realizado por Vasconcelos (1996).

Esta variabilidade geográfica do veneno pode ser explicada, em parte, pela variação geográfica da dieta, promovendo uma maior capacidade da peçonha para matar e digerir presas preferencias e mais disponíveis em cada região. O isolamento destas populações pode concorrer também para uma modificação e expressão de determinados genes. Para Christessen (1955, *apud* Willemse, 1978) a dieta se constitui em um dos fatores extrínsecos mais importantes na variação do veneno de serpentes.

Segundo Daltry *et al.* (1996b), a grande variação geográfica observada em serpentes adultas de *Calloselasma rhodostoma* de 36 localidades do sudeste da Ásia, pode ser explicada por 3 hipóteses: (1) a variação do veneno pode ser devida à distância geográfica; (2) pode resultar da relação filogenética entre as populações, ou (3) pode estar associada à variação da dieta entre as populações. Estes autores concluíram que a seleção natural foi a causa de diferentes populações de *C. rhodostoma* produzirem veneno apropriado para matar e digerir suas presas.

A relação entre veneno e dieta pode ser corroborada por diferenças observadas na taxa de susceptibilidade das toxinas dos venenos, como também nas mudanças ontogenéticas simultâneas na dieta e composição do veneno reportada para algumas espécies (Silva *et al.*, 1993 e Mackessy, 1988, *apud* Sasa, 1999). No entanto, alguns fatores incluindo seleção de microhabitat, seleção de presa e abundância sazonal da presa, podem ser confundidores na determinação das verdadeiras diferenças na dieta entre as populações de serpentes (Sasa, 1999).

Perrone *et al.* (1989) não encontraram diferenças significativas na toxicidade do veneno de *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, procedentes de São Paulo e do Paraná, mas encontraram diferenças bastante significativas quando compararam os venenos de *B. jararacussu* dessas mesmas regiões.

Segundo Sanchez *et al.* (1992) a variabilidade também pode estar relacionada com o fato de que a determinação das atividades biológicas *in vivo* são menos reprodutíveis que as *in vitro*, devido a maior susceptibilidade dos animais testados ao ambiente, além de que a sub-família Crotalinae é a que apresenta a composição mais complexa dentre os venenos de serpentes.

Os machos de *B. leucurus* apresentaram veneno com toxicidade similar ao das fêmeas, segundo o método de Meier & Theakston (1986) e veneno mais tóxico do que as fêmeas (mas esta diferença não foi estatisticamente significativa), segundo o método de Theakston & Reid (1983).

Esta pequena diferença, mesmo que não significativa, pode ser uma forma de compensar, com um veneno mais tóxico, uma produção média menor de veneno acumulado nas glândulas (machos = 63,4 mg e fêmeas = 106,7 mg) e injeção média menor durante um “ataque” à presa (machos = 47,4 mg e fêmeas = 87,5 mg), consequência de um tamanho médio também relativamente menor que o das fêmeas (machos = 90,7 cm e fêmeas = 120,4 cm) (Lira-da-Silva *et al.*, 1999). Apesar disso, estudo clínico-epidemiológico realizado por Lira-da-Silva (1996) e Lira-da-Silva & Carvalho (1999) demonstrou que as fêmeas é que provocam acidentes mais graves que os machos, não pela sua toxicidade, que é menor, mas pela possibilidade de injetar maior quantidade de veneno acumulado nas glândulas (machos = 9,6% e fêmeas = 17,7% de acidentes graves).

7.3. CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS:

A determinação das atividades biológicas sistêmicas *in vivo* é menos reproduzível que as atividades *in vitro* por causa da susceptibilidade dos animais-teste ao meio ambiente. Em venenos com uma composição muito complexa, como é o caso dos botrópicos, os efeitos ocorrem simultaneamente e o ensaio está mais susceptível às diversas variações (Sanchez *et al.*, 1992).

A maioria dos venenos da subfamília Crotalinae, especialmente o gênero *Bothrops*, a despeito da existência das variações intra e interespecíficas na composição e atividades farmacológicas dos seus venenos, induzem quadro fisiopatológico qualitativamente similar, decorrente de uma ação local (caracterizada por dor intensa e

dano tecidual local imediato e proeminente, isto é mionecrose, hemorragia e edema) e sistêmica (especialmente alterações cardiovasculares - hemorragia e choque hipovolêmico, distúrbios da coagulação - mais freqüentemente defibrinação - e alterações renais que podem chegar à insuficiência renal aguda (Amaral *et al.*, 1985; Gutiérrez & Lomonte, 1989; Sanchez *et al.*, 1992). Os efeitos sistêmicos incluem ainda vários tipos de sangramento distantes do local da picada, incluindo hemorragia gengival, púrpura, macrohematúria, epistaxis, sangramento uterino e hemoptise e isto ocorre porque os venenos são ricos em substâncias farmacologicamente ativas com atividades enzimática e não-enzimática (Kamiguti *et al.*, 1996).

O envenenamento humano por *Bothrops* freqüentemente causa coagulopatia severa associada com sangramento local ou sistêmico. O veneno destas serpentes contém frações denominadas hemorraginas que são responsáveis pela hemorragia local em animais. Estas frações, caracterizadas como metaloproteinases, causam ruptura do colágeno da membrana basal do endotélio vascular levando à liberação dos componentes do sangue. Algumas atividades proteolíticas têm sido atribuídas às hemorraginas como as atividades colagenolítica e fibrinogenolítica (Kamiguti *et al.*, 1991a, 1991b). A hemorragia sistêmica está associada a presença de ativadores da coagulação sangüínea e pode ser fatal, levando por exemplo à hemorragia intracranial. Existem dois mecanismos pelos quais os eritrócitos e outros componentes do sangue escapam pelos vasos: *per diapedesis*, através das junções entre as células endoteliais ou *per rhexis*, através dos espaços deixados pelas células endoteliais danificadas pelas toxinas hemorrágicas. De qualquer modo, este último é o que representa o efeito citotóxico das metaloproteinases sobre o endotélio vascular e parece ter o papel mais importante no desenvolvimento da hemorragia (Kamiguti *et al.*, 1996).

7.3.1. Atividade Proteolítica:

Como visto, a atividade proteolítica refere-se a um conjunto de frações do veneno, geralmente proteases de atividade inespecífica ou com especificidades diversas, e que são responsáveis pelos fenômenos locais (França & Fan, 1992). Estes efeitos locais decorrem de um efeito combinado destas proteases, fatores hemorrágicos e fosfolipases, presentes no veneno, bem como da liberação de compostos farmacologicamente ativos,

gerados por este mesmo veneno (Teixeira *et al.*, 1994). Neste caso, a atuação de enzimas proteolíticas do veneno sobre substratos diversos pode causar lesão tecidual (ação direta) e provocar a liberação de substâncias dos tecidos lesados que, sendo mediadores do processo inflamatório, ampliam estas mesmas lesões (ação indireta).

Observou-se baixa atividade proteolítica sobre caseína, da peçonha de *B. leucurus* (228,95 U/mg) em comparação com a dos venenos de *B. moojeni* (em média 113,0 U/mg), *B. erythromelas* (46,5 U/mg) e *B. jararaca* (43,2 U/mg) (Furtado *et al.*, 1991; Vasconcelos *et al.*, 1996). Deve-se ser ressaltada a semelhança maior da atividade caseinolítica do veneno em estudo com a da peçonha de *B. moojeni* (espécie pertencente ao mesmo grupo taxinômico – Grupo ATROX), devendo-se nesta espécie a presença de metaloproteínases que desempenham importante papel na função biológica do seu veneno, de acordo com dados obtidos por Assakura *et al.* (1985). As diferenças interespecíficas quanto a esta atividade pode ser explicada pelo pH do meio de digestão (Delpierre, 1968, *apud* Furtado, 1987).

Os efeitos locais característicos do envenenamento por *B. leucurus* referem-se ao edema (80,9%), dor (79,8%), calor (26,3%), dormência (20,3%), eritema (16,7%), equimose (13,2%) e flictena (10,5%). Necrose, abscesso e queimor são menos frequentes (4,4%, 4,4,% e 0,9%, respectivamente) (Lira-da-Silva, 1996; Lira-da-Silva & Carvalho, 1998, 1999). Os acidentes por *B. moojeni* tem ação local mais severa, já que todos os acidentes (100%) estudados na região de São José do Rio Preto (SP) apresentaram dor, edema, eritema e calor (Kouyoumdjian *et al.*, 1990) e isto foi corroborado pelo estudo dos venenos de ambas as espécies, considerando que *B. moojeni* tem veneno com ação proteolítica maior que o da *B. leucurus*.

7.3.2. Atividade Edematogênica:

O veneno com atividade edematogênica contém ou são capazes de liberar mediadores vasoativos (histamina, serotonina, bradicininas, anafilatoxinas, leucotrienos, prostaglandinas e PAF - fator ativador de plaqueta) que atuam diretamente sobre a circulação para aumentar a permeabilidade vascular e produzir o edema (Vargafit *et al.*, 1974). Trebien & Calixto (1989, *apud* Teixeira *et al.*, 1994) também mostraram que

eicosanóides e PAF contribuem para o edema induzido pela injeção do veneno de *B. jararaca* na pata de ratos.

A peçonha de *B. leucurus* apresentou DME igual a 0,50 µg/camundongo, concordando com os dados obtidos por Sanchez *et al.* (1992), que obtiveram 0,59 µg/camundongo para a mesma espécie. Esta atividade foi cerca de três vezes maior do que a observada para *B. jararaca* por Vasconcelos *et al.* (1996) e quase seis vezes maior que a obtida para *B. erythromelas* (2,6 µg/camundongo) por Vasconcelos (1996). No entanto, esta atividade foi menor que a observada por Sanchez *et al.* (1992) para o veneno de *B. moojeni* (0,41 µg/camundongo), o mais ativo do referido trabalho, enquanto que a peçonha de *B. leucurus* foi a segunda mais edematogênica das espécies por eles estudadas. Isto concorda com dados de envenenamento humano, onde 100% dos pacientes picados por *B. moojeni* apresentaram edema, frequência maior quando comparada com a dos acidentes por *B. leucurus* (80,9%) (Kouyoumdjian *et al.*, 1990; Lira-da-Silva, 1996; Lira-da-Silva & Carvalho, 1998, 1999). Contrariamente, Lira-da-Silva (1996) refere que o edema de intensidade 3 (moderado ou regional) esteve presente em 32,8% dos acidentes por *B. leucurus*, contra os 13,4% em *B. moojeni*. Isto pode ser devido ao fato de que a espécie *B. leucurus* pode ter veneno com menor capacidade de produzir edema nas primeiras horas, porém maior capacidade na duração desta ação edematogênica nas horas subsequentes.

Teng & Wiang (*apud* França & Fan, 1990), demonstraram que na patogênese do edema causado por serpente com veneno cuja atividade é proteolítica, há participação de mastócitos, neutrófilos e cininas plasmáticas. Cury *et al.* (*apud* França & Fan, 1990), detectaram a participação do PAF e dos metabólitos do ácido araquidônico no edema induzido pelo veneno de *Bothrops* adulta.

Gutiérrez & Lomonte (1989) referem que o edema induzido pelo veneno das serpentes do gênero *Bothrops* pode ser devido a ação de várias substâncias: a) toxinas hemorrágicas que lesam o endotélio vascular induzindo extravasamento; b) toxinas que agem diretamente sobre as células endoteliais dos capilares e vênulas, aumentando suas permeabilidades; c) componentes do veneno (fosfolipases ou citotoxinas) que induzem o aumento na liberação de histamina; d) fosfolipase A₂ que libera ácido araquidônico de fosfolípídeos das membranas celulares, iniciando a via de síntese de prostaglandinas; e)

proteases que agem sobre o cininogênio (como a bradicinina, por exemplo); f) componentes do sistema complemento, particularmente C_{3a} e C_{5a}, que participam da resposta inflamatória.

7.3.3. Atividade Hemorrágica:

Sanchez *et al.* (1992) determinaram a dose mínima hemorrágica induzida pelo veneno de *B. leucurus* como 33,6 µg/rato, semelhante a determinada por nós para o veneno das serpentes procedentes do Sul/Sudeste baiano – SB (39,8 µg/rato) e menor que a determinada para o veneno das serpentes da Região Metropolitana do Salvador - RMS (79,0 µg/rato). De qualquer modo, o veneno procedente da primeira região foi mais potente em provocar hemorragia do que o das espécies *B. alternatus* e *B. neuwiedi diporus* procedentes da Argentina e *B. neuwiedi mato-grosensis* procedente da Bolívia, (44,2, 50,3 e 46,3 µg/rato, respectivamente) e menos potente que todos os outros venenos botrópicos (*B. castelnaudi* – 7,5 µg/rato, *B. neuwiedi urutu* – 10,7 µg/rato, *B. moojeni* – 13,4 µg/rato, *B. jararaca* - 16,1 µg/rato, *B. atrox* – 16,9 µg/rato, *B. alternatus* – 26,4 µg/rato e *B. erythromelas* – 29,3 µg/rato), testados por Sanchez *et al.* (1992).

Uma menor ação hemorrágica no veneno de *B. leucurus* procedentes da RMS, pode explicar a pequena percentagem de distúrbios hemorrágicos observados nos envenenamentos por esta espécie, nesta região (tais como hemorragia, hematêmese, hemoptise e epistaxis, presentes em 3,5%, 1,8%, 1,8% e 0,9% dos acidentes, respectivamente, e sangramento local observado em 7,9% dos casos) (Lira-da-Silva, 1996). Os estudos realizados com a peçonha desta espécie e com a de *B. moojeni*, novamente enfatizam dados obtidos no envenenamento destas espécies, onde um tipo de hemorragia sistêmica, como a hematúria, foi mais freqüente no acidente por *B. moojeni* (5,8%) do que por *B. leucurus* (2,6%), que apresentou DMH menor.

Além de uma ação mais hemorrágica do veneno, outros fatores podem contribuir para uma síndrome hemorrágica mais acentuada, como a quantidade de veneno inoculada, via de inoculação, uso do garrote e tempo decorrido até o atendimento médico, já que Rodrigues *et al.* (1988) referem um quadro de grande magnitude para acidentes

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

botrópicos na Bahia, com 15,7% de hemorragia local, 12,2% de gengivorragia, 1,6% de epistaxis e 1,26% de hematêmese, que pode ter refletido a “crise nacional do soro anti-ofídico”, de 1985 a 1987, que levou a Bahia a apresentar a maior incidência de óbitos, caracterizada pela escassez de antiveneno, obrigando os pacientes a passar por diversos serviços de saúde, aumentando o tempo até o atendimento clínico.

A atividade hemorrágica específica do veneno desta espécie ($11,02 \pm 4,87$ U/mg) mostrou-se semelhante a do veneno de *B. erythromelas* ($14,72 \pm 4,5$ U/mg) e 2,9 vezes maior que a da peçonha de *B. jararaca* ($31,60 \pm 3,2$ U/mg), referidas por Vasconcelos (1996).

A atividade hemorrágica refere-se à fração do veneno que causa sangramento (extravasamento de plasma e células para o espaço extracelular) pela ação direta sobre o endotélio do vaso sangüíneo (Oshaka, 1979; Bjarnason & Fox, 1989). Estas frações são completamente diferentes das que afetam a coagulação sangüínea e são denominadas *hemorraginas, fatores ou princípios hemorrágicos*.

Já está extensivamente demonstrado que estas hemorraginas são enzimas proteolíticas (Oshaka, 1979; Kamiguti & Cardoso, 1989), metaloproteinases e representam cerca de 1% do veneno total (França & Fan, 1992). Elas são enzimas proteolíticas de alta especificidade pelo substrato, que induzem à hemorragia quando injetadas.

O mecanismo de ação destes princípios hemorrágicos foi bem estudado por Oshaka em 1979, que considerou que as hemorraginas atuam sobre a permeabilidade vascular, o endotélio vascular, a membrana basal e alteram o mecanismo hemostático.

Para que a hemorragia ocorra, os eritrócitos devem passar por duas barreiras que formam a parede dos vasos: as células endoteliais e a membrana basal. Existem informações divergentes quanto ao mecanismo pelo qual os eritrócitos passam pela primeira barreira (células endoteliais). Vários pesquisadores analisaram a patogênese induzida por toxinas hemorrágicas isoladas de *Bothrops jararaca* e concluíram que a hemorragia, ocorre “per diapedesis”, sucedendo a abertura das junções das células endoteliais dos capilares através do qual as hemácias escapam (Oshaka, 1979). O mecanismo pelo qual essas junções se abrem não foi determinado, talvez a abertura seja mediada pela liberação de histamina, serotonina e outras substâncias.

Por outro lado, Grotto *et al.* (1967 *apud* Ohsaka, 1979) e Mackay *et al.* (1970 *apud* Ohsaka, 1979), estudando as hemorraginas do veneno de *Vipera palestinae* e Ownby *et al.* (1978), Ownby *et al.* (1988 *apud* Ownby, 1990) as de *Crotalus horridus horridus* e *Agkistrodon b. bilineatus*, mostraram evidências que estas induzem a hemorragia “per rhexis”, onde ocorre o rompimento da integridade das células endoteliais, levando a grandes aberturas intracelulares por onde ocorre o extravasamento sangüíneo.

7.3.4. Atividade Necrosante:

Com relação à atividade necrosante específica, a apresentada por *B. leucurus* foi $3,02 \pm 0,65$ U/mg de veneno. Sanchez *et al.* (1992) determinaram a dose mínima necrosante (DMN) como 73,2 µg/rato, com ação superior à encontrada em nosso trabalho para as regiões SB e RMS (242 e 300 µg/rato, respectivamente), demonstrando baixa atividade necrótica desta espécie, mesmo quando comparada com as outras espécies de *Bothrops* estudadas por estes autores e com a *B. erythromelas* (144,5 µg/animal), obtida por Vasconcelos (1996).

Isto explica a pequena frequência de necrose (4,4%) registrada nos acidentes por *B. leucurus* da RMS (DMN = 300 µg/rato) (Lira-da-Silva, 1996), quando comparado com os acidentes provocados por *B. moojeni* (cuja DMN é igual 43,3 µg/rato, referida por Sanchez *et al.*, 1992), na região de São José do Rio Preto (SP), onde a percentagem de necrose observada nos pacientes foi quase 2 vezes maior (11,7%) (Kouyoumdjian & Polizelli, 1988).

Experimentos realizados por Silles-Villarreal *et al.* (1978/79b) em cobaias, demonstrou que o veneno com maior atividade necrosante foi a *B. moojeni* (DMN = 80-160 µg), seguida de *B. jararaca*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* (DMN ao redor de 160 µg) e *B. alternatus* e *B. jararacussu* (DMN = 320 µg). Estas últimas espécies apresentaram atividade semelhante ao nosso veneno. Independente disso, o efeito local de cada dessas peçonhas foi proporcional à dose inoculada intradermicamente.

Esta atividade do veneno causa lesão tecidual, que pode não estar limitada ao local da picada, podendo criar danos teciduais em diferentes órgãos em casos mais graves.

Nestes casos, as necroses podem provocar danos permanentes e em acidentes leves o músculo pode se regenerar (Tu, 1991). Segundo Mebs & Ownby (1990), o termo necrose local tem sido utilizado tanto para os efeitos do veneno na pele quanto no músculo. Na pele, esta que trata a DMN obtida neste trabalho, é decorrente da ação das hemorraginas que causam, indiretamente, uma condição isquêmica, onde se desenvolve secundariamente uma ação disruptiva dos venenos sobre a vasculatura, promovendo a morte celular (necrose).

A atividade necrosante é bem conhecida no veneno das serpentes da subfamília Crotalinae, sendo devida em parte, a ação de enzimas proteolíticas (proteases e fosfatases), que estão estritamente relacionadas às atividades hemorrágica e miotóxica (Ohsaka, 1979). A atuação destas enzimas sobre substratos diversos pode ocorrer de duas formas: a) pela ação direta do veneno causando lesão tecidual e b) pela ação indireta devido a liberação de substâncias dos tecidos lesados que, sendo mediadores do processo inflamatório, ampliam estas mesmas lesões.

7.3.5. Atividade Coagulante:

A atividade coagulante sobre o plasma humano citratado foi discordante da relatada por Sanchez *et al.* (1992), que referem DMC-p igual a 1,4 mg/l, enquanto que a obtida por nós foi 85,98 mg/l (para o veneno total), cerca de 60 vezes menor. A DMC-p encontrada neste trabalho, no entanto, foi maior do que a obtida por Bezerra (2000), que foi igual a 21,37µg/ml. Esta atividade é a que se relaciona com determinadas toxinas capazes de ativar a cascata da coagulação ao nível dos fatores I (fibrinogênio), fator X ou protrombina, causando a coagulação do sangue (Nahas *et al.*, 1979; Kamiguti *et al.*, 1985, 1988; Kamiguti & Cardoso, 1989; França & Fan, 1992, Markland, 1998), na presença de fosfolípideo e cálcio.

Para Bezerra (2000), a atividade que mais apresentou variação no seu trabalho, realizado com a peçonha de *B. erythromelas*, foi a coagulante, talvez pela presença de filhotes em alguns “pools”, que, segundo Furtado *et al.* (1991), tem reconhecidamente atividade coagulante mais intensa que os adultos. Isto pode explicar a grande diferença encontrada nosso trabalho em relação ao de Sanchez *et al.* (1992), considerando que na

nossa amostra só estavam presentes venenos de cobras adultas. O mesmo foi observado por Bezerra (2000), que encontrou atividade coagulante, aproximadamente, 14 vezes menor que a encontrada por Zapellini (1991) e 1,9 vezes menor do que a obtida por Vasconcelos (1996).

Apesar das diferenças encontradas, por diferentes autores, em cada um dos venenos estudados, a coagulopatia observada nos acidentes provocados por *B. leucurus* é semelhante a encontrada para outras espécies de *Bothrops*, que está geralmente em torno de 50% (levando-se obviamente em consideração a diferença ontogenética, já mencionada, para esta atividade). Lira-da-Silva & Nunes (1993) e Lira-da-Silva (1996), referiram uma percentagem de 40,6% e 58,2% de alterações na coagulação, respectivamente. Estudos realizados por Maryuama *et al.* (1990) e Kamiguti *et al.* (1991a), no estado de São Paulo, demonstraram que cerca de 56% dos pacientes picados por *B. jararaca* apresentavam distúrbios na coagulação, enquanto que Ribeiro & Jorge (1990), referem que 44,3% dos pacientes, picados por esta mesma serpente, na mesma região, apresentou TC incoagulável e 9,9% TC prolongado. Nishioka & Silveira (1992) referem uma percentagem de 54% de alteração para *B. moojeni* e *B. neuwiedi* no Triângulo mineiro (MG) e Queiroz & Moritz (1989) afirmaram que 45,1% dos pacientes picados por *B. jararaca* e *B. jaracussu*, na região de Florianópolis (PR), apresentavam TC alterado. Estes índices foram bem maiores quando o acidente envolveu a espécie *B. moojeni*, na região de São José do Rio Preto (SP), com 73% de alteração do TC, no trabalho publicado por Kouyoumdjian & Polizelli (1988) e 75% no publicado por Kouyoumdjian *et al.* (1990) e *B. atrox* no Amazonas (Leticia), com 70% de alteração do TC, segundo Haad (1980/81).

Estes achados clínicos corroboram, na maior parte da vezes, os achados experimentais onde a serpente que apresentou a menor DMC-p foi a *B. leucurus* (1,4 mg/l), seguida de *B. moojeni* (3,4mg/l), *B. atrox* (6 a 8 mg/l), *B. neuwiedi* (4,5 a 6 mg/l), *B. jararaca* (5 a 15 mg/l) e *B. jararacussu* (27,5 mg/l).

A atividade coagulante sobre fibrinogênio, também mostrou-se claramente discordante da relatada por Sanchez *et al.* (1992) que referem DMC-f igual a 2,8 mg/l, enquanto que a obtida por nós foi 41,0, 53,1, 54,3 e 48,7 mg/l, respectivamente para os venenos de serpentes procedentes da SB, RMS de machos e fêmeas, indicando que foi em

média 18 vezes menor, apesar da variação geográfica e sexual observada. Vasconcelos (1996) também observou uma variação regional do veneno da serpente *B. erythromelas* procedentes da área de abrangência da Usina Hidroelétrica de Itaparica, que apresentou atividade trombina-símile e da Usina Hidroelétrica de Xingó, cuja atividade estava ausente neste veneno. Isto aponta para uma variação intraespecífica desta peçonha no que diz respeito à variação geográfica.

Esta atividade é a que se relaciona com determinadas toxinas (enzimas serinoproteinases do tipo *thrombin-like*), capazes de ativar a cascata da coagulação ao nível do fator I (fibrinogênio), induzindo sua coagulação e causando inicialmente a coagulação do sangue, formando microcoágulos, e posterior incoagulabilidade (Nahas *et al.*, 1979; Kamiguti *et al.*, 1985, 1988; Kamiguti & Cardoso, 1989; Pirkle & Theodor, 1991, Markland, 1998).

A ação direta sobre o fibrinogênio é conhecida como “tipo trombina” e foi pela primeira vez demonstrada no veneno botrópico, por Eagle, tendo sido isolada e semipurificada por Klobüsitzy & König. Diferente da trombina que hidrolisa cadeias α e β do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeos A e B, a fração “trombin-like” libera apenas fibrinopeptídeo A da cadeia α . Nestas condições, não ocorre a formação dos dímeros de fibrina, etapa inicial da produção de fibrina fisiológica. A estabilização dos polímeros de fibrina é também prejudicada pois não ocorre ativação do fator XIII. Conseqüentemente, a fibrina formada pela ação destas frações é bastante instável, sendo rapidamente degradada através da ativação secundária do sistema fibrinolítico. Deste modo, pacientes picados por serpente com veneno que contém atividade “trombin-like” tendem a apresentar trombos intravasculares que são degradados rapidamente (França & Fan, 1992).

7.3.6. Atividade Anticoagulante ou Fibrinolítica:

O veneno botrópico é bem conhecido pela sua atividade pró-coagulante, no entanto são escassos os estudos referentes à sua propriedade anti-coagulante (Komalik, 1966 *apud* Kamiguti *et al.*, 1985). Sanchez *et al.* (1992) demonstraram que a *B. leucurus* possui veneno com a maior atividade defibrinante (DMD = 3,4 mg/camundongo) dentre as 8 espécies de *Bothrops* estudadas, sendo concordante com os dados obtidos no nosso trabalho (4,25 mg/camundongo), apesar de um pouco maior.

Este tipo de atividade é responsável por agir indiretamente ativando o sistema fibrinolítico, estimulando a liberação de ativadores de plasminogênio das células endoteliais, capazes de transformar plasminogênio em plasmina, que exerce ação proteolítica sobre a fibrina, desestabilizando-a (Markland, 1998). Diretamente pode agir pela ação de proteinases ácidas ou básicas que tanto catalizam a fibrina como também o fibrinogênio (Stocker, 1990).

Markland (1998) afirma que a atividade anticoagulante tem sido reportada no veneno de diferentes serpentes e também é atribuída à ação de proteínas para: a) a ativação de proteína C, b) a inibição de fatores da coagulação IX e X pela proteína do veneno que se liga em ambas as proteínas coagulantes, c) a um inibidor de trombina e d) fosfolipases que degradam fosfolípidos envolvidos na formação de complexos críticos para a ativação da cascata da coagulação.

Estes dados experimentais podem ajudar a explicar porque 12 horas após o acidente, inclusive após a soroterapia, dos 75 pacientes acompanhados, 65,3% apresentava TC normal, 22,7% alterado e 12,0% incoagulável e 18 horas após, para 29 pacientes, observou-se que: 75,9% tinha TC normal, 20,7% alterado e 3,4% incoagulável. Embora tenha havido uma restauração importante com o tratamento específico (soro anti-veneno), o tempo para normalização do TC nos pacientes picados por *B. leucurus* foi maior que 24 horas, diferente do observado para *B. moojeni* (17 horas) e *B. jararaca* (12 horas), talvez devido a sua potente atividade anticoagulante (Lira-da-Silva, 1996).

7.3.7. Atividade Miotóxica:

O veneno de *B. leucurus* apresentou atividade miotóxica equivalente às peçonhas de *B. moojeni* e *B. asper* e menor que a atividade demonstrada pela *B. neuwiedi*, todas de mesmo grupo taxinômico (grupo ATROX), quanto à liberação de Creatinoquinase (CK). Segundo Andrião-Escarso *et al.* (2000), todos os venenos testados (*B. alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pirajai*) induziram liberação de CK, 3 horas após a injeção, devido a ação direta sobre o músculo pelas suas miotoxinas; e em alguns casos, pela ação indireta (6 horas após), devido ao efeito de proteases sobre os vasos sanguíneos.

A injeção do veneno de *B. jararacussu*, segundo Thattasserry *et al.* (2000), aumentou o CK no plasma do nível basal a até 8 vezes, quando injetou-se doses de 12,5 a 100 µl de 0,5 mg/Kg da peçonha, demonstrando a importância da dose e do volume de uma injeção intramuscular na atividade miotóxica do veneno desta espécie.

Não só o veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, mas também do gênero *Lachesis*, apresenta importante atividade miotóxica, como demonstrado por Fuly *et al.* (2000). Estes autores mostraram um aumento da CK plasmática a partir de injeções intramusculares do veneno de *Lachesis muta*, de maneira dose-dependente, corroborando os resultados acima descritos para *B. jararacussu*.

O estudo histopatológico demonstrou que as 4 amostras do veneno de *B. leucurus* (procedentes da RMS e SB, □ e □) produziram um efeito mionecrótico evidente sobre as fibras musculares do diafragma de camundongos das preparações nervo frênico diafragma (NFD) e diafragma cronicamente desnervado (CDC). Estes dados concordam com os dados da bibliografia relativa, onde estudos experimentais puderam demonstrar esta atividade tanto nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. asper*, *B. godmani*, *B. lateralis*, *B. nasuta*, *B. nummifer*, *B. ophiomegas*, *B. picadoi* e *B. schlegelii* da Costa Rica e de *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. pirajai* e *B. pradoi* do Brasil) (Gutiérrez *et al.* 1989; Gutiérrez & Lomonte, 1989, 1995, 1997; Costa *et al.*, 1999; Andrião-Escarso *et al.*, 2000), *Lachesis*, *Crotalus* e *Micrurus* (Gutiérrez *et al.*, 1980; Casais-e-Silva, 1995; Fuly *et al.*, 2000), quanto na peçonha de outras espécies viperídeas e elapídeas.

Segundo Gutiérrez & Lomonte (1989), a mionecrose é uma consequência do envenenamento por espécies do gênero *Bothrops*, responsável pelo aparecimento de danos teciduais locais (León *et al.*, 1998). Este efeito é decorrente da miotoxicidade do veneno que possui toxinas com habilidade para induzir necrose de músculo esquelético (mionecrose) e vem sendo estudada *in vivo*, a partir de injeções intramusculares, ou *in vitro*, a partir da incubação de diversos músculos dissecados de diferentes animais (Gutiérrez & Lomonte, 1997).

Existem dois caminhos pelos quais o veneno de *Bothrops* afetam as células musculares: (a) diretamente, pela ação das miotoxinas que provavelmente comprometem a integridade da membrana plasmática do músculo esquelético e (b) indiretamente, por uma condição isquêmica que se desenvolve secundariamente à ação disruptiva dos venenos sobre a vasculatura. Nesse sentido, a miotoxicidade pode resultar de uma ação direta de miotoxinas sobre a membrana plasmática das células musculares ou pode ser devido a uma degeneração vascular indireta e isquemia causada por metaloproteinases do veneno (Rodrigues *et al.*, 1998; Andrião-Escarso *et al.*, 2000).

Hoje existem algumas técnicas que quantificam a mionecrose induzida, tais como: (a) quantificação dos níveis séricos da enzima creatinoquinase, mais especificamente a isoenzima CK-MM; (b) quantificação da liberação de CK *in vitro* de preparações de músculo esquelético incubado com veneno; (c) quantificação do conteúdo residual de CK no músculo injetado com o veneno ou a toxina isolada (técnica utilizada neste trabalho); e (d) pela estimativa quantitativa histológica do dano muscular, pelo número de células necróticas e sadias (Gutiérrez & Lomonte, 1989, 1995).

As lesões mionecróticas, promovidas pelo veneno de *B. leucurus*, foram dose-dependente e caracterizaram-se pelas seguintes alterações: célula muscular edemaciada e com perfil arredondado (“balonização”), lesões “delta” sobre a membrana celular, vacuolização, regiões de hipercontração e condensação das miofibrilas, alternado-se com espaços vazios no sarcoplasma, de focais até extensas áreas de degeneração das fibras musculares e grandes áreas de degeneração de aspecto rendilhado.

O que chamamos de “balonização” refere-se à célula muscular arredondada, bastante edemaciada e que caracteriza o início da necrose muscular. Esteve presente na

patogênese da mionecrose induzida pela peçonha de *B. leucurus* e também de *B. erythromelas* (Zamunér, 1997) e *Crotalus durissus terrificus* (Franco, 1997). Esta lesão caracteriza-se mais freqüentemente pela primeira alteração celular observada em preparações, ou seja, *in vitro*, e segue-se à vacuolização e posterior aparecimento de lesões do tipo “delta”. Neste caso, compreende o processo onde a regeneração muscular é possível.

As lesões “delta” são típicas de doenças como a distrofia muscular Duchenne e são descritas como espaços triangulares claros no citoplasma com a base voltada para a membrana e ápice para o centro. Gutiérrez *et al.* (1989) e Fletcher *et al.* (1997) as consideram-na mais como a primeira alteração morfológica para estudos *in vivo*, aparecendo na primeira hora após o contato com o veneno e representando o estágio inicial da degeneração celular, devido às discretas lesões na periferia destas células.

Em experimentos realizados por Gutiérrez *et al.* (1989) sobre a miotoxicidade do veneno de *B. nummifer*, estes autores sugeriram que a membrana plasmática da célula muscular seja o sítio primário de ação da miotoxina. Segundo Gutiérrez (2000), as PLA₂s miotóxicas agem inicialmente na membrana celular se ligando a alvos moleculares ainda não identificados; esta então começa a ser afetada e cedo lesões “delta” aparecem na periferia da célula muscular, formando áreas subjacentes onde a membrana é destruída.

Outra evidência da lesão precoce da membrana celular é a liberação das enzimas creatinina e creatinaquinase, concomitante com um aumento proeminente de cálcio no músculo e dehidrogenase láctica. A miotoxina afeta a integridade da bicamada fosfolipídica, liberando peroxidase e pode se ligar e penetrar no músculo esquelético por meio de interações hidrofóbicas, através das proteínas de membrana. Esta penetração pode levar à desorganização e disrupção da organização supramolecular da membrana. Da ação da miotoxina resulta a liberação de marcadores intracelulares que movimentam o cálcio para dentro da célula. O acúmulo desta substância tem múltiplos efeitos deletérios tais como a hipercontração dos filamentos, morte da mitocôndria e ativação de proteases e fosfolipases cálcio-dependentes. Este dano muscular é irreversível e provavelmente ocorre depois que a membrana celular é afetada pela toxina.

Assim, para Gutiérrez (2000), uma seqüência estereotipada de eventos degenerativos se seguem, caracterizada por hipercontração dos miofilamentos, aumento mitocondrial associado com a formação de flocos densos, ruptura do retículo sarcoplasmático e túbulos T e picnose nuclear. Estes eventos estão provavelmente associados com o proeminente influxo de cálcio e com a ativação de PLA₂s citosólicas cálcio-dependentes e proteinases. Por último, algumas proteínas citoesqueléticas começam a se degradar e, como conseqüência, miofilamentos se distribuem mais uniformemente no espaço celular. Um processo inflamatório se inicia, onde neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos predominam e removem o material necrótico, dando início à regeneração muscular.

A vacuolização é indicativo de necrose inicial, como conseqüência do edema da célula muscular. Foi observada em praticamente todos os processos de lesões musculares até agora estudados pelos venenos de serpentes. Cogo *et al.* (1993), observaram vacuolização das fibras musculares, após incubação de 80 µg do veneno de *B. insularis* com o músculo *biventer cervicis* de pintainho, induzindo a uma perda completa das miofibrilas.

O estudo morfológico das alterações induzidas pela peçonha de *B. insularis* injetada no músculo peitoral esquerdo de pintainho realizado por Cogo (1991), demonstrou necrose muscular localizada em alguns pontos do músculo, além de aspecto amorfo e desorganizado e vesiculação das fibras musculares. O veneno de *B. jararaca*, na mesma preparação, induziu hipercontração de fibras musculares e regiões do músculo com área de lise evidente no citoplasma da célula muscular com interrupção das miofibrilas.

Estudo realizado por Zamunér (1997), demonstrou *in vitro*, a ação de diferentes venenos botrópicos e de *C. d. terrificus*, sobre a estrutura histológica do músculo *biventer cervicis* de pintainho, com diferentes tipos de alterações nas fibras musculares, na dose de 200 µg/ml, a maioria concordante com as obtidas por nós para o veneno de *B. leucurus*. Os venenos de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. jararacussu*, mostraram atividade miotóxica importante que se expressou pela destruição abrupta parecendo “quebrada”, lise de feixes, hipercontração e desestruturação das miofibrilas. Segundo este autor, a peçonha de *B. neuwiedi* foi a que produziu as alterações mais severas nas fibras, dentre os venenos

botrópicos, com destruição maciça na porção central do músculo, revelada pela ampla região vazia, inclusive com a presença de miofibrilas esgarçadas com aspecto de rede frouxa. O veneno que apresentou a maior atividade miotóxica foi o veneno de *C. d. terrificus* revelado pelas importantes alterações morfológicas observadas preponderantemente nas fibras musculares centrais do músculo, destruindo total ou parcialmente muitas delas.

Franco (1997) refere lesões características de mionecrose, semelhantes a encontrada por nós, na crotoxina isolada e no veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, tais como células com perfil arredondado (balonização), lesões “delta”, hipercontração, fragmentação e condensação de miofibrilas, lise com desorganização do material intracelular, deformação na disposição das fibras e aspecto mionecrótico das fibras com padrão em mosaico “rendilhado”, na dose de 10 µg/ml na preparação *extensor digitorum longus* de camundongos. A dose de 50 µg/ml da peçonha de *B. jararacussu*, nesta mesma preparação, produziu intensa mionecrose, com fibras musculares fragmentadas, miofibrilas condensadas e núcleos picnóticos, enquanto que a concentração de 20 µg/ml de botropstoxina induziu mionecrose (da condensação das miofibrilas até o desaparecimento de fibras), só que o grau de lesão foi inferior ao exibido pelo veneno total.

Costa *et al.* (1999) também referem que o veneno de *B. pirajai* causa extensa mionecrose em preparação de músculo *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongos e liberação de CK, atribuída a componentes proteolíticos e miotóxicos do veneno que podem estar associados com atividade fosfolipásica. Um de seus componentes, a piratoxina I, uma miotoxina sem atividade PLA₂ provocou igualmente necrose muscular, pela ação direta sobre a integridade do sarcolema ao longo das interações hidrofóbicas com a bicamada fosfolipídica. Tais lesões foram caracterizadas por balonização, vacuolização, hipercontração e agregamento das miofibrilas.

Segundo Fletcher *et al.* (1997), três diferentes tipos de mudanças patológicas podem afetar uma mesma célula muscular: (1) presença de vacúolos, (2) desorganização das miofibrilas com aparência “manchada” e (3) região central da célula contendo densas contrações (hipercontratibilidade) e agrupamentos de miofibrilas intercalados com áreas claras as quais aparecem destituídas de algumas organelas. Para Gutiérrez & Lomonte

(1997), as contrações musculares podem ser observadas dentro de segundos após a aplicação da miotoxina, causando evidentes distorções nos vasos sanguíneos e células musculares. Tais contrações cessam depois de poucos minutos e são devidas, provavelmente, ao influxo precoce de Ca^{2+} para dentro da célula após o dano da membrana plasmática. Este fenômeno é seguido da retração das miofibrilas até a completa ruptura transversal da fibra muscular. Estas observações também foram feitas para a atividade fosfolipásica da notexina e seu papel no dano muscular, devido a sua capacidade de hidrolisar ou solubilizar fosfolipídeos das membranas e aumentar a permeabilidade da membrana, promovendo o influxo de cálcio e conseqüente hipercontração (Harris & MacDonell, 1981).

O fato do edema intersticial, estar presente em todas as doses testadas, indica que não houve preservação das propriedades das membranas das fibras celulares e está de acordo com os dados de Fletcher *et al.* (1997) que referem o aparecimento de um intenso edema intersticial, assim como substancial infiltração por leucócitos polimorfonucleares, de 1–3 horas após a injeção de miotoxina do tipo PLA_2 , sendo este mais um indício de que as miotoxinas da peçonha de *B. leucurus* podem ser deste grupo.

Exame histopatológico realizado por Andrião-Escarso *et al.* (2000), mostrou severa mionecrose após inoculação intramuscular da miotoxina de *B. jararacussu*, caracterizada por um edema intenso e perda da estrutura da célula muscular, que foi acompanhada por infiltração de leucócitos e nenhuma lesão foi observada nos vasos (veias ou artérias).

Gutiérrez & Lomonte (1997) referem que as miotoxinas do veneno de *Bothrops* (miotoxinas I, II e III de *B. asper* e miotoxina de *B. nummifer*) induzem edema rapidamente; este efeito atinge seu pico em uma hora após a injeção do veneno e permanece alto por algumas horas. A inibição do edema precoce (30 minutos) induzido pela miotoxina I de *B. asper*, com o pré-tratamento com antagonistas de histamina e serotonina, e do edema tardio (5 horas) com a aspirina, indica o envolvimento de aminas biogênicas na primeira fase e das prostaglandinas na fase tardia deste fenômeno. Finalmente, o edema pode ser causado primariamente pela degranulação direta de

mastócitos expostos às miotoxinas, secundariamente pelas reações promovidas pelo dano celular ou por um efeito direto da miotoxina sobre as células endoteliais.

Nenhuma anormalidade foi observada nos nervos ou parte de vasos sanguíneos, mesmo nas doses mais altas, o que caracteriza a miotoxicidade do veneno de *B. leucurus*, considerando que o termo miotoxina implica em uma ação direta e específica da toxina sobre o músculo esquelético. Para Fletcher *et al.* (1997), a “verdadeira” miotoxina não destrói nervos terminais, células satélites, vasos sanguíneos ou tecido conectivo. Gutiérrez *et al.* (1989) e Gutiérrez & Lomonte (1997), corroboram esta tese afirmando que observações sobre o tecido muscular injetado com as miotoxinas isoladas do veneno de *Bothrops*, revela a ausência de alterações histológicas em vasos e nervos.

A mionecrose ocorre em uma variedade de condições patológicas, tais como distrofia e isquemia, como também após a administração de drogas, toxinas e venenos. Entre estes agentes, os venenos de serpentes, ou mais particularmente as toxinas isoladas destes venenos, podem ser usadas no desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da degeneração muscular e sua posterior regeneração (Gutiérrez *et al.*, 1989). O dano muscular e regeneração induzida pelas PLA₂s do veneno de serpentes, constituem excelentes modelos para investigar aspectos gerais da patologia muscular, como também as muitas similaridades entre estes eventos e os associados com uma variedade de doenças musculares (Gutiérrez, 2000).

Houve variação regional em todas as atividades biológicas testadas, já que o veneno das serpentes procedentes da SB apresentou atividades hemorrágica (tanto utilizando-se a técnica de dosagem de hemoglobina por espectrofotômetro, quanto a observada na medição da área hemorrágica), necrosante e miotóxica (liberação de CK) maior que o da RMS. No entanto, a atividade coagulante desta última foi maior que o da SB. A variação sexual também foi observada, considerando que o veneno das fêmeas apresentou atividade coagulante maior que o de machos.

Sanchez *et al.* (1992) também referem variação geográfica nas atividades hemorrágica, necrosante e coagulante do veneno de *B. alternatus* procedente do Brasil e da Argentina (DMH de 26,4 e 44,2 µg/rato, DMN de traços e 172,8 µg/rato e DMC-f de 30,4 e 52,0 mg/l, respectivamente) e do veneno de *B. atrox* procedentes do Brasil e do Peru (DMH

de 16,9 e 14,5 µg/rato, DMN de 23,9 e 178,5 µg/rato e DMC-f de 2,5 e 6,0 mg/l, respectivamente). Variação na miotoxicidade foi referida em função da idade da serpente *B. atrox*, por Chaves *et al.* (1992) que afirmaram que o dano tecidual local induzido por filhotes diferia do induzido pelo veneno das adultas em alguns caminhos: (a) a hemorragia é mais extensa depois da injeção do veneno de filhotes; (b) o veneno dos filhotes induzem efeitos mais drásticos sobre as artérias e veias e provocam um edema mais proeminente e (c) o veneno das adultas tem ação miotóxica mais potente que o dos filhotes.

7.3.8. Atividade sobre a Junção Neuromuscular:

A relação direta entre a toxicidade do veneno e a sua capacidade em bloquear a resposta contrátil de preparações isoladas não foi observada por Zamunér (1997), já que os seus resultados demonstraram uma considerável diferença entre a potência de alguns venenos botrópicos e a capacidade bloqueadora neuromuscular. Exemplo disso foi a menor toxicidade da peçonha de *B. neuwiedi* (1,56 mg/kg) em relação a *B. erythromelas* (0,55 mg/Kg) e a maior atividade neurotóxica (podendo causar bloqueio a uma concentração a partir de 5 µg/ml). Nossos dados corroboram esta informação, considerando que os venenos da SB e de machos foram mais tóxicos, porém menos capazes de promover o bloqueio de 50% da resposta contrátil em preparações NFD do que os venenos da RMS e de fêmeas.

Em 1971, Rosenfeld classificou o envenenamento botrópico como decorrente das seguintes atividades patológicas: proteolítica, hemorrágica e coagulante, corroborado por estudos clínico-epidemiológicos realizados até hoje. Por essa razão, os estudos do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* foram direcionados para entender a gênese da dor, edema e inflamação, da hemorragia, da alteração da coagulabilidade sangüínea e da necrose extensa dos tecidos, em particular do músculo esquelético (miotoxicidade).

A atividade do veneno de serpente do gênero *Bothrops* sobre a junção neuromuscular, foi experimentalmente reportada para *B. jararacussu* (Heluany *et al.*, 1992; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Franco, 1997; Zamunér, 1997), *B. jararaca* (Cogo, 1991; Zamunér, 1997), *B. insularis* (Cogo, 1991; Cogo *et al.*, 1993, 1998), *B. neuwiedi* (Zamunér, 1997; Borja-Oliveira, 1998; Borja-Oliveira *et al.*, 1998; Durigon *et al.*, 1998), *B. erythromelas* (Zamunér, 1997) e *B. moojeni* (Zamunér, 1997). Mais recentemente, tem-se

registrado o efeito do veneno de *B. leucurus* em músculo *biventer cervicis* de aves e junção neuromuscular de mamíferos (Lira-da-Silva *et al.*, 2000b; Prianti *et al.*, 2000a, 2000b).

A dificuldade tem sido no sentido de comparar os resultados encontrados pelos diversos autores, já que são utilizadas diferentes preparações tais como o *biventer cervicis* de pintainho, nervo frênico músculo diafragma de camundongo (NFD), *extensor digitorum longus* de camundongo (EDL), *cutaneous pectoris* de rã, entre outros. Estes músculos apresentam características particulares, tanto bioquímicas quanto fisiológicas das suas fibras musculares, tornando-se mais ou menos sensíveis a determinados venenos. Também deve-se levar em consideração que a sensibilidade da preparação pode estar associada a preferência alimentar da espécie de serpente em estudo.

Apesar disso, Harvey *et al.* (1994) afirmam que a preparação *biventer cervicis* de pintainho é a melhor para estimar a neurotoxicidade de venenos de serpentes porque usa poucos animais, pouco aparato e pouco veneno. Além da preparação ser facilmente dissecada, robusta, dar rápidos resultados e detectar efeitos pré e pós-juncionais e efeito direto sobre o músculo. No entanto, é pouco sensível para estudar efeitos miotóxicos com exatidão. Isto talvez explique a menor sensibilidade desta preparação para o veneno de *B. leucurus* que tem importante ação miotóxica. O veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, por exemplo, também foi mais potente em preparações de mamíferos do que de aves (Harvey *et al.*, 1994).

Existe concordância entre todos os autores que trabalharam com a “neurotoxicidade” dos venenos botrópicos no sentido de que: 1º) o bloqueio da resposta contrátil provocado pelos diferentes venenos estudados é irreversível; 2º) a maioria apresenta ação pós-sináptica, sugerindo que seu sítio de ação é principalmente o dano causado à membrana da célula muscular; 3º) *B. insularis* e *B. newwiedi* têm veneno com ação pré-sináptica pois induz uma facilitação da transmissão neuromuscular, representada pelo aumento de amplitude da resposta contrátil, antes do aparecimento do bloqueio e isto foi observado na maioria dos nossos experimentos, quando utilizadas amostras de veneno de fêmeas e de machos de *B. leucurus*. No caso da peçonha de *B. insularis* este efeito é mediado por uma fração incomum de PLA₂ que contribui para a ação neuromuscular do veneno total e 4º) baixas concentrações de veneno (20 µg/ml) revelam uma ação pré-

sináptica e altas doses (200 µg/ml) revelam ação pós-sináptica, o que parece indicar a presença de componentes miotóxicos, fato também observado por Harvey *et al.* (1994) para outros gêneros de serpentes elapídeas e viperídeas.

Segundo Vital Brazil (2000), o bloqueio da transmissão neuromuscular é um dos efeitos mais importantes pelo qual as presas de animais venenosos são imobilizadas e mortas pela inoculação dos seus venenos. Ele é produzido por ações pré e pós-sinápticas. O bloqueio pré-sináptico pode ser induzido por alguns mecanismos de inibição da liberação da Acetilcolina (ACh) pelos impulsos nervosos. O processo de liberação da ACh se inicia com a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes nos nervos terminais causando despolarização da sua membrana elicitada por potenciais de ação e influxo de íons cálcio. O bloqueio pós-sináptico é induzido pela interação de drogas ou toxinas com os receptores das placas terminais nos sítios da ACh (ação curamimética) ou outros sítios receptores. No último caso, a afinidade do receptor para o agonista é grandemente aumentada pela interação agonista-receptor.

O veneno da *B. neuwiedi* foi a que se mostrou mais potente em bloquear a junção neuromuscular e inibiu as respostas contráteis à estimulação indireta já nas doses de 5 µg. Do mesmo modo, a peçonha de *B. insularis* age em nível pré-sináptico por conter uma fração incomum de PLA₂ (Cogo *et al.* 1993, 1998; Zamunér, 1997). As demais espécies de *Bothrops*, até o momento estudadas, parecem agir pós-sinápticamente.

O veneno da *B. leucurus* mostrou-se uma dos mais potentes no bloqueio da junção neuromuscular (utilizando preparações NFD) quando comparado com o resultado de outros experimentos que utilizaram a preparação nervo frênico diafragma de camundongo. Possivelmente pela origem miotóxica desse efeito bloqueador, uma vez que a seção anterior demonstrou a atividade miotóxica desta peçonha, comparada com a atividade do veneno da *Bothrops asper*, espécie filogeneticamente aparentada e de mesmo grupo taxonômico. Isto porque a presença de componentes miotóxicos no veneno de serpentes pode reduzir a resposta do músculo esquelético à estimulação direta ou à exposição elevada de $[K^+]_0$ e/ou iniciar contraturas no músculo (Harvey *et al.*, 1994).

São escassos os trabalhos realizados com o veneno de serpentes do gênero *Bothrops* utilizando a preparação diafragma cronicamente desnervado de camundongo,

técnica desenvolvida por Vital Brazil (1965) e extensivamente utilizada para avaliar a resposta acetilcolínica (portanto, a nível pós-sináptico) do veneno de corais sul-americanas (*Micrurus*).

Em nosso trabalho, verificou-se inibição da resposta à Ach (redução de 57 a 84%) e da amplitude das contrações musculares, após adição das quatro amostras de veneno (RMS, SB, machos e fêmeas), de maneira dose-dependente e irreversível. Isto pode ser explicado por ocupação (afinidade química) ou destruição (atividade miotóxica ou proteolítica inespecífica) dos receptores nicotínicos, já que o veneno pode ter uma ação direta sobre a fibra muscular, reforçando a sua ação pós-sináptica. Estes dados diferem dos referidos por Vital Brazil (1965) que afirma que as peçonhas botrópicas (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. atrox* e *B. jararacussu*) se mostraram pouco ou nada ativas no diafragma desnervado. No entanto, este autor não afasta a hipótese de que a inibição da contratatura acetilcolínica, também seja devida à fosfolipase A₂ dos venenos botrópicos.

Borja-Oliveira (1998) demonstrou que a inibição da resposta à estimulação direta somente em doses superiores a 50 µg/ml, nas preparações nervo músculo de pintainho e camundongo, corrobora a indicação de que o veneno de *B. neuwiedi* é miotóxico. Esse efeito já foi relatado para outros venenos botrópicos tais como *B. jararacussu* (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983), *B. insularis* (Cogo *et al.*, 1993) e *B. pirajai* (Costa *et al.*, 1999).

Vital Brazil (1965) refere que a inibição da contratatura acetilcolínica se deve à ação do veneno na membrana das fibras musculares desnervadas. As fibras musculares inervadas são estimuladas pela Ach somente quando esta atua na região das placas terminais; ao contrário, a membrana das fibras musculares desnervadas é sensível à ação despolarizante da Ach em qualquer ponto de sua superfície (Axelsson & Thesleff, 1959, *apud* Vital Brazil, 1965). A desnervação conduz aparentemente à neoformação de receptores colinérgicos ao longo da membrana. A conversão desta, em uma superfície acetil-colínica sensível permite compreender a razão do aparecimento da resposta contratural à Ach após a desnervação. A contratatura acetilcolínica, assim como a provocada pelo íon potássio em fibras desnervadas e inervadas, deve-se a uma despolarização contemporânea e persistente da membrana dessas fibras. Apesar da peçonha de *B. leucurus*

ter sido capaz de diminuir este efeito, possivelmente não deve ser pelo mesmo mecanismo observado em *Micrurus*, cujo veneno atua na membrana das fibras musculares desnervadas (por ocupação dos receptores – “curare-like”). Isto porque a ação acima descrita não pode ser atribuída a ação de proteases, enzimas comuns nos venenos botrópicos.

Prianti *et al.* (2000a) corrobora a hipótese acima, inferindo que o bloqueio neuromuscular e a contratura provocadas pelo veneno de *B. leucurus*, em músculo *biventer cervicis* de pintainho, com doses de 40 e 160 µg/ml, possivelmente estariam relacionados a um efeito inespecífico sobre as membranas das fibras musculares.

Observou-se variação geográfica e sexual na atividade do veneno de *B. leucurus* na junção neuromuscular, tanto em preparações NFD quanto DCD. O veneno de serpentes procedentes da RMS e fêmeas foi mais potente em determinar o bloqueio da junção neuromuscular quando comparado com o veneno de serpentes da SB e machos. Do mesmo modo, a peçonha de serpentes da RMS foi mais potente em inibir a resposta acetilcolínica do que a de serpentes procedentes do SB, e contrariamente a peçonha de machos foi mais potente que a das fêmeas nesta ação.

Borja-Oliveira (1998) refere variação geográfica do veneno da serpente *B. neuwiedi pauloensis*, utilizando a preparação *biventer cervicis* de pintainho. Dentre as 7 amostras de veneno procedentes de São Paulo e uma amostra de Minas Gerais, 5 deles apresentaram maior atividade bloqueadora neuromuscular sobre esta preparação, do que todas as 8 amostras de veneno procedentes do Rio Grande do Sul. Isto demonstra que venenos de serpentes paulistas e mineiras foram mais ativos que o das gaúchas, apesar disso, a amostra de veneno menos ativa foi oriunda do estado de São Paulo. Este mesmo autor também sugeriu uma variação ontogenética quanto a esta atividade do veneno, já que um dos venenos menos ativos, entre os estudados, foi extraído de uma serpente jovem, o que poderia se supor que a atividade neurotóxica presente no veneno de *B. neuwiedi* seja uma característica tardia, considerando que um dos venenos mais ativos foi obtido de uma serpente adulta.

Barrio & Brazil (1951 *apud* Chippaux *et al.*, 1991), estudaram a ação neuromuscular de *Crotalus terrificus terrificus* em ratos, e encontraram 2 diferentes respostas. Esta atividade foi geograficamente diferente, com o Tipo I (caracterizada por

hipotonia e paralisia) presente nos venenos de cascavéis da Argentina, Paraguai e Bolívia, enquanto que o Tipo II (caracterizado por hipotonia e flacidez muscular) foi encontrado em cascavéis brasileiras. Schemberg (1953 *apud* Chippaux *et al.*, 1991), também encontrou diferença geográfica, estabelecendo um mapa do conteúdo de crotamina do veneno de espécimens de *C. durissus* de São Paulo. Duas áreas foram estudadas, em uma a crotamina esteve presente e na outra, a crotamina esteve presente ou ausente no veneno.

Pinheiro *et al.* (1997) referiram variabilidade intrapopulacional nos efeitos do veneno de *C. d. ruruima*, de espécimens procedentes de Monte Cristo (Boa Vista, Roraima), com atividade negativa para a crotamina.

Variação regional das características bioquímicas e antigênicas do veneno de *Crotalus viridis lutosus*, de diferentes regiões dos EUA, também foi observada por Adame *et al.* (1990) e atribuída a habilidade das toxinas em induzir proteólise seletiva por influência da diferença existente em certos genes ou na atividade desses genes.

O veneno de espécimens de *B. nummifer* coletados na Costa Rica mostraram claramente a variação bioquímica entre as do lado Atlântico e Pacífico. Para Jimenez-Porras (1964 *apud* Chippaux *et al.*, 1991), o isolamento reprodutivo destas populações por uma cadeia de montanhas correndo ao longo do País, pode ser responsável pela evolução desta variação. Variantes híbridos podem ser encontrados onde há possibilidade de intrecruzamento entre estas populações. Uma situação similar da variabilidade entre zonas do Atlântico e do Pacífico, também foi encontrada na composição do veneno de exemplares de *B. asper* (Aragon-Ortiz & Gubensek, 1981 e Moreno *et al.*, *apud* Chippaux *et al.*, 1991).

Pouca atenção tem sido dada ao sexo da serpente como possível fonte de variação do veneno e, em muitos casos, tem sido tratado como uma observação acidental. Em muitos casos nenhuma variação tem sido reportada entre os venenos de machos e fêmeas e Willemse (1978) sugeriu que esta variação seja explicada por outros fatores. Das investigações feitas com o veneno de um grande número de espécies de serpentes por Schenberg & Latifi (1984 *apud* Chippaux *et al.*, 1991), concluiu-se que o sexo da serpente não contribuiu como um fator de variabilidade. Nenhuma correlação para o sexo foi encontrada para explicar a variabilidade do veneno de *Echis carinatus* e *Bitis gabonica* (Taborska, 1971 e Chippaux *et al.*, 1982 *apud* Chippaux *et al.*, 1991). No entanto, dois

relatos de Marsh & Glatston (1974) e Mebs & Kornalik (1984 *apud* Chippaux *et al.*, 1991), sugerem a possibilidade de variação sexual no veneno de *Bitis nasicornis*.

Variação geográfica, sexual e ontogenética foi observada utilizando 96 amostras do veneno de *C. rhodostoma* procedentes do Vietnã, Tailândia, Malásia e Java, referente à focalização isoeétrica e às atividades fosfodiesterase, alcalino-fosfomonoesterase, L-amino ácido oxidase, arginino ester hidrolase, 5'nucleotidase, trobina-símile e hemorrágica. Os dados corroboraram os achados clínicos que exibem variação sintomatológica, como a que ocorre na Tailândia onde a hemorragia espontânea está presente mais freqüentemente na gengiva e na Malásia, nos pulmões. Os autores sugerem que seja preparado um antiveneno contra o veneno de *C. rhodostoma* de todos os grupos de idade, ambos os sexos e de todas as regiões da sua faixa de distribuição geográfica (Daltry *et al.*, 1996a).

De acordo com Mukherjee *et al.* (2000), dependendo da origem geográfica da serpente *Daboia russelli*, seu veneno assim como o envenenamento por ela provocado, pode variar. Pacientes picados no Sri Lanka desenvolvem sintomatologia neurotóxica, enquanto que os picados em Burma, exibem um aumento na permeabilidade capilar e edema facial. O estudo da variação das propriedades biológicas e bioquímicas do veneno desta espécie, principalmente nas partes ocidental, norte e oriental da Índia, tem grande importância no envenenamento e na terapia do ofidismo.

Para Stocker (1990) o veneno das serpentes compreende uma mistura complexa de componentes com propriedades únicas do ponto de vista bioquímico e farmacológico. Devido a esta complexidade, após a inoculação, a peçonha desenvolve nos organismos vivos diferentes mecanismos de ação, que por sua vez resultam de um processo também complexo de patogênese. Estes mecanismos de ação dependem não só da composição qualitativa, mas também da distribuição quantitativa desses constituintes da peçonha, determinados muitas vezes pelas diferenças individuais, dietárias, estado de saúde, regionais, sexuais, estacionais e etárias dos animais (fatores extrínsecos) e genéticos (intrínsecos). Segundo Willemse (1978) a causa dessas variações ainda permanece obscura, mas a possibilidade da glândula de veneno também funcionar como um órgão excretor, por onde o animal pode perder excretas do corpo, explica inclusive a variação do veneno de

serpente para serpente da mesma espécie. Nesse sentido, a variação geográfica e sexual do veneno de serpentes constitui uma parte integrante da variação intra-específica.

Segundo Daltry *et al.* (1996b), três hipóteses podem explicar a influência da dieta, conseqüente da variação geográfica na variabilidade do veneno de serpentes: 1ª) A variação pode ser devido a distância entre os grupos e a oportunidade para mudar os genes que codificam o veneno é esperada que seja maior entre populações espacialmente mais distantes e isoladas, dos que entre populações próximas que permitam intercruzamento e maior similaridade no veneno; 2ª) A variação pode estar associada com a relação patrística entre os grupos, ou seja, populações com ancestral comum próximos, produzem venenos mais similares do que as que tem distância patrística maior e 3ª) A variação pode estar relacionada com a variação geográfica na dieta.

Esta última hipótese foi observada por Daltry *et al.* (1996b) para populações de *Calloselasma rhodostoma* de 36 localidades diferentes do Vietnã, Tailândia, Malásia e Java, utilizando como metodologia a focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida. Os autores sugeriram que a variação geográfica do veneno para esta espécie refletiu a seleção natural para presas das localidades onde as serpentes vivem, já que a função primária do veneno de viperídeas é imobilizar e digerir a presa e que as presas variam na sua susceptibilidade ao veneno.

Assim, a variação do veneno tem sido considerada em praticamente todos os níveis e foi considerada inicialmente como um possível auxílio para a sistemática filogenética. Parece não ser o caso, considerando as similaridades e dissimilaridades entre componentes do veneno, considerando que pressões seletivas sobre animais não relacionados ou distantemente relacionados, podem resultar no aparecimento de componentes tóxicos semelhantes do veneno. No entanto, comparações da peçonha inter-família, inter-gênero e inter-espécie, no contexto da classificação taxonômica, podem ser justificadas.

Duas importantes conseqüências podem advir do estudo da variabilidade da composição do veneno de serpentes: 1º) O uso do veneno como instrumento de pesquisa, considerando que a escolha da fonte do veneno deva ser uma passo inicial importante e que a composição individual da peçonha pode afetar o resultado das investigações; 2º) O

conhecimento desta variabilidade, principalmente geográfica, tem se tornado muito importante na produção de antivenenos mais eficazes; a diferença dos sintomas em vítimas picadas por serpentes de mesma espécie, mas de regiões diferentes, tem alertado os médicos para a necessidade de antivenenos mais específicos e tem enfatizado a ineficiência de antivenenos produzidos com amostras de venenos de áreas limitadas.

O desenvolvimento de um tratamento mais eficiente pode ser beneficiado com a expansão continuada do conhecimento da variabilidade dos venenos desses animais.

7.4. CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E SORONEUTRALIZAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICAS:

A reatividade imunoquímica entre os venenos dos crotalídeos americanos é bem conhecida (Moura-da-Silva *et al.*, 1990; de Roodt *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1993 *apud* de Roodt *et al.*, 1999a), assim como a capacidade dos soros antiofídicos de neutralizar as atividades tóxicas e enzimáticas de venenos não utilizados como imunógenos na sua preparação (Silles-Villaruel, 1977/78b; Dias-da-Silva *et al.*, 1989; de Roodt *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 1992a, 1992b; Russel, 1988, *apud* de Roodt *et al.*, 1999a), como é o caso da *B. leucurus*. Dado que as serpentes contém muitas enzimas comuns, não é surpresa que exista reatividade cruzada antigênica, onde um antiveneno produzido contra uma espécie de serpente neutraliza parcialmente o veneno de outra espécie (Berger & Bhatti, 1989). Por exemplo, a atividade PLA₂ é detectada em todos os venenos de serpentes e tem sido purificada de muitos deles (Iwanaga & Suzuki, 1979).

O veneno da *B. leucurus*, comparado com o de outras espécies de *Bothrops* do Brasil, apresentou diferenças na sua composição bioquímica e na intensidade de suas atividades biológicas. Estas diferenças se manifestam na sua baixa potência letal corroborada por estudos epidemiológicos realizados por Lira-da-Silva (1996), onde no período de 1982 a 1996, não houve nenhum óbito registrado por esta espécie, devendo-se considerar que maioria dos casos foram provocados por serpentes filhotes, machos e dos pacientes terem chegado nas primeiras 6 horas pós-picada.

Em 1989, Dias-da-Silva *et al.*, estudaram a reatividade cruzada dos antivenenos monovalentes para os venenos de 10 espécies de *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B.*

cotiara, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*), sendo que o veneno da *B. leucurus* não foi incluído neste trabalho. Os autores concluíram que todos os 10 venenos foram hábeis para induzir a formação de anticorpo que mutuamente reagem de maneira cruzada como avaliado pelos três métodos imunológicos utilizados (ELISA, imunodifusão e Westernblot), que os venenos de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, agem como bons imunógenos e são capazes de neutralizar a atividade letal dos outros venenos e que o veneno de *B. jararacussu* é um pobre imunógeno e sua atividade letal não é eficientemente bloqueada pelo antiveneno específico nem pelos antivenenos produzidos por outras espécies de *Bothrops*. Os resultados deste trabalho demonstraram que para a produção do antiveneno do Instituto Butantan, para fins terapêuticos, deveriam ser utilizados como imunógenos, os venenos de 5 espécies: *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*.

Lomonte *et al.* (1987 *apud* Berger & Bhatti, 1989) demonstraram que usando o antisoro contra a miotoxina de *B. asper*, detectou-se uma reatividade cruzada com uma proteína de *B. nummifer*, *B. schlegeli*, *B. godmani*, *B. picadoi* e *Agkistrodon bilineatus*. As proteínas detectadas tinham o mesmo peso molecular (16000 dáltons) em todas as espécies, exceto *B. picadoi*, cuja proteína tinha o peso molecular de 24000 dáltons, sugerindo que a reatividade cruzada dos componentes foi similar, mas não idêntica à miotoxina original.

Anticorpos contra a toxina de *Crotalus scutulatus scutulatus* (peso molecular entre 20 – 22000 dáltons), reagem fortemente com uma proteína similar dos venenos de *C. durissus*, *C. viridis concolor* e *C. tigris*, moderadamente com outros venenos tais como *C. durissus* e *Crotalus s. scutulatus* e fracamente com as peçonhas de *C. atrox* e *Trimeresurus flavoviridis*, segundo Wesinsein *et al.* (1985 *apud* Berger & Bhatti, 1989).

Nossos resultados corroboraram os trabalhos citados anteriormente, considerando que o ensaio de ELISA mostrou reatividade cruzada das 4 amostras (♂, ♀, RMS e SB) do veneno de *B. leucurus* frente a 4 soros disponíveis: Soros antibotrópico-crotálicos (SABC) do Instituto Butantan (IB), Instituto Vital Brazil (IVB), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e Soro anti-*B. leucurus* do Instituto Malbrán (Argentina). Segundo Russel (1988 *apud* de Roodt *et al.*, 1999a), Arni & Ward (1996 *apud* de Roodt *et al.*, 1999a), a reatividade cruzada se deve à uma grande similaridade nas

seqüências de aminoácidos e nas estruturas secundárias e terciárias que existem entre as proteínas homólogas dos venenos. Quando estas proteínas têm participação relevante nos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento, se observa a neutralização cruzada. A reatividade imunoquímica de antivenenos e venenos tem sido reportada mais fortemente entre crotalídeas e viperídeas, menos entre viperídeas e elapídeas e menos ainda entre crotalídeas e elapídeas (Russel, 1988 *apud* de Roodt *et al.*, 1999a). Mesmo assim, o soro comercial de *Vipera ammodytes* protegia contra o veneno de *B. alternatus*, *B. neuwiedi* e *B. jararaca*, mas foi ineficiente em neutralizar o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Elliot, 1977 *apud* de Roodt *et al.*, 1999b).

Moreno (1991) refere em seu trabalho, que o soro produzido pelo Clodomiro Picado (Costa Rica), fabricado principalmente com o veneno de *B. asper*, apresentou neutralização semelhante ao produzido pelo Instituto Butantan, utilizando-se como teste o veneno da *B. neuwiedi pauloensis*.

Apesar de todos os *pools* mostrarem títulos de anticorpos frente a todos os antisoros testados, a titulação foi maior frente ao soro específico anti-*B. leucurus* para todas as amostras, com exceção da RMS, onde a titulação deste soro foi equivalente a do SABC do IB. Isto reforça a idéia de que para a produção de antivenenos se recomenda utilizar como imunógenos os venenos dos exemplares da região geográfica onde será utilizado soro, já que estes protegeriam melhor o paciente frente a todas as atividades dos mesmos (WHO, 1981; Bogarín *et al.*, 1995 *apud* de Roodt *et al.*, 1997).

Estudo realizado por Bezerra (2000), onde foi feita a determinação da reatividade dos soros antitóxicos (poli e monoespecífico) frente ao veneno de *B. erythromelas*, reforça as observações feitas neste trabalho. O autor demonstrou, através da técnica de “imunoblotting”, que ambos os soros identificam todas as proteínas da peçonha de *B. erythromelas*, porém o reconhecimento por parte do soro anti-*B.erythromelas* é significativamente maior, devido a intensidade das bandas, do que o reconhecimento pelo soro poliespecífico comercial. Segundo Pontes *et al.* (2000), a técnica de Imunoblotting sugeriu que o antiveneno específico para *B. erythromelas* também possuiu maior reatividade, embora ambos os antivenenos (específico e comercial), tenha revelado as mesmas bandas.

Segundo Calich (1988 *apud* Bezerra, 2000), antígenos multirreativos solúveis, em presença de seus anticorpos correspondentes, formam um precipitado, desde que a concentração dos reagentes, de acordo com a lei de ação das massas, permita a constituição de complexos em concentração suficiente para atingir o ponto de precipitação ou insolubilização. A imunoprecipitação do veneno de *B. leucurus* com os antivenenos poliespecífico e monoespecífico demonstraram uma melhor reatividade com o anti-*B. leucurus*, confirmando a tendência de uma neutralização mais eficaz pelo referido soro.

A despeito das características da composição do veneno de *B. leucurus*, observou-se que o padrão eletroforético em acetato de celulose (Westerblot) permitiu uma diferenciação deste veneno com o de outras espécies de *Bothrops*. Nesta prova imunoquímica, observou-se que o veneno desta espécie apresentou reação cruzada, ou seja, foi reconhecido tanto frente ao soro anti-*B. leucurus* quanto ao SABC do IB, embora não seja utilizado como imunógeno no “pool” para a fabricação deste último soro.

Segundo de Roodt *et al.* (1998), existe um alto nível de reatividade imunoquímica cruzada entre antivenenos homólogos e heterólogos e os diferentes venenos do gênero *Bothrops*. Esta reatividade cruzada concorda com as fortes relações imunoquímicas entre os venenos das crotalídeas da América do Norte (Ownby & Colberg, 1990 *apud* de Roodt *et al.*, 1998) , como também entre os venenos das *Bothrops* sul-americanas (Siles-Villaruel *et al.*, 1974 *apud* de Roodt *et al.*, 1999a; Moura-da-Silva *et al.*, 1990).

Esta prova reafirma que apesar das diferenças no padrão eletroforético, existe grande similaridade antigênica entre os venenos de crotalíneos e a capacidade de soros não específicos em reconhecer os componentes de venenos de espécies diferentes ao utilizado para a produção de soro (Theakston, 1983; Caricati *et al.*, 1993; Moura-da-Silva *et al.*, 1990 *apud* de Roodt *et al.*, 1997). Apesar disso, a reação foi mais intensa quando utilizou-se o soro específico e todas as amostras apresentaram perfil semelhante quanto ao complexo antígeno-anticorpo, moléculas antigênicas que migraram para a membrana de celulose.

de Roodt *et al.* (1997, 1998, 1999a) encontraram resultados semelhantes aos nossos, onde as provas de soroneutralização realizadas mostraram que todos os soros utilizados inibiram as atividades total ou parcialmente do veneno de *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *B. ammodytoides* e *B. alternatus* que ocorrem na Argentina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Isto corrobora dados encontrados neste trabalho, pelo fato de que observamos que todos os antivenenos foram capazes de neutralizar as atividades hemorrágica, necrosante e hemolítica dos venenos de *B. leucurus*, procedentes da RMS e SB.

Um alto grau de soroneutralização cruzada das atividades hemorrágica, necrosante e proteolítica sobre gelatina foi observada no trabalho de de Roodt *et al.* (1998) e está também de acordo com os relatos feitos por Roselfeld & Kelen (1966 *apud* de Roodt *et al.*, 1998; Ownby *et al.*, 1984; Ferreira *et al.*, 1992a, 1992b), usando outros antivenenos, que pode ser explicado pelo compartilhamento de epitopos comuns entre as metaloproteinases de alto peso molecular (Bjarnason & Fox, 1994 *apud* de Roodt *et al.*, 1998) e as toxinas hemorrágicas do veneno de *Bothrops* (Mandelbaum *et al.*, 1989 *apud* de Roodt *et al.*, 1998).

Houve variação regional e também na capacidade de cada soro utilizado, em neutralizar as diferentes atividades deste veneno, já que o SABC produzido pelo IB foi mais eficiente para neutralizar as atividades hemorrágica e hemolítica indireta quando comparado com os soros da FUNED e IVB. O mais eficiente para neutralizar a atividade hemorrágica foi o produzido pelo Instituto Butantan para as duas amostras de veneno. Por outro lado, o SABC produzido pela FUNED neutralizou mais a atividade necrosante do veneno das serpentes da RMS que da SB, enquanto que o resultado obtido com o soro produzido pelo IB mostrou que ele neutralizou de maneira eqüivalente, o veneno da SB e da RMS.

Estas diferenças na capacidade neutralizante dos diferentes antivenenos estudados não podem ser explicadas pelas quantidades dos diferentes venenos empregados no protocolo de imunização. Ao invés disso, podem ser explicados pela existência de epitopos compartilhados entre as toxinas dos venenos botrópicos. Resultados semelhantes também foram obtidos por de Roodt *et al.* (1998) que testaram diferentes antivenenos

(monovalentes contra os venenos de *B. alternatus* e *C. d. terrificus* produzidos em coelhos, monovalente contra o veneno de *B. alternatus*, produzido em cavalos) frente aos venenos de serpentes argentinas de interesse médico (*B. alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. jararaca*, *B. jaracussu*, *B. moojeni* e *C. d. terrificus*).

As hemorragias por lesões vasculares se vêm favorecidas pela afibrinogenemia causada pela atividade pró-coagulante dos venenos botrópicos (de Roodt *et al.*, 1997) e em todas as provas realizadas observou-se uma demora do tempo de coagulação. Comparando os três soros, observou-se que o SABC do IB neutralizou melhor a atividade coagulante do veneno de serpentes procedentes da RMS e SB do que a atividade do veneno de machos e fêmeas que foram neutralizados de maneira equivalente. O SABC do IVB, no entanto, se mostrou o mais eficiente em neutralizar a atividade coagulante do veneno de serpentes da RMS e neutralizou igual o veneno de serpentes da SB, machos e fêmeas. O SABC da FUNED não mostrou diferença na capacidade neutralizante desta atividade frente as diferentes amostras de veneno. Um grau de neutralização cruzada na atividade pró-coagulante foi também observada por de Roodt *et al.* (1998), com os antivenenos testados frente as serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* que ocorrem na Argentina.

Segundo estes últimos autores as diferenças nas capacidades neutralizantes também observadas podem ser explicadas assumindo a presença de diferentes determinantes antigênicos nos venenos testados.

A hemólise radial, além de indicar a capacidade dos venenos em alterar as membranas eritrocitárias, permite se ter uma idéia da atividade fosfolipásica dos venenos. A lise é provocada pelos lisofosfatídeos produzidos pela fosfolipase A₂ (PLA₂) dos venenos sobre estas membranas (de Roodt *et al.*, 1997). Nesse sentido, a hemólise indireta está diretamente relacionada com a atividade PLA₂ que exibe um alto grau de homologia nas seqüências de aminoácidos e estruturas terciárias (Atrni & Ward, 1996 *apud* de Roodt *et al.*, 1998), e por esta razão, um alto grau de inibição cruzada com os antivenenos heterólogos pode ser esperada.

O SABC do IB foi 47 e 33 vezes mais potente na soroneutralização da atividade hemolítica indireta do veneno de *B. leucurus* da RMS que da SB. Os SABC do IVB e FUNED neutralizaram de maneira mais eficiente esta atividade tanto para amostras da

RMS quanto SB, sendo que para esta última a capacidade neutralizante foi melhor. Segundo Dias-da-Silva *et al.* (1989), a inibição por um soro da atividade hemolítica indireta do veneno de crotalíneos pode correlacionar-se com a inibição da PLA₂ e com a capacidade soroneutralizante do mesmo. Por outro lado, a quantidade de PLA₂ nos diferentes venenos é altamente variável, o que pode explicar a variação na capacidade neutralizante dos soros frente as diferentes amostras de veneno utilizadas. No veneno de *C. d. terrificus*, esta enzima representa 50% da sua massa de proteína e 2,5% das proteínas do veneno de *B. alternatus* (Haberman & Brithaup, 1978 e Nisembon *et al.*, 1986 *apud* de Roodt *et al.* 1998). Os antivenenos com baixa atividade fosfolipásica podem ser inibidos pelos antivenenos testados que são produzidos com venenos com alta atividade PLA₂ (de Roodt *et al.* 1998).

Até o momento, o veneno de *B. leucurus* não tem sido utilizado para a preparação dos soros anti-ofídicos produzidos no Brasil e apesar disso, observou-se uma reatividade cruzada que se manifestou tanto nas provas *in vivo* quanto *in vitro*. Os soros produzidos pelo Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil e Fundação Ezequiel Dias continuam utilizando como imunógeno um número reduzido de venenos botrópicos (50% de veneno de *B. jararaca*, 12,5% de *B. alternatus*, 12,5% de *B. jararacussu*, 12,5% de *B. moojeni* e 12,5% de *B. neuwiedi*) (Camey *et al.*, 2000) que neutralizam as atividades dos venenos heterólogos, como demonstrado por Dias-da-Silva *et al.* (1989) e estes antivenenos protegem comprovadamente contra cerca de 10 espécies de *Bothrops*. Isto porque os vários antivenenos polivalentes são produzidos com um número pequeno de venenos como imunógenos e neutralizam a atividade dos venenos heterólogos.

Bezerra (2000) referiu uma notável diferença na neutralização de todas as atividades avaliadas na peçonha de *B. erythromelas* pelos soros antibotrópicos poliespecífico comercial e monoespecífico. Todas as atividades testadas foram neutralizadas por ambos os soros, porém as quantidade necessárias para a neutralização foram, aproximadamente, o dobro para o antiveneno comercial quando comparado com o anti-*B. erythromelas*. Pontes *et al.* (2000) também observaram soroneutralização das atividades letal, hemorrágica, necrosante e coagulante, mais eficiente do soro específico para *B. erythromelas* em relação ao antiveneno comercial.

Achados como estes concordam com os de Gutiérrez *et al.* (1988 *apud* Bezerra 2000) que, estudando a neutralização do soro monovalente anti-*B. asper*, demonstrou que este antiveneno foi mais eficaz que o polivalente na neutralização das atividades letal e hemorrágica desta espécie.

Embora os resultados deste trabalho tenham demonstrado que os soros provados neutralizam as atividades biológicas do veneno e que poderiam ser utilizados nos casos dos acidentes ofídicos por *B. leucurus*, ainda há necessidade de prosseguir com os testes de soroneutralização, em humanos, comparando o soro específico com o comercial.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

8. CONCLUSÃO

O veneno de *B. leucurus* caracteriza-se por:

a) apresentar perfil eletroforético com a presença de 4 bandas e perfil cromatográfico com 7 picos, sem variação regional ou sexual;

b) alta atividade fibrinolítica, proteolítica, hemorrágica e edemaciante, quando comparado com o veneno de *B. jararaca*, de referência nacional, e baixa atividade coagulante sobre plasma humano citratado;

c) importante capacidade de induz mionecrose, caracterizada por células edemaciadas ou “balonizadas”, lesões “delta” sobre membrana celular, regiões de hipercontração e condensação das miofibrilas, alternando-se com espaços vazios no sarcoplasma, áreas focais e extensas de degeneração das fibras musculares, sem variação regional ou sexual;

d) variação regional, mas não sexual, na toxicidade sendo a peçonha das serpentes procedentes do Sul/Sudeste baiano é significativamente mais tóxica que a dos animais da Região Metropolitana do Salvador;

e) variação regional e sexual, nas atividades biológicas, já que o veneno das serpentes da SB apresentou atividades hemorrágica, necrosante e miotóxica maior que da RMS e o veneno das fêmeas apresentou atividade coagulante maior que o de machos.

Quanto aos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops leucurus*, em preparações isoladas de nervo frênico músculo diafragma de camundongo, concluiu-se que:

a) doses a partir de 50 µg/ml inibem a transmissão neuromuscular (exceção feita ao veneno dos machos), de maneira irreversível e dose-dependente. Isto ocorre, provavelmente, por suas ações pós-juncionais;

b) veneno de machos e fêmeas apresentam ação pré-sináptica em baixas concentrações (10 µg/ml) devido ao aumento na amplitude das contrações musculares;

c) existe variação regional e sexual quanto a capacidade para bloquear 50% da junção neuromuscular desta preparação, sendo as peçonhas da RMS e fêmeas significativamente mais potentes.

Quanto aos experimentos realizados com o veneno da serpente *Bothrops leucurus*, em preparações isoladas de músculo diafragma cronicamente desnervado de camundongo, concluiu-se que:

a) Este veneno inibe a resposta acetilcolínica nas doses de 50 e 100 µg/ml e a amplitude da resposta muscular de maneira dose-dependente (exceção feita ao veneno de machos e fêmeas) e irreversível, corroborando a sua ação pós-sináptica;

b) Existe variação regional e sexual quanto a capacidade em inibir a resposta acetilcolínica e da contratura muscular, sendo os venenos da RMS e de machos, os mais potentes.

Quanto às provas imunoquímicas e de soroneutralização conclui-se que:

a) todas as amostras apresentam títulos de anticorpos frente a todos os antisoros testados, no entanto, a titulação foi maior frente ao soro específico anti-*B. leucurus* para todas as amostras, com exceção da RMS, onde a titulação deste soro foi equivalente a do SABC do Instituto Butantan (IB).

b) o veneno de *B. leucurus* apresenta reação cruzada tanto frente ao soro específico, quanto ao comercial produzido pelo Instituto Butantan e que a reação foi mais intensa quando utilizou-se o soro específico.

c) todos os antivenenos foram capazes de neutralizar as atividades hemorrágica, necrosante e hemolítica do veneno de *B. leucurus*.

d) houve variação na capacidade neutralizante dos diferentes soros frente às amostras de veneno utilizadas e o SABC/IB apresentou maior titulação de anticorpos frente ao veneno de machos e da RMS e menor frente ao veneno de fêmeas e da SB. O

SABC/FUNED e IVB foi melhor reconhecido pelo veneno de serpentes machos, da RMS e SB do que pelo veneno de fêmeas

Consideramos prematura a idéia de que os soros produzidos comercialmente podem ser utilizados de forma habitual nos envenenamentos humanos por esta espécie, sem ter a certeza de que um soro específico, testado em pacientes, seria de fato o melhor.

9. SUMMARY

The present work was a pharmacological study of the action *Bothrops leucurus* venom, popular known as “white-tailed lancehead”. Venom effects (males and females from MRS and South/Southeast region – SSR, Bahia, Brazil) were examined to establish geographical and sexual variability. The venom was characterized based on biochemical (total protein content, chromatographic and electrophoretic pattern), biological (lethal – LD₅₀, proteolytic, venom-induced oedema – ED₃₀, haemorrhagic - MHD, necrotizing - MND, procoagulant - MCD, defibrinogenating - MDD, myotoxic and neurotoxic activities), immunochemical (ELISA, Westernblot) properties and neutralization of the toxic activities (haemorrhage, necrosis and coagulation). The antiothropic antivenom was provided Instituto Butantan, Instituto Vital Brazil and Fundação Ezequiel Dias (Brazil) and anti-*Bothrops leucurus* antivenom provided Instituto Malbrán (Argentina). The electrophoretic pattern showed 4 bands and chromatographic pattern 7 peaks without sexual and geographical variability. Lethal, haemorrhagic, necrotizing and myotoxic activities are more intense in snakes proceeding of the SSR than MRS. The coagulant activity of the female’s venom is more coagulant than male. All samples induced myonecrosis characterized by swollen, vacuolization, “delta” lesions, myofilament hypercontraction and areas of the muscular damage. Results indicated that by indirect stimulation, *B. leucurus* venom induced neuromuscular blockade dose-dependent and is irreversible under concentration upper of 50 µg/ml, with exception of the male’s venom (upper 100 µg/ml). This occurred probably due to postsynaptic action (depolarizing the cellular membrane, characterized for the severe contracture in 100 µg/ml e 200 µg/ml concentrations) of the venom proceeding of the MRS and SSR regions and moderated contracture in 200 µg/ml concentration of the males and females venom. A males and females venom-induced effect on presynaptic activity was suggested by the marked increase in the twitch tension in 10 µg/ml concentration. The female’s *B. leucurus* venom and proceeding of the MRS region were more potent than male’s venom of the SSR region in provoked 50% of the neuromuscular blockade ($P < 0.05$). With direct stimulation be observed reduction of the acetylcholinic response in concentrations 50 µg/ml and 100 µg/ml (MRS_{50µg/ml}=36±8,7%, MRS_{100µg/ml}=22±2,7%, SSR_{50µg/ml}=39±8,7%, SSR_{100µg/ml}=27±2,7% and □_{50µg/ml}=33±14,4%, □_{100µg/ml}=16±4,9%, □_{50µg/ml}=53±21,1%, □_{100µg/ml}=20±5,9%), and reduction dose-dependent and irreversible in the twitch tension of the muscular response. *B. leucurus* venom

presented variability sexual and regional in the action on the neuromuscular junction. The results observed in the ELISA test revealed that the all antivenom have recognition for the samples tested but the anti-*B. leucurus* shows higher anti-body titles. The Westernblot showed that the presented cross-reactivity between antithropic and anti-*B. leucurus* antivenoms, but the reaction was more intense with the anti-*B. leucurus* serum. All antivenoms were capable to neutralize the haemorrhagic, necrotizing and haemolytic activities.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAME, B.L., SOTO, J.G., SECRAW, D.J., PEREZ, J.C., GLENN, J.L., STRAIGHT, R.C. Regional variation of biochemical characteristics and antigenity in great basin rattlesnake (*Crotalus viridis lutosus*) venom. Comp. Biochem. Physiology, v. 97B, n. 1, p. 95-101. 1990.
- AL-ABDHULAH, I.H., SIDKI, A.M., CANDOM, J. An indirect haemolytic assay for assessing antivenoms. Toxicon, Oxford, v. 29, p. 1043-1146. 1991.
- AMARAL, C.F., DA SILVA, O. A., GODOY, P., MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. Toxicon, Oxford, v. 23, n. 6, p. 877-885. 1985.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., ANGULO, Y., DÍAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R.. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. Biochimie, v. 82, p. 755-763. 2000.
- ASSAKURA, M.T., REICHL, A. P., ASPERTI, M. C., MANDELBAUM, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. Toxicon, Oxford, v. 23, p. 691-706. 1985.
- BAHIA, SECRETARIA DA SAÚDE. Relatório Anual do Centro de Informações Antiveneno da Bahia. Salvador: Governo do Estado da Bahia, 1999. 22p.
- BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. Revisão. JBM, São Paulo, v. 65, n. 4, p. 209-250. 1993.
- BELLUOMINI, H.E. Extraction and quantities of venom obtained from some brazilian snakes. In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E.E., DEULOFEU, V. Venemous animals and their venom. New York, Academic Press, 1968. v. 1, cap. 5, p. 97-111.
- BERGER, B.J., BHATTI, R. Snake venom components and their cross-reactivity: a review. Biochem. Cell. Biology, v. 67, p. 597-601. 1989.

- BEZERRA, M.M.P. Comparação da capacidade neutralizante dos soros antitoxínicos poliespecífico comercial e monoespecífico frente à peçonha de *Bothrops erythromelas* (jararaca da seca). Recife. Dissertação de Mestrado (Biofísica). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. 2000. p. 64.
- BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Haemorrhagic toxins from snake venom. J. Toxinol. Review, v. 7, n. 2, p. 121-209. 1988/89.
- BORJA-OLIVEIRA, C.R. Estudo comparativo da neurotoxicidade de venenos de *Bothrops neuwiedi* de diferentes procedências e isolamento parcial de um componente neurotóxico do veneno mais ativo. Campinas. Dissertação de Mestrado (Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. 1998. p. 65.
- BORJA-OLIVEIRA, C.R., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L. Neurotoxic activity of *Bothrops neuwiedi* venoms from different localities of the State of São Paulo and Rio Grande do Sul in Brazil. In: IV SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 1998, Angra dos Reis, RJ. Resumos, Angra dos Reis: SBTx. p. 214.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais peçonhentos, 1999. 131 p.
- BRAZIL, V. O ophidismo no Brasil. Brazil Médico, São Paulo, v. 20, p. 7-8. 1906.
- BRAZIL, V. A defesa contra o ofidismo. São Paulo. Pocar & Weiss. 1911. p. 152.
- BRYGOO, E.R. La découverte de la sérothérapie antivenimeuse en 1894. Phisalix, Bertrand ou Calmette?. Toxicon, Oxford, v. 46, p. 59-77. 1982.
- BÜLBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. Br. J. Pharmac., n. 1, p. 38-61. 1946.

- CAMEY, U., VERLARDE, D.T., SANCHEZ, E.F. Pharmacological characterization of bothropic antigen and of commercial serum produced at FUNED. In: REUNIÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO BUTANTAN, 2000. São Paulo. Resumos, São Paulo: Fundação Instituto Butantan, 2000. p. 119.
- CARMO, I.C.R. Contribuição para o estudo epidemiológico de acidentes ofídicos no Estado da Bahia no período de 1991 - 1992. Salvador, 1994. 55 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia.
- CARMO, I.C.R., NUNES, T.B., LIRA-DA-SILVA, R.M. Estudo epidemiológico do ofidismo no estado da Bahia no período de 1991-1992. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, II CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE EPIDEMIOLOGIA, I CONGRESSO LATINO AMERICANO DE EPIDEMIOLOGIA, 1995, Salvador. Resumos, Salvador: ABRASCO, SIAE, ALAMES, 1995. p. 113.
- CASAIS-E-SILVA, L.L. Caracterização das atividades biológicas e enzimáticas do veneno de duas espécies de *Micrurus* (Serpentes: Elapidae) do estado da Bahia. São Paulo. Dissertação de Mestrado (Fisiologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 1995. p. 98.
- CHAVES, F., GUTIÉRREZ, J.M., BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon, Oxford, v. 30, n. 9, p. 1099-1109. 1992.
- CHIPPAUX, J.P., WILLIAMS, V., WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon, Oxford, v. 29, n. 11, p. 1279-1303. 1991.
- COGO, J.C. Estudo dos efeitos da peçonha de *Bothrops insularis* (jararaca-ilhoa) sobre músculo de camundongo e pintainho. Campinas. Dissertação de Mestrado (Fisiologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas. 1991. p. 69.

- COGO, J.C., PRADO-FRANCESCHI, J., CRUZ-HÖFLING, M.A., CORRADO, A.P., RODRIGUES-SIMIONI, L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. Toxicon, Oxford, v. 31, n. 10, p. 1237-1247. 1993.
- COGO, J.C., PRADO-FRANCESCHI, J., GIGLIO, J.R., CORRADO, A.P., CRUZ-HÖFLING, M.A., DONATO, J.L., LEITE, G.B., RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. Toxicon, Oxford, v. 36, n. 10, p. 1323-1332. 1998.
- COSTA, P.D., TOYAMA, M. H., MARANGONI, S., RODRIGUES-SIMIONI, L., CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (EDL) muscle preparation. Toxicon, Oxford, v. 37, p. 1143-1153. 1999.
- DALTRY, J.C., PONNUDURAI, G., SHIN, C.K., TAN, N.H., THORPE, R.S., WÜSTER, W. Electrophoretic profiles and biochemical activities: intraespecific variation in the venom of the malayan pi viper (*Calloselasma rhodostoma*). Toxicon, Oxford, v. 34, n. 1, p. 67-79. 1996a.
- DALTRY, J.C., WÜSTER, W., THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. Nature, v. 379, p. 537-540. 1996b.
- de ROODT, A.R., DOLAB, J., HAJOS, S., FERNÁNDEZ, T., SEGRE, L. Capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos frente al veneno de *Bothrops moojeni* (caisaca, lanzadeira). Medicina, Buenos Aires, n. 57, p. 667-676. 1997.
- de ROODT, A.R., DOLAB, J., FERNÁNDEZ, T., SEGRE, L., HAJOS, S. Cross-reactivity and heterologous neutralization of crotalinae antivenoms used in Argentina. Toxicon, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1025-1038. 1998.
- de ROODT, A.R., VIDAL, J., LITWIN, S., DOKMETJIAN, C., DOLAB, J., HAJOS, S., SEGRE, L. Neutralización cruzada de veneno de *Bothrops jararacussu* por sueros antiofídicos heterólogos. Medicina, Buenos Aires, n. 59, p. 238-242. 1999a.

- de ROODT, A.R., DOLAB, J., SEGRE, L., SIMIONCINI, C., HAJOS, S., FERNÁNDEZ, T., DOKMETJIAN, J.C., LITWIN, S., ACCATTOLI, C., VIDAL, J. The immunochemical reactivity and neutralizing capacity of polyvalent *Vipera* (european) antivenom in the venoms of crotalids from Argentina. J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 67-83. 1999b.
- de ROODT, A.R., DOLAB, J., DOKMETJIAN, C., LITWIN, S., SEGRE, L., VIDAL, J. A comparison of diferent methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. Toxicon, Oxford, v. 38, p. 855-864. 2000.
- DEVI, W. The protein and non protein constituents of snake venoms. In: BÜCHERL, W., BUCKLEY, E.E., DELOFEU, V. ed. Venoms animals and their venoms. Academic Press: New York, Vol. I, p. 119-165. 1971.
- DIAS-DA-SILVA, W., GUIDOLIN, R., RAW, I., HIGASHI, H.G., CARICATI, C.P., MORAIS, J.F., LIMA, M.L.S.R., YAMAGUCHI, I.K., NISHIKAWA, A.K., STEPHANO, M.A., MARCELINO, J.R., PINTO, J.R., SANTOS, M.J. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. Mem Inst. Butantan, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 153-168. 1989.
- DUARTE, M.T.L., SOARES, M.S., SOUTO, A., GUARNIERI, M.C. First record of *Bothrops leucurus* (Snake: Viperidae) in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. In: REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL DO INSTITUTO BUTANTAN, 2000. São Paulo. Resumos: São Paulo, Fundação Instituto Butantan, 2000. p. 129.
- DURÍGON, A M., LEITE, G.B., VALLIN, C.C., COGO, J.C., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L. Efeitos da peçonha de *Bothrops neuwiedi* na transmissão neuromuscular de mamífero e ave. In: XIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 1998. Caxambu. Resumos: Caxambu, Sociedade de Biologia Experimental, 1998. p. 191.
- FERREIRA, M.L., MOURA-DA-SILVA, A.M., FRANÇA, F.O.S., CARDOSO, J.L.C., MOTA, I. Toxic activities from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. Toxicon, Oxford, v. 30, p. 1063-1068. 1992a.

- FERREIRA, M.L., MOURA-DA-SILVA, A.M., MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. Toxicon, Oxford, v. 30, p. 1591-1602. 1992b.
- FLETCHER, J.E., SELISTRE-DE ARAÚJO, H.S., OWNBY, C. L.. Molecular events in the myotoxic action of Phospholipases. In: KINI, R.M. ed. Venom phospholipase A₂ enzymes. Structure, function and mechanisms. John Wiley & Sons: New York, cap. 13, p. 455-497. 1997.
- FRANÇA, F.O.S., FAN, H.W. Acidente botrópico. In: SCHVARTZMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. 2ª ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 1992. p. 149-160.
- FRANCO, Y.O. Atividade neurotóxica e miotóxica dos venenos de *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu* e de suas principais toxinas, perante antivenenos. Campinas. Dissertação de Mestrado (Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. 1997. p. 133.
- FULY, A.L., CALIL-ELIAS, S., ZINGALI, R.B., GUIMARÃES, J.A., MELO, P.A. Myotoxicity activity of na acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snakes venom. Toxicon, Oxford, v. 38, p. 961-972. 2000.
- FURTADO, M.F.D. Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (HOGE, 1965) (SERPENTES, VIPERIDAE, CROTALINAE) em função da idade das serpentes. São Paulo. Tese de Doutorado (Fisiologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1987. p. 118.
- FURTADO, M.F.D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S., ANTÔNIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon, Oxford, v. 29, n. 2, p. 219-226. 1991.
- GUTIÉRREZ, J.M. La evaluación de la capacidad neutralizante de los venenos en America. Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 21p. 1990.

- GUTIÉRREZ, J.M., ARROYO, O., BOLAÑOS, R.. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon, Oxford, v. 18, p. 603-610. 1980.
- GUTIÉRREZ, J.M., CHAVES, F., GENÉ, J.A., LOMONTE, B., CAMACHO, Z., SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxins isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. Toxicon, Oxford, v. 27, n. 7, p. 735-745. 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 211-223. 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M., AVILA, C., CAMACHO, Z., LOMONTE, B. Ontogenetic in the venom of the snake *Lachesis stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. Toxicon, Oxford, v. 28, n. 4, p. 419-426. 1990.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1405-1424. 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R.M. ed. Venom phospholipase A₂ enzymes. Structure, function and mechanisms. John Wiley & Sons: New York, cap. 13, p. 321-351. 1997.
- GUTIÉRREZ, J.M. Phospholipases A₂ as tools in the study of muscle degeneration and regeneration. In: REUNIÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO BUTANTAN, 2000. São Paulo. Resumos, São Paulo: Fundação Instituto Butantan, 2000. p. 38.
- HAAD, J.S. Acidentes humanos por las serpientes de los generos *Bothrops* y *Lachesis*. Mem Inst. Butantan, São Paulo, n. 44/45, p. 373-423. 1980/81.
- HARRIS, J.B., MACDONELL, C.A. Phospholipase A₂ activity of notexin and its role in muscle damage. Toxicon, Oxford, v. 19, n. 3, p. 419-430. 1981.

- HARVEY, A.L.; BARFARAZ, A., THOMSON, E., FAIZ, A., HARRIS, J.B. Screening of snake venom for neurotoxic and myotoxic effects using simple *in vitro* preparations from rodents and chicks. Toxicon, Oxford, v. 32, n. 3, p. 257-265. 1994.
- HELUANY, N.F., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick preparations. Toxicon, Oxford, v. 30, n. 10, p. 1203-1210. 1992.
- HIGASHI, H.G., GUIDOLIN, R., NISHIKAWA, A.K., YAMAGUCHI, I.K., LIMA, M.L.S.R., MORAIS, J.F. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, v. 51, p. 107. 1989.
- HOFFMAN, H., BON, C. Blood coagulation induced by venom of *Bothrops atrox*, 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. Biochemistry, v. 26, p. 780-787. 1987.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H., RODRIGUES-SIMIONI, L., GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxins. Toxicon, Oxford, v. 26, n. 7, p. 615-627. 1988.
- IWANAGA, S., SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: LEE, C.Y.ed. Handbook of experimental pharmacology: snake venoms. Springer-Verlag: Berlim, v. 52, cap. 4, p. 61-158. 1979.
- KAMIGUTI, A.S., SILVA, M.C.S., MORENA, P., NAHAS, L. The coagulant effect of *Bothrops castelnaudi* snake venom (castelnaudi's pit viper). Toxicon, Oxford, v. 23, n. 3, p. 383-391. 1985.

- KAMIGUTI, A.S., ANTÔNIO, L.C., MARIANO, M. Coagulant activity of the venom of mature and imature snakes (*Bothrops jararaca*) on the blood of some mammals. In: GOPALAKRISHNAKONE, T., TAN, C.K. Progress in venom and toxin research. Bangkok, National University of Singapore, 1988. 296 p.
- KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L.C. Review article. Haemostatic changes caused by of South American snakes. Toxicon, Oxford, v. 27, n. 9, p. 955-963. 1989.
- KAMIGUTI, A.S., CARDOSO, J.L.C., THEAKSTON, D.G., SANO-MARTINS, I., HUTTON, R.A., RUGMAN, F.P., WARELL, D.A., HAY, C.R.M. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. Toxicon, Oxford, v. 29, n. 8, p. 961-972. 1991a.
- KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, D.G., DESMOND, H., HUTTON, R.A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. Toxicon, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1097-1105. 1991b.
- KAMIGUTI, A.S., HAY, C.R., THEAKSTON, D.G., ZUZEL, M. Insights into the mecanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. Toxicon, Oxford, v. 34, n. 6, p. 627-642. 1996.
- KARDOG, K.V. "Protovipers" and the evolution of snake fang. Evolution., v. 33, p. 433-458. 1979.
- KOCHVA, E. The origin of snake and evolution of the venom apparatus. Toxicon, Oxford, v. 25, p. 65-106. 1987.
- KOCHVA, E. Evolution of snakes - Evolution of an idea: the development of venom glands. In: XIIIth WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2000. Paris. Resumos, Paris: International Society on Toxinology, 2000. p. L83.
- KONDO, H., KONDO, S., KEZAWA, H., MURATA, R., OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu venom. Jpn. J. Med. Sci. Biol., v. 13, p. 43-51. 1960.

- KOUYOUMDJIAN, J.A., POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 424-432, nov/dez. 1988.
- KOUYOUMDJIAN, J.A., POLIZELLI, C., LOBO, S.M.A., GUIMARÃES, S.M. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. Arq. bras. Med., São Paulo, v. 64, n. 3, p. 167-171. 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 224, p. 789. 1970.
- LEAKE, C.D. Development of knowledge about venoms. In: BÜCHERL, W., BUCKLEY, E.E., DEULOFEU, V. eds. Venomous animals and their venoms. New York: Academic Press, v. 1, cap. 1. p. 1-12. 1968.
- LEÓN, G., ESTRADA, R., CHAVES, F., ROJAS, G., OVADIA, M., GUTIÉRREZ, J.M.. Inhibition by CaNa₂ EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. Toxicon, Oxford, v. 36, n. 2, p. 321-331. 1998.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., NUNES, T.B. Ophidic accidents by *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 in Bahia, Brazil. Toxicon, Oxford, v. 31, n.2, p. 143-144. 1993.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., LIMA, R.A., NUNES, T.B. Envenomations caused by *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (SERPENTES; VIPERIDAE) in metropolitan region of Salvador, Bahia. Rev. Soc. bras. Med. Tropical, n. 27 (supl.), p. 124. 1994.
- LIRA-DA-SILVA, R.M. Estudo clínico-epidemiológico dos acidentes por *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE) na região metropolitana do Salvador, Bahia, Brasil. Dissertação de Mestrado (Saúde Comunitária). Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, 1996. p. 135.

- LIRA-DA-SILVA, ANDRADE-LIMA, R., BRAZIL, T.K. Distribuição geográfica de *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE). In: IV CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HERPETOLOGIA, 1996. Santiago. Resumos, Santiago: Sociedade Latinoamericana de Zoologia, 1996a. p. 153.
- LIRA-DA-SILVA, R.M.; ANDRADE-LIMA, R., DIAS, E.J.R. *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE): padrão alimentar. In: IV CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HERPETOLOGIA, 1996. Santiago. Resumos, Santiago: Sociedade Latinoamericana de Zoologia, 1996b. p. 152.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., VASCONCELOS, C.M.L., GUARNIERI, M.C. Partial characterization of *Bothrops leucurus* venom. In: IV SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 1996. Recife. Resumos, Recife: Sociedade Brasileiro de Toxinologia, 1996c. p. 165.
- LIRA-DA-SILVA, R.M, CARVALHO, F. Epidemiology clinical study of envenoming by *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (SERPENTES; VIPERIDAE) in metropolitan region of Salvador, Bahia, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins, n. 4, p. 80-81. 1998.
- LIRA-DA-SILVA, R.M, CARVALHO, F. Estudo clínico e epidemiológico dos acidentes por *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE)". Publicação extra do Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguai, Nº 50, p. 76, 1999.
- LIRA-DA-SILVA, R.M., LIMA, D.S., ROSTÁN, G., BRAZIL, T.K. Variação Sexual da estimativa da quantidade de veneno inoculada por *Bothrops leucurus* (jararaca-do-rabo-branco). Publicação extra do Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguai, Nº 50, p. 77, 1999.
- LIRA-DA-SILVA, R.M, CARVALHO, F. Fatores biológicos determinantes na gravidade do envenenamento por *Bothrops leucurus*: idade, sexo e conteúdo estomacal da serpente. In: VI SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 2000. São Pedro. Resumos, São Pedro: Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2000a. p. 132.

- LIRA-DA-SILVA, R.M., LEITE, G.B., RODRIGUES-SIMIONI, L., PRADO-FRANCESCHI, J. Action of the *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae) venom on the neuromuscular junction. In: XIIIth WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2000. Paris. Resumos, Paris: International Society on Toxinology, 2000b. p. P281.
- LOMONTE, B. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. Göteborg, Sweden. 1994. 87 p. Dissertação PhD (Clinical immunology). Department of Clinical Immunology, University of Göteborg, Sweden.
- LOMONTE, B., GENÉ, J.A., GUTIERREZ, J.M., CERDAS, L. Estudio comparativo de los venenos de serpientes cascabel (*Crotalus durissus terrificus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. Toxicon, v. 21, p. 379-384. 1983.
- LOMONTE, B., GUTIERREZ, J.M. La actividad de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. Revista de Biología Tropical, v. 31, n. 1, p. 37-40. 1983
- LÓPEZ-LOZANO, J.L., MUNIZ, E.G., BÜHRHEIM, P.F. Intrasubspecific variations in the biological properties of venoms of adults rattlesnakes (*Crotalus durissus ruruima*) from Roraima state, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 140. 1997a.
- LÓPEZ-LOZANO, J.L., MUNIZ, E.G., BÜHRHEIM, P.F. A comparative study of biological properties of white venoms from juvenile and adult rattlesnakes (*Crotalus durissus ruruima*) from Boa Vista (Roraima state, Brazil). J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 141. 1997b.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FAAR, A.L.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., n. 193, p. 265-275, 1951.
- MARKLAND, F.S.. Snake venom and the hemostatic system. Toxicon, Oxford, v. 36, n. 12 1749-1800. 1998.

- MANDELBAUM, F.R., REICHL, A.P., ASSAKURA, M.T. Hemorrhagic factors from venoms of two species of *Bothrops* snakes. In: ACIESP. Toxinas Protéicas: anais do XII SIMPÓSIO ANUAL DA ACIESP sobre toxinas protéicas, 1988, Campinas.
- MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A., CARDOSO, J.L.C., SANO-MARTINS, I., CHUDZINSKI, A.M., SANTORO, P., MORENA, P., TOMY, S.C., ANTÔNIO, L.C., MIHARA, H., KELEN, E.M. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). Thrombosis and Haemostasis, Stuttgart, v. 63, n. 3, p. 449-453. 1990.
- MEBS, D., OWNBY, C.L. Myotoxic components os snake venoms: their biochemical and biological activities. Pharmac. Ther., v. 48, p. 223-236. 1990.
- MEIER, J. Individual and age-dependent variation in the venom of fer-de-lance (*Bothrops atrox*). Toxicon, v. 24, n. 1, p. 41-46. 1986.
- MEIER, J., THEAKSTON, D.G. Approximate LD₅₀ of snake venoms using eight to ten experimental animals. Toxicon, Oxford, v. 24, n. 4, p. 395-401. 1986.
- MINTON, S.A., WEINSTEIN, S.A. Geographical and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). Toxicon, v. 24, n. 1, p. 71-80. 1986.
- MONTEIRO, R.Q., YAMAMOYE, N., CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A., BON, C., ZINGALI, R.B. Seasonal pattern of bothrojaracin isoforms produced by individual (*Bothrops jararaca*) snakes. J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 157. 1997.
- MORENO, R.A. Estudo dos efeitos locais induzidos pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca-pintada). Neutralização de efeitos pelo soro antibotrópico comercial. Campinas. Dissertação de Mestrado (Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. 1991. p. 90.
- MOURA-DA-SILVA, A.M. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, v. 3, p. 3-7. 1992.

- MUKHERJEE, A.K, GHOSAL, S.K., MAITY, C.R. Some biochemical properties of Russel's viper (*Daboia russelli*) venom from Eastern India: correlation with clinico-pathological manifestation in Russell's viper bite. Toxicon, v. 38, p. 163-175. 2000.
- NAHAS, L., KAMIGUTI, A.S., BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. Thromb. Haem., v. 41, n. 2, p. 314-328. 1979.
- NISHIOKA, S.A., SILVEIRA, P.V.P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lace-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. Am. J. Trop. Med. Hyg., USA: v. 47, n. 6, p. 805-810. 1992.
- OSHAKA, A. Haemorrhagic necrotizing and edema-forming effects of snakes venoms. In: LEE, C.Y. Snakes venoms. Handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer-Verlag, v. 52, 1979. P. 480-537.
- OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, haemorrhage toxins and dermonecrotic factors. In: Handbook of toxinology. SHIER, MEBS, W.T. ed. New York: Marcel Dekker, p. 602-654. 1990.
- OWNBY, C.L., BJARNASON, J., TU, A.T. Haemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of haemorrhage induced by three purified toxins. Amer. J. Pathol., n. 93, p. 201-218. 1978.
- OWNBY, C.L., COLBERG, T.R., ODELL, G.V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. Toxicon, v. 22, n. 2, p. 227-233. 1984.
- PERRONE, M.A.L., SILES-VILLAROEL, M., FURTADO, M.F.D. Estudo comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, procedentes do estado de São Paulo e do estado do Paraná com algumas espécies morfológicamente duvidosas. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 25-32. 1989.

- PINHEIRO, J.R., BINDÁ, L.W., DOS SANTOS, M.C. Individual variation of the biological activities of *Crotalus durissus ruruima* venoms. J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 143. 1997.
- PIRKLE, H., THEODOR, I. Thrombin-like enzymes from snake venoms. In: TU, A. Reptile venoms and toxins. Handbook of natural toxins. New York, Marcel Dekker, 1991. v. 5, cap. 7, p. 225-252.
- PONTES, M.M., VERLARDE, D.T., GUARNIERI, M.C. Comparison of the neutralization capacity of polyvalent *Bothrops* (commercial) and monovalent *B. erythromelas* antivenoms. In: REUNIÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO BUTANTAN, 2000. São Paulo. Resumos, São Paulo: Fundação Instituto Butantan, 2000. p. 132.
- PORTO, M., TEIXEIRA, D.M. *Bothrops leucurus* (white-tailed lancehead). Herpetological Review, v. 26, n. 3. p. 156. 1995.
- PRIANTI, A.C.G., LIRA-DA-SILVA, R.M., PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L., LEITE, G.B., COGO, J.C. Efeitos do veneno de *Bothrops leucurus* em músculo *Biventer cervicis* de ave. In: VI SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 2000. São Pedro. Resumos, São Pedro: Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2000a. p. 163.
- PRIANTI, A.C.G., PACHECO-SOARES, C., SILVA, N.S., LIRA-DA-SILVA, R.M.; PRADO-FRANCESCHI, J., RODRIGUES-SIMIONI, L., CRUZ-HÖFLING, M.A., LEITE, G.B., COGO, J.C. Effect of *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (white-tailed jararaca) venom in the chick *Biventer cervicis* nerve-muscle preparation. In: XIIIth WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2000. Paris. Resumos, Paris: International Society on Toxinology, 2000b. p. P284.
- PUORTO, G. Serpentes brasileiras de importância médica. In: SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. 2^a ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 1992. p.143-148.

- QUEIROZ, L.P., MORITZ, R.D. Acidente botrópico em Florianópolis. Arq. Catarinenses de Medicina, Florianópolis, v. 18, n. 3, p. 163-166, jul/set. 1989.
- RIBEIRO, L.A., JORGE, M.T. Epidemiologia e quadro clínico dos pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 436-442. 1990.
- RODRIGUES, D.S., MACHADO, M.A. Poisonous animals: a study of human accidents in State of Bahia, Brazil - Part II: ophidian accidents. Vet. Hum. Toxicol, n. 29(Suppl. 2), p. 76-78. 1987.
- RODRIGUES, D.S., TELES, A.M.S., MACHADO, M.A., VARGENS, M.M.L., NASCIMENTO, I.M., PLANZO, T.M.P. Ofidismo na Bahia: um problema de saúde pública. Rev. Soc. Bras. Toxicologia, Salvador, v. 1, n. 1, p. 23-25. 1988.
- RODRIGUES-SIMIONI, L., BORGESSE, N., CECCARELLI, B. The effects of *Bothrops jaracussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. Neuroscience, vol. 10, n. 2, p. 475-489. 1983.
- RODRIGUES, V.M., SOARES, A., MANCIN, A.C., FONTES, M.R.M., HOMSI-BRADEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. Comp. Biochem. and Physiology, part A, n. 121, p. 215-222. 1998.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites. In: BÜCHERL, W., BUCKLEY, E.E. eds. Venoms animals and their venoms. Academic Press: New York, Vol. II, p. 346-384. 1971.
- SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ, M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-COTTA, G., DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American snakes. Toxicon, Oxford, v. 30, n. 1, p. 95-103. 1992.

- SANTORO, M.L., SOUSA E SILVA, M.C.C., GONÇALVES, L.R.C., SANTOS, S.M.A., FERREIRA, I.L.L., SAIKI, M., PERES, C.A., SANO-MARTINS, I.S. Comparison of biological activities of three subspecies (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*) of the South American rattlesnakes. J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 142. 1997.
- SANTOS, M.C., FERREIRA, C.L., DIAS-DA-SILVA, W., FURTADO, M.F.D. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus* comparados con el veneno de *Crotalus durissus ruruima*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. Toxicon, Oxford, v. 31, n. 11, p. 1459-1469. 1993.
- SASA, M. Diet snake venom evolution: can local selection alone intraspecific venom variations?. Toxicon, Oxford, v. 37, p. 95-103. 1999.
- SILES-VILLAROEL, M., ROLIM-ROSA, R., FURLANETTO, R.S., ZELANTE, F. Estudio electroforético em "cellogel" de venenos do gênero *Bothrops*. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, n. 37, p. 83-90. 1973.
- SILES-VILLAROEL, M., ROLIM-ROSA, R., ZELANTE, F., GUIDOLIM, R. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, n. 42/43, p. 311-323. 1978/79a.
- SILES-VILLAROEL, M., ROLIM-ROSA, R., ZELANTE, F., FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, n. 42/43, p. 325-336. 1978/79b.
- SOARES, A.M. *ET AL.* Polyacrylamide gel electrophoresis as a tool for the taxonomic identification of snakes from the Elapidae and Viperidae families. J. Venom. Anim. Toxins, Botucatu, n. 2, p. 138-142. 1998.
- STOCKER, K.F. Medical use of snake venom proteins. Florida: CRC press, Inc. 1990. 272p.

- STRYDOM, D.J. The evolution of toxins found in snake venoms. *In: LEE, C.Y. Snake venoms. Handbook of experimental pharmacology.* Vol. I. 258-271p. Berlin: Springer-verlag, 1979.
- TAN, N.H., PONNUDURAI, G. Comparative study on the electroforetic patterns of the snake venoms. *Comp. Bioquem. Physiol.*, v. 102B, n. 1, p. 103-109. 1992.
- TEIXEIRA, C.F.P., CURY, Y., JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platet activating factor (PAF). *Toxicon*, v. 32, n. 4. P. 419-426. 1994.
- THATTASSERY, E., CALIL-ELIAS, S., MELO, P.A. Effect of dose and volume of na intramuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase activity in mice. *In: REUNIÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO BUTANTAN, 2000.* São Paulo. *Resumos*, São Paulo: Fundação Instituto Butantan, 2000. p. 86.
- THEAKSTON, R.D.G., REID, H.A. Development of simples standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. W. Org.*, v. 61, n. 6, p. 949-996. 1983.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, n. 9, p. 4350-4354. 1979.
- TU, A. Tissue damaging effects by snake venoms: hemorrhage and myonecrosis. *In: TU, A. Reptile venoms and toxins.* Handbook of natural toxins. New York, Marcel Dekker, 1991. v. 5, cap. 11, p. 297-347.
- VARGAFIT, B.B., BHARGAVA, N., BONTA, I.L. Haemorrhagic and permeability increasing effects of *Bothrops jararaca* and other Crotalidae venoms as related to amine or kinin release. *Agents and Actions*, v. 4, n. 3, p. 163-168, 1974.
- VASCONCELOS, C.M.L. Estudo da peçonha de *Bothrops erythromelas*: caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição. Dissertação de Mestrado (Biofísica). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 1996. p. 112.

- VASCONCELOS, C.M.L., SAIKI, R., LIRA-DA-SILVA, R.M., GUARNIERI, M.C. Neutronic activation analysis of *Bothrops erythromelas* e *Bothrops leucurus* venoms. Toxicon, Oxford, v. 34, n. 1, p. 30-31. 1996.
- VIDAL, N. Phylogenetics of advanced snakes suggest a highly dynamic evolution of the venomous apparatus. In: XIIIth WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY, 2000. Paris. Resumos, Paris: International Society on Toxinology, 2000. p. L144.
- VIEIRA, E.G.J., ROLIM-ROSA, R., IZUKA, H., FURTADO, M.F.D., FERNANDES, W. Influências sazonal e do processo de extração sobre a produção, toxicidade do veneno e sobrevida de *Bothrops jararaca*. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 29-35. 1988.
- VITAL BRAZIL, O. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. O Hospital, v. 68, n. 4. p. 909-950. 1965.
- VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: COLBERT. Farmacodinâmica. 1987. p. 1044-1074
- VITAL BRAZIL, O. Mechanisms of neuromuscular blockade and venom toxins. In: REUNIÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO BUTANTAN, 2000. São Paulo. Resumos, São Paulo: Fundação Instituto Butantan, 2000. p. 29.
- WEIL, C.S. Tables for convenient calculation of median-effective doses (LD₅₀ or ED₅₀) and instructions for their use. Biometrics, p. 249-263. 1953.
- WILLEMSE, S.T. Individual variation in snake venom. Comp. Biochem. Physiology, v. 61B, p. 553-555. 1978.
- WILLIAMS, S.T., WHITE, J. Variation in the composition of the venom a single specimen of *Pseudonaja textilis* (common brown snake) over one year. Toxicon, Oxford, v. 30, n. 2, p. 202-206. 1992.

- WHO. Progress in characterization of venoms and standartization of antivenom. Geneva: Who Offset Publication, n. 59. 1981.
- WUCHERER, O. Sobre a mordedura das cobras venenosas e seu tratamento. *Gazeta Médica da Bahia*, Salvador, ano I, n. 21, p. 241-243. 1867.
- WÜSTER, W., GOLAY, P., WARRELL, D.A Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, nº 2. Toxicon, v. 36, n. 2, p. 299-307. 1998.
- YAMAKAWA, M., NOZAKI, M., HOKAMA, Z. Fractionation sakishima-fabre (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fraction. In: OSHAKAM A., HAYASHI, K., SAWAI, Y eds. Animal, palnt and microbial toxins. Plenum Press: New York, p. 119-165. 1976.
- ZAMUNÉR, S.R. Capacidade neutralizante de antiveneno comercial sobre as atividades neurotóxica e miotóxica de venenos botrópicos. Campinas. Dissertação de Mestrado (Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. 1997. p. 98.
- ZAPPELLINI, A. Estudos bioquímico e farmacológico da peçonha de *Bothrops erythromelas*. Campinas. Dissertação de Mestrado (Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. 1991. p. 57.