



ESTUDO DOS EFEITOS LOCAIS INDUZIDOS PELO VENENO
DE *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada).
NEUTRALIZAÇÃO DE EFEITOS PELO SORO ANTIBOTRÓPICO
COMERCIAL.

*Este exemplar corresponde à redação
final da tese defendida pela
candidata*

RONILSON AGNALDO MORENO

*e aprovada pela
comissão julgadora*
Franciedi
15/05/91

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

M815e
14259/BC

19.01.03942

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas, área de
Fisiologia

Orientadora:

Dra. Júlia Prado-Franceschi

Prof. adjunto do Depto de Farmacologia - FCM.†

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
Campinas - São Paulo - 1991

AGRADECIMENTOS

Agradeço a:

Profa Dra Julia Prado-Franceschi pela sábia orientação científica e compreensão nos muitos momentos difíceis.

Prof. Dr. José Maria Gutiérrez do Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica) por me receber e participar na orientação deste trabalho.

Prof. Dr. Ernesto José Dottaviano pelo grande incentivo e colaboração em todos os momentos.

Docentes e funcionários do Departamento de Fisiologia pela atenção e colaboração.

Docentes e funcionários do Centro de Controle de Intoxicações- H.C.- UNICAMP pela constante ajuda e incentivo.

Profa Dra Maria Alice Cruz-Hofling do centro de microscopia eletrônica I.B. (UNICAMP) pelo auxílio nos estudos envolvendo morfologia.

Biólogo José Carlos Cogo pelo companheirismo e incentivo.

Biólogo Gildo Bernardo Leite pelo auxílio na execução de técnicas complexas e a amizade demonstrada.

Biólogo Stephen Hyslop pela importante ajuda na busca e tradução de textos e pela grande amizade.

Bióloga Maria Aparecida Selleghein e demais funcionários do departamento de Patologia Clínica pela ajuda concedida.

Solange Aparecida dos Santos Basso e Gislaine Elias Alipio, secretárias do departamento de farmacologia, bem como aos demais funcionários pelo grande coleguismo.

Aos funcionários do Instituto Clodomiro Picado - Universidade de Costa Rica pelo carinho e atenção.

Aos amigos do Instituto Butantan pela constante colaboração.

A todos que de alguma forma participaram deste trabalho.

Dedico este trabalho à
minha família.

CONTEÚDO

	página
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVO.....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
1 Veneno e soros antiofídicos.....	12
2 Animais.....	13
3 Determinação de atividades induzidas pelo veneno.....	14
3.1 Determinação da toxicidade.....	14
3.2 Detrminação da atividade hemorrágica.....	15
3.3 Determinação da atividade edematizante.....	16
3.4 Alterações da permeabilidade capilar.....	17
3.5 Determinação da atividade coagulante.....	18
3.6 Dterminação da atividade proteolítica.....	20
3.7 Atividade desfibrinante.....	21
3.8 Determinação da atividade hemolítica indireta....	22
3.9 Determinação da atividade miotóxica.....	24

4	Neutralização com pré-incubação.....	25
4.1	Toxicidade.....	26
4.2	Atividade hemorrágica.....	28
4.3	Atividade edematizante.....	30
4.4	Atividade coagulante.....	32
4.5	Atividade hemolítica indireta.....	34
4.6	Atividade miotóxica.....	36
5	Neutralização com inoculação independente.....	38
5.1	Toxicidade.....	39
5.2	Atividade hemorrágica.....	41
5.3	Atividade edematizante.....	43
6	Estudos imunológicos.....	45
6.1	Obtenção e purificação de IgG.....	45
6.2	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	47
7	Preparação do músculo biventer cervicis de pintainho.....	49

8	RESULTADOS.....	51
8.1	Toxicidade e neutralização da toxicidade.....	51
8.2	Atividade hemorrágica e sua neutralização.....	52
8.3	Atividade edematizante e sua neutralização.....	54
8.4	Alterações sobre a permeabilidade capilar.....	57
8.5	Atividade coagulante e sua neutralização.....	58
8.6	Atividade proteolítica.....	60
8.7	Atividade desfibrinante.....	61
8.8	Atividade hemolítica indireta e sua neutralização.....	62
8.9	Atividade miotóxica e sua neutralização.....	64
8.10	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	73
8.11	Ação do veneno sobre a junção neuromuscular.....	74

9	DISCUSSÃO	76
10	CONCLUSÕES	83
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

INTRODUÇÃO

Serpentes são animais predadores que habitam grande parte do globo terrestre. Dentre as diversas famílias existentes, algumas possuem aparelho apropriado para inoculação de substâncias tóxicas, com as quais paralisam ou até matam suas presas. Estes animais são conhecidos como venenosos ou peçonhentos.

No Brasil, são quatro os gêneros de serpentes que podem causar envenenamento com sintomatologia clínica importante.

a) *Micrurus* ou corais verdadeiras. Possuem dentição do tipo proteróglifa, com baixa incidência de vítimas. Sua peçonha é extremamente tóxica, tendo como principal característica a ação neurotóxica.

b) *Lachesis*, (surucucu, surucutinga, pico de jaca ou rabo de fogo). São animais com dentição do tipo solenóglifa, sendo também as maiores serpentes venenosas do Brasil. Sua distribuição geográfica compreende sobretudo as regiões norte e centroeste, embora também existam na zona da mata atlântica. Os acidentes causados por animais deste gênero são semelhantes aos do gênero *Bathrops*.

c) *Crotalus* (representado no Brasil por uma única espécie) , composto pelas cascavéis, distinguíveis das demais serpentes por possuírem um chocalho (guizo) na região terminal da cauda. Sua dentição é do tipo solenóglifa. As cascavéis são encontradas em regiões de temperatura elevada e seca, como na região nordeste, centroeste e sul. Seu veneno, quando inoculado pode causar na vítima efeitos sistêmicos importantes, tais como: insuficiência renal, prolongamento no tempo de coagulação sanguínea e predominantemente a ação neurotóxica, com seus sintomas característicos, que são a principal causa de morte precoce da vítima.

d) *Bothrops* (jararaca, urutu, caissaca, etc.),
dentição do tipo solenóglifa, amplamente distribuídas
por todo o território brasileiro, inclusive fora do
continente, como é o caso da *Bothrops insularis* que
habita exclusivamente a ilha da Queimada Grande no
litoral paulista

Os animais do gênero *Bothrops* são responsáveis
por cerca de 88% de todos os acidentes ofídicos no
Brasil. O veneno destes animais é capaz de induzir
efeitos clinicamente importantes ligados à ação
sistêmica, caracterizada por coagulopatia de consumo,
insuficiência renal, hemorragia e choque
cardiovascular e efeitos locais traduzidos por
volumoso edema, que pode atingir vários segmentos do
membro afetado, e inclusive outros membros. Além do
edema é comum o desenvolvimento de áreas necróticas
próximas ao local da picada, que em alguns casos,
podem levar à amputação do membro comprometido, estes
efeitos podem estar agravados pelo uso comum e
indiscriminado de torniquete.

A necrose induzida por vários venenos, já referida no começo do século por Vital Brazil e também por Vellard foi estudada por Homma & Tu, em 1971, sugerindo que a ação miotóxica pode ocorrer por dois mecanismos conhecidos: a) direto, consistindo na ação de miotoxinas diretamente sobre a fibra muscular, causando-lhe danos, como demonstrado por Harris et al, 1980 e Gutiérrez et al, 1984; e b) indireto, por mecanismos que levam à isquemia da musculatura e, como consequência, sua necrose (Dwnby 1982; Gutiérrez et al, 1984).

A partir de observações feitas por Ebashi et al(1959), demonstrando que os níveis séricos da enzima creatina fosfoquinase (CK) estavam aumentados em pacientes portadores de distrofia muscular progressiva, pesquisadores se propuseram a avaliar a lesão muscular produzida pela ação de venenos tendo como parâmetro os níveis séricos desta enzima (Gutiérrez et al, 1980; Fabiano & Tu, 1981; Nakada et al, 1984). Estes autores demonstraram a existência de importante correlação entre os níveis séricos de CK e o sofrimento das fibras musculares no envenenamento ofídico experimental.

Em 1987 Gutiérrez et al descreveram novo método para avaliar a lesão muscular, baseando-se na quantificação de CK residual do músculo injetado com a peçonha.

Métodos histológicos tem sido utilizados para avaliação de mionecrose em ofidismo (Homma & Tu, 1971; Ownby et al, 1984; Queiroz et al 1984,1985), demonstrando e classificando a mionecrose induzida por peçonhas ofídicas.

Segundo Mebs (1982) a ação miotóxica de peçonhas deve ser avaliada por mais de um critério, uma vez que podem ocorrer alterações de um parâmetro sem que o mesmo ocorra em outros.

A neutralização do efeito mionecrótico induzido pelas peçonhas de *Crotalus viridis viridis*, *Crotalus atrox* e *Crotalus horridus* tem sido estudado por vários pesquisadores (Ownby et al, 1983,1986, 1988, 1990,).

Gutiérrez et al(1980) realizaram estudos sobre a neutralização de mionecrose induzida por veneno de *Bothrops asper*, pelo soro polivalente produzido na Costa Rica.

A formação de edema após acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* é comum, e mesmo com o tratamento soroterápico correto, torna-se muito difícil a sua regressão. Estudos sobre alterações na permeabilidade vascular tem sido realizados (Ohtani & Takahashi 1983; Moreno et al 1990), demonstrando claramente a correlação existente entre permeabilidade vascular e evolução do edema.

A hemorragia (local e sistêmica) pode ser uma das consequências do envenenamento por serpentes sul americanas (Rosenfeld 1971), bem como por animais de outras regiões do planêta (Ohsaka et al, 1979; Ownby et al, 1982).

Houssay (1930) sugeriu que a atividade hemorrágica dos venenos seria induzida pela ação de enzimas proteolíticas, enquanto Queiroz et al (1985) demonstraram não haver relação entre as atividades hemorrágica e caseinolítica para um fator hemorrágico isolado a partir do veneno de *Bothrops jararaca*.

A atividade hemorrágica direta dos venenos ofídicos é atribuída a proteínas denominadas fatores hemorrágicos ou hemorraginas, que tem sido isoladas e caracterizadas. A viriditoxina (Fabiano & Tu, 1981) é uma proteína de alto peso molecular (115.000 d) isolada da peçonha de *Crotalus viridis viridis* e que exibe atividades miotóxica e hemorrágica. Mandelbaum et al (1984) caracterizaram, a partir do veneno de *Bothrops neuwiedi*, dois fatores hemorrágicos, denominados NHFa e NHFb (neuwiedi hemorrhagic factor) e determinaram que NHFa possui peso molecular igual a 46.000 daltons, enquanto NHFb possui 58.000 daltons.

Esta atividade hemorrágica direta é complementada pelos efeitos de outros componentes do veneno capazes de alterar a permeabilidade da microcirculação por liberação de mediadores químicos que ativam também as plaquetas e o sistema plasmático de coagulação.

Vital Brazil e Excell demonstraram a ação facilitatória pré-juncional da crotoxina, uma fração isolada a partir do veneno da cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*). Estudos realizados por Rodrigues-Simioni *et al* (1983) mostram o efeito bloqueador da peçonha da *Bothrops jararacussu*, ambos demonstrando a importância do estudo dos efeitos de peçonha sobre a junção neuromuscular.

A *Bothrops neuwiedi pauloensis* (foto 1), descrita por Amaral em 1925 é conhecida popularmente como jararaca do rabo branco ou jararaca pintada e habita várias regiões do estado de São Paulo. Estudos preliminares com a peçonha desta serpente mostraram sua ação tóxica, bem como outros efeitos induzidos pela inoculação da peçonha, comportando-se como uma *Bothrops* típica; sendo o seu envenenamento caracterizado pelo grande sofrimento ao acidentado. Além disso observações feitas junto a pacientes picados por estes animais e atendidos pelo Centro de Controle de Intoxicações do Hospital das Clínicas, pertencente à UNICAMP, nos levaram a desenvolver este estudo.

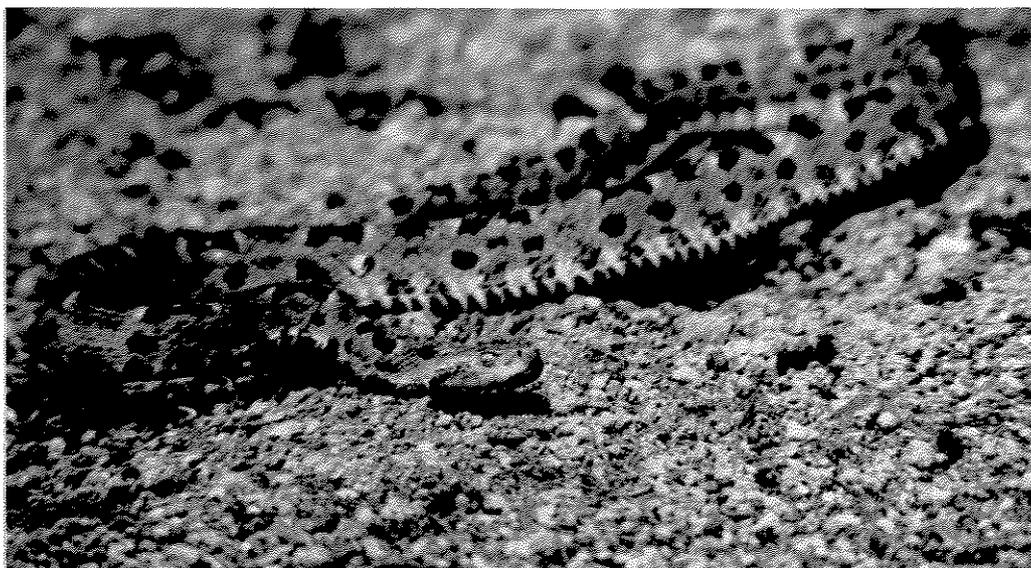


Foto 1 - *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Amaral, 1925)

OBJETIVO

Este trabalho tem como principal objetivo avaliar a capacidade neutralizante do soro antibotrópico sobre diversos efeitos induzidos pelo veneno da *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) em condições experimentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- VENENO e SOROS ANTIOFÍDICOS

O veneno foi obtido através de extração manual realizada em seis animais fornecidos e identificados pelo serviço de Herpetologia do Instituto Butantan.

As serpentes foram mantidas em caixas de madeira, sendo colocados dois exemplares por caixa. A extração foi feita em sistema de pool e imediatamente a seguir o veneno foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos a 5°C, o sobrenadante foi colocado em dessecador contendo silicagel sob pressão reduzida por bomba de vácuo durante 24 horas e em câmara fria (6°C).

Após sofrer este processo o veneno foi guardado em frasco de vidro âmbar, em dessecador e na geladeira, sendo dali retirado apenas para o preparo das soluções.

Neste trabalho foram utilizados soros antiofídicos provenientes de duas instituições sendo: a- soro antibotrópico comercial, produzido e gentilmente cedido pelo Instituto Butantan, este soro foi utilizado em todos os experimentos de neutralização e b- soro antiofídico polivalente produzido e gentilmente cedido pelo Instituto Clodomiro Picado - Costa Rica, que foi utilizado apenas no experimento com a técnica de ELISA. Além deste dois soros foi obtida IgG anti *B. n. pauloensis*, que foi utilizada apenas no teste de neutralização de mionecrose.

2- ANIMAIS

Foram utilizados camundongos swiss com 20 gramas (+/- 2g) e coelhos (2 a 3 kg) fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, além de camundongos fornecidos pelo Biotério do Instituto Clodomiro Picado - Costa Rica.

3 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES INDUZIDAS PELO VENENO

3.1 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE

A toxicidade foi avaliada em termos de DL₅₀ que foi realizada pelo método PROBITO, onde cinco grupos de oito animais foram injetados por via intraperitoneal com doses crescentes de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, dissolvidos em solução fisiológica e em volume constante de 0,5 ml. Os animais foram observados por período de 72 horas após a inoculação do veneno. Os cálculos foram feitos tendo como valor final o número de animais mortos após o período de observação.

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Para a determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH) utilizo-se método similar ao descrito por Kondo et al, 1960. Camundongos foram submetidos a tricotomia da região ventral, onde 3, 9 e 27ug de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* dissolvidos em 50ul de PBS($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,59g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,168g/l; NaCl 0,82g/l) foram inoculados por via intradérmica. Duas horas após este procedimento, os animais foram sacrificados com éter e a pele foi retirada e coberta com uma placa de vidro. Sobre esta placa desenhava-se o contorno da área hemorrágica, colocando-a a seguir sobre papel milimetrado para obtenção da área em mm^2 , transformando-se estes valores em área equivalente à um círculo, através de expressão matemática adequada.

A dose mínima hemorrágica foi determinada como sendo aquela com capacidade de induzir uma área hemorrágica com diâmetro de 10mm.

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EDEMATIZANTE

A determinação da atividade edematizante foi obtida pelo método descrito por Yamakawa et al, 1976. 50ul de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (0,1; 0,3; 0,9 e 2,7ug) foram inoculados por via subplantar na pata posterior direita, inoculando-se ainda 50ul de PBS na pata posterior esquerda, que serviu de controle. Nos tempos 0,5; 1; 2; 3; 6 e 24 horas o grupo de animais correspondentes a cada concentração de veneno foi sacrificado por deslocamento cervical, as patas posteriores foram seccionadas na altura da primeira articulação e imediatamente pesadas em balança analítica METTLER.

O edema foi determinado pelo aumento percentual do peso da pata inoculada com veneno em relação ao peso da pata controle. A dose edematizante efetiva foi determinada como sendo aquela capaz de induzir aumento de 60% do peso da pata no tempo de 30 minutos.

3.4 ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE CAPILAR

Para determinação das alterações causadas sobre a permeabilidade capilar utilizamos dos mesmos animais inoculados para o experimento sobre a formação de edema. Os camundongos foram previamente tratados com Azul de Evans, e após a pesagem, as patas foram reduzidas a fragmentos pequenos que foram colocados em tubos contendo 4,0 ml de formamida P. A. (MERCK). Durante 48hs os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C para que ocorresse a extração do corante, a fase líquida foi então separada e teve sua absorbância determinada em comprimento de onda igual a 619 nm. Os tempos, bem como as doses escolhidas para este teste foram as mesmas utilizadas para o experimento com edema.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE

A determinação da atividade coagulante induzida pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* sobre o plasma citratado foi realizada pelo método descrito por Theakston & Reid (1983).

Sangue de carneiro foi colhido sobre citrato de sódio 3,8% (10% volume/volume) como anticoagulante. O sangue foi então centrifugado por 15min. a 2500 rpm e o plasma foi obtido retirando-se a fase superior do centrifugado. 200ul de plasma foram colocados em flaconetes plásticos e termostatizados no próprio fibrômetro (fibrômetro BBL, Maryland USA). 3 a 5 minutos após, 100ul de solução de veneno previamente incubada por 30 minutos a 37°C foram adicionados e o cronômetro acionado simultaneamente (n=3). Ao formar-se o coágulo o cronômetro era paralisado automaticamente. Foram preparadas soluções de veneno com concentração de: A=1,0; B=0,5 e C=0,25 mg/ml, portanto a concentração final da reação foi: A=333; B=167 e C=83mg/ml.

Com a obtenção dos valores de tempo necessários para formação de coágulo pode se calcular a Dose Coagulante Mínima (DCM), determinada como sendo aquela capaz de induzir a formação de coágulo no tempo igual a 60 segundos.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para determinar a atividade proteolítica presente no veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram colocados 2,0 ml de solução de caseína 1% em tubos de ensaio, aos quais adicionava-se 1,0 ml de solução de veneno nas diversas concentrações (n = 3). Os tubos foram então levados ao banho-maria por 30 minutos a 37°C, Após este período de incubação, eram adicionados 4,0 ml de ácido tricloroacético (ATC 5%), agitando-se os tubos e mantendo-os em temperatura ambiente por mais trinta minutos, quando foram centrifugados por 15 minutos a 2500 rpm. Terminada a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com pipeta tipo Pasteur e teve seu valor espectrofotométrico avaliado em comprimento de onda de 280 nm.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DESFIBRINANTE

Para avaliação da atividade desfibrinante utilizou-se método descrito por Reid, 1966. Camundongos foram injetados com concentrações crescentes de veneno (2,5;5,0;10;15 e 20ug/animal) por via endovenosa e após 2 horas os animais foram sacrificados com éter, o tórax foi aberto e o coração exposto para que uma amostra de sangue fosse coletada diretamente do coração por punção cardíaca com pipeta tipo Pasteur. O sangue foi imediatamente colocado em tubos de ensaio e mantido a temperatura ambiente por duas horas, quando foi observada a presença ou não de coágulo nas amostras (n=4).

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA

A atividade hemolítica indireta foi avaliada pelo método descrito por Gutiérrez e colaboradores (1983). Placas de Petri foram preparadas, cada uma, com 25ml de Ágar a 1%(Ágar Purified Difco), 250ul de CaCl_2 (10mM), 300ul de gema de ovo(1:3 em PBS) e 300 ul de eritrócitos de carneiro previamente coletados em solução de Alsewer e lavados por três vezes com PBS imediatamente antes de sua utilização.

Após o resfriamento da placa de hemólise, foram feitos 12 orifícios em cada , pressionando-se um tubo de metal sobre o gel, de maneira a corta-lo, para em seguida retirar o pedaço de gel isolado através de sucção.

Cada uma das soluções de veneno (15,0; 7,5; 3,75; 1,88; 0,94; 0,47; e 0,23 ug/15 ul) foi testada colocando-se 15 ul desta no pocinho formado pela retirada do gel . As placas foram colocadas em câmara úmida por 20 horas a 37°C e, a seguir, o diâmetro do halo hemolítico formado pela ação do veneno que se difundiu no meio foi medido com uma régua comum, sendo que 3 mm correspondentes ao diâmetro do pocinho foram subtraídos para se chegar ao valor final (n=4).

3.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MIOTÓXICA

Para determinar a atividade miotóxica induzida pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram utilizados dois procedimentos:

a- Dosagem dos níveis séricos da enzima creatina fosfotransferase: Neste experimento utilizou-se método similar ao descrito por Nakada et al (1980). Camundongos foram inoculados com 70 ug(50 ul) de veneno na região correspondente ao músculo gastrocnêmio direito. Nos tempos correspondentes a 1, 3, 5 e 24 horas após a inoculação do veneno os animais tinham amostras de sangue retiradas através de punção do plexo orbicular com tubo de microhematócrito de onde, após centrifugação, foram retiradas amostras de plasma para determinar os níveis séricos de creatina fosfotransferase através de kits SIGMA e MERCK.

b- **Análise histológica:** Para a avaliação das alterações histológicas foi utilizado método semelhante ao descrito por Homma & Tu (1971). Imediatamente após a coleta de sangue de cada grupo (n=4), os animais eram sacrificados com éter e amostras do músculo injetado com veneno eram retiradas e fixadas em solução de Bouin alcoólico para posterior avaliação histológica, e inclusão do material em blocos de parafina, corte em micrótomo (cortes de aprox. 7micra) fixação em lâminas de vidro e coloração por Tricrômico de Masson e Hematoxilina e Eosina. O material foi avaliado sob microscopia óptica e fotografado.

4- NEUTRALIZAÇÃO COM PRÉ-INCUBAÇÃO

Foram preparadas mesclas contendo diferentes concentrações de soro antitoxínico comercial e concentração de veneno constante, de acordo com a atividade considerada. Todas as mesclas foram mantidas durante 30 minutos em banho-maria a 37°C . préviamente à sua inoculação nos animais.

4.1 TOXICIDADE

Foi escolhida como dose de desafio para a neutralização da toxicidade o valor correspondente a 4 DL₅₀, ou seja 7,28ug/g de camundongo (DL₅₀ = 1,82ug/g). Para este experimento foram utilizados camundongos swiss com peso entre 16 e 18 gramas, portanto a dose de desafio foi de 123,8ug/animal.

Níveis de neutralização foram escolhidos, mantendo-se a razão de 1,5, ou seja, as diluições foram realizadas mantendo-se esta razão entre elas.

Entendemos como nível de neutralização a quantidade de veneno que neutralizada por 1,0ml de soro, assim temos que nível 2 representa 2,0mg sendo neutralizados por 1,0ml de soro.

A tabela 1 mostra os níveis de neutralização utilizados neste experimento.

TABELA 1

tubo	soro(ul)	FBS(ul)	sol D(ul)	nível
1	619	3143	1238	2
2	413	3349	1238	3
3	275	3487	1238	4,5
4	183	3579	1238	6,75
5	---	3762	1238	contr

A solução D foi previamente preparada com concentração de 1,0mg/ml e o volume final foi de 5,0ml por tubo. Os animais foram inoculados de acordo com o método descrito para determinação da DL₅₀, sendo que para este experimento o número de animais tratados foi de 6 por nível.

4.2 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Após a determinação da DMH, foi escolhida como dose desafio para neutralização aquela capaz de induzir uma área hemorrágica com diâmetro equivalente a 20mm após 120 minutos de sua inoculação, portanto a dose de desafio foi igual a 26ug/50ul.

A solução A foi preparada com concentração de 5,2mg/ml.

Os valores da tabela foram escolhidos tendo como parâmetro inicial, 250ul de soro pré-incubado com 1mg de veneno. Fazendo-se as diluições seriadas obtivemos a tabela 2.

TABELA 2

tubo	solução A(ul)	soro(130ul)	PBS(ul)
1	100	1 : 1	770
2	100	1 : 2	770
3	100	1 : 4	770
4	100	1 : 8	770
5	100	-----	900

Obs: No tubo n5 foi colocado apenas veneno, servindo portanto como controle da atividade.

Grupos de 4 animais foram injetados e a avaliação da área hemorrágica foi feita de acordo com o método descrito anteriormente para determinação da atividade hemorrágica.

4.3 ATIVIDADE EDEMATIZANTE

Para esta atividade, a concentração de veneno escolhida como desafio foi aquela capaz de induzir edema com aumento de 60% da pata no período de 30 minutos, ou seja, 2 ug/pata.

Os cálculos para a neutralização da capacidade do veneno em induzir a formação de edema foram feitos adotando-se como 1:1 a relação inicial de neutralização, ou seja, 1 ml de soro antibotrópico com capacidade de neutralizar a atividade edematizante de 1 mg de veneno. A partir deste cálculo foram realizadas várias diluições do soro, mantendo-se inalterada a concentração do veneno (desafio), portanto, para o tubo 2 significa dizer que 500ul de soro estão neutralizando 1mg de veneno, e assim sucessivamente. O tubo nº 5 foi o controle da ação do veneno, uma vez que todos os animais tiveram a pata posterior esquerda inoculada com PBS e foram os próprios controles. A tabela 3 mostra como foram preparadas as amostras utilizadas.

TABELA 3

tubo	sol. B(ul)	soro(40ul)	PBS(ul)
1	100	1 : 1	860
2	100	1 : 2	860
3	100	1 : 4	860
4	100	1 : 8	860
5	100	-----	900

A solução B foi preparada com concentração de 400 ug/ml, portanto, quando os tubos eram preparados com volume final de 1,0 ml, a concentração de veneno era de 40 ug por tubo, ou seja, 2 ug/50 ul.

4.4 ATIVIDADE COAGULANTE

A neutralização da atividade coagulante induzida pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi realizada tendo-se como desafio 2 DCM, ou seja 1400 ug/ml (cada DMC corresponde a 700 ug/ml).

Os valores para a neutralização do veneno sobre a coagulação do plasma foram calculados a partir da razão 1:2. esta razão determina que 1,0 ml do soro neutraliza 2 mg de veneno. Diluições seguidas do soro foram realizadas, conforme a tabela 4, para observação da capacidade de neutralização deste efeito.

TABELA 4

tubo	sol.C (ul)	soro(700ul)	FBS(ul)
1	100	1 : 1	200
2	100	1 : 2	200
3	100	1 : 4	200
4	100	1 : 8	200
5	100	1 : 16	200
6	100	-----	900
7	---	1 : 1	300

Na tabela acima notar que os tubos n 6 e 7 são os controles de veneno e soro respectivamente.

4.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A neutralização da atividade hemolítica foi realizada utilizando-se como dose de desafio 2 μ g/pocinho, que é a concentração de veneno capaz de induzir a formação de um halo hemolítico de aproximadamente 15mm de diâmetro (n=8).

As seguintes diluições do soro antibotrópico foram preparadas:

sol A-	3,0ml de soro antibotrópico
sol B-	2,0ml de sol A + 1,0ml de PBS
sol C-	2,0ml de sol B + 1,0ml de PBS
sol D-	2,0ml de sol C + 1,0ml de PBS
sol E-	1,0ml de sol D + 1,0ml de PBS

Partindo das soluções acima pode-se então preparar os diversos níveis de neutralização, conforme mostra a tabela 5.

TABELA 5

tubo	sol(898ul)	sol F(ul)	nível
1	A	100	0,15
2	B	100	0,22
3	C	100	0,33
4	D	100	0,50
5	E	100	1,00
6	FBS	100	0,00

A solução F foi preparada contendo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* na concentração de 1,33mg/ml, e após o período de incubação das mesclas 15ul da solução de cada tubo foram aplicados por pocinho. O resultado da neutralização foi obtido seguindo-se a técnica anteriormente descrita para avaliação de hemólise. A Dose Efetiva 50% (DE₅₀) é determinada pela quantidade de soro necessária para diminuir em 50% o efeito induzido pelo veneno.

4.6 ATIVIDADE MIOTÓXICA

A neutralização da atividade miotóxica foi realizada tendo como desafio 70ug de veneno. O tempo escolhido para a observação da capacidade neutralizante foi de 3,0h após a inoculação do veneno. A escolha do tempo está realacionada com o pico observado nos valores dos níveis séricos da enzima CK, uma vez que foi realizada a avaliação destes níveis ao longo do tempo

O procedimento para preparação das mesclas neutralizadas de veneno está demonstrado na tabela 6.

TABELA 6

tubo	soro 2X(700ul)	sol.G(ul)	PBS	nível
1	1 : 1	100	200	1
2	1 : 2	100	200	2
3	1 : 4	100	200	4
4	1 : 8	100	200	8
5	1 : 16	100	200	16
6	-----	100	900	0
7	-----	---	1000	-

A solução G foi preparada com concentração de 14mg/ml de veneno. O soro 2X é o próprio soro antibotrópico comercial produzido pelo Instituto Butantan, que foi liofilizado e teve seu conteúdo ressuspensão em água destilada na metade do volume inicial.

5- NEUTRALIZAÇÃO COM INOCULAÇÃO INDEPENDENTE

A neutralização com inoculação independente consiste em inocular-se o animal com veneno pela via escolhida, e, imediatamente a seguir injetar por via endovenosa a solução contendo concentrações variadas da substância cuja ação neutralizante está sendo testada. Em nossos experimentos foi mantida constante a concentração de veneno em cada teste, variando-se a concentração da solução de neutralização, contudo mantendo-se também constante o volume injetado por via endovenosa (200ul).

5.1 TOXICIDADE

Para a neutralização da toxicidade foi utilizada a mesma dose desafio do experimento com pré incubação, ou seja, 7,28ug/g de camundongo, que equivale a 4 DL₅₀. Neste teste foram utilizados animais com peso médio de 20g, portanto a dose desafio foi de 145,6ug/animal.

Os animais foram inoculados com 0,5ml(145,6ug) de veneno por via intraperitoneal e, imediatamente a seguir, através da veia caudal, 200ul de solução contendo soro antitoxinico em diversas concentrações foram administrados. Os resultados foram obtidos pelo método descrito para obtenção dos valores da DL₅₀.

As diluições utilizadas, bem como os níveis de neutralização estão descritos na tabel 7.

TABELA 7

tubo	nível	soro(2912ul)	PBS(ul)
1	1	1 : 1	1088
2	2	1 : 2	1088
3	4	1 : 4	1088
4	8	1 : 8	1088
5	16	1 : 16	1088

O controle da ação do veneno foi feito com a inoculação deste por via intraperitoneal e 200ul de FBS pela veia caudal.

5.2 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A neutralização da atividade hemorrágica foi feita tendo como dose desafio 26ug de veneno. Imediatamente após a inoculação de 50ul (26ug) de solução de veneno os camundongos foram tratados com soro antibotrópico, por via endovenosa. A concentração de soro sofreu alterações de acordo com a tabela 8. O processo utilizado para a avaliação da área hemorrágica foi o mesmo descrito anteriormente.

TABELA 8

tubo	nível	260ul(soro 2X)	FBS(ul)
1	0,5	1 : 1	1740
2	1,0	1 : 2	1740
3	2,0	1 : 4	1740
4	4,0	1 : 8	1740
5	8,0	1 : 16	1740

O controle da ação do veneno foi realizado com a inoculação normal do veneno, tendo 200ul de PBS injetados por via endovenosa. O controle da ação do FBS foi feito com a inoculação de 50ul desta solução, de maneira semelhante àquela do veneno. A avaliação da atividade para cada um dos casos foi realizada da mesma forma como descrito anteriormente.

5.3 ATIVIDADE EDEMATIZANTE

A neutralização da atividade edematizante pela inoculação independente de soro foi realizada, tendo como dose desafio 2 μ g por pata e o volume inoculado de solução de veneno foi de 50 μ l, seguindo os mesmos critérios da técnica já descrita. Imediatamente após a inoculação de veneno pela via subplantar, os animais foram tratados com soro antitoxinotrópico em concentrações variadas, os resultados foram avaliados conforme descrito anteriormente.

Os níveis de neutralização, bem como as diluições do soro estão descritos na tabela 9.

TABELA 9

tubo	nível	soro(400ul)	PBS(ul)
1	0,5	1 : 1	1400
2	1,0	1 : 2	1400
3	2,0	1 : 4	1400
4	4,0	1 : 8	1400
5	8,0	1 : 16	1400

O controle da ação do veneno foi feito com a inoculação do veneno pela via subplantar e com injeção endovenosa de 200ul de PBS. O controle de cada animal foi feito com a inoculação de 50ul de PBS na pata contralateral.

6 ESTUDOS IMUNOLÓGICOS

6.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IgG

Dois coelhos foram imunizados com doses crescentes de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (0,5; 1,0; 1,0 e 2,0mg), utilizando-se adjuvante completo de Freund em quantidades decrescentes para cada inoculação. O período de tempo entre as inoculações foi de 10 dias, sendo feita uma coleta de sangue antes da primeira inoculação, que foi usada como controle. Momentos antes de cada inoculação nova coleta de sangue era realizada para acompanhamento. Dez dias após a última inoculação o animal sofreu coleta de 40ml de sangue através de pequena incisão da veia da orelha, sendo a seguir sacrificado com éter. O soro foi obtido pela centrifugação do sangue durante 20 minutos a 2000rpm.

A obtenção da IgG foi através de método descrito por Suomela, 1980. O soro do coelho teve seu pH ajustado para a 5,0 com ácido acético 0,1M, o volume final foi medido e o resultado multiplicado por 0,0874015, que é o fator para se obter o volume de ácido caprílico a ser adicionado gota a gota e sob agitação, o soro foi mantido a temperatura ambiente por 30 min. sob agitação. sendo então centrifugado durante 10 minutos a 15.000 rpm a 20°C. O sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro de 0,45µm, o material filtrado foi colocado em sacos de diálise e dialisado contra PBS por 24 horas sob agitação e temperatura de 4°C.

O material foi então retirado do saco de diálise e passado em coluna DEAE Sephacel, equilibrada com tampão fosfato de sódio pH 8,0 - 0,05M, com fluxo de 1ml/min. A IgG foi extraída no primeiro pico.

O ensaio imunoenzimático (Theakston et al, 1979; 81: 82) consistiu na sensibilização de uma placa de plástico especial para ELISA (E. I. A. Plus microtitration plate, Flow Laboratories) com 0,1ml de solução de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* a 10ug/ml, portanto 1ug por pocinho. As placas foram deixadas 18 horas em geladeira para depois serem lavadas com tampão de recobrimento (Tris-12,1g/l; NaCl-8,7g/l pH 9,0) por 5 vezes e após serem secas foram adicionados 100ul de amostra em cada pocinho e incubados por 2 horas em temperatura ambiente, nova lavagem com tampão de lavagem ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -7,25g/l; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -1,55g/l; NaCl 6,75g/l, pH 7,2+0,5ml de Twin 20) foi realizada por 5 vezes e 100ul de soro bovino normal(10%) foram adicionados aos pocinhos e após 10 minutos as placas foram invertidas para decantar o soro. Após este procedimento foi agregado o conjugado e mantido em temperatura ambiente por 2 horas, quando foi lavado por 5 vezes com tampão de lavagem e teve acrescentado o substrato (peroxidase dissolvida em orto fenildiamina 2mg/ml, com mais 4ul de H_2O_2 para cada 10ml).

A reação ocorreu por 15 minutos, sendo paralizada, após este período, com ácido clorídrico 2M (50ul). As absorvâncias foram determinadas a 492nm em leitor de placas de ELISA.

7 PREPARAÇÃO DO MÚSCULO BIVENTER CERVICIS
 DE PINTAINHO

A preparação foi isolada e montada conforme descrito por Ginsborg e Warriner (1960). Os animais foram anestesiados com éter e através de uma incisão na parte posterior do pescoço, o par de músculos biventer cervicis era exposto. Após o isolamento do músculo, com cuidado para não causar qualquer tipo de injúria, este era amarrado nas duas extremidades e fixado em cuba contendo 4,0 ml de solução de Krebs, cuja composição em milimolar é a seguinte: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 24,99 e C₆H₁₂O₆ 11,65.

O músculo foi submetido à tensão constante de 1 g/cm e estimulado através de eletrodos bipolares posicionados na região de transição entre o tendão e o músculo, de modo a se proceder uma estimulação de campo. Estímulos supra máximos de 0,1 Hz de frequência e 0,2 ms de duração foram aplicados à preparação (estimulador GRASS S48). Todas as preparações passaram por período de estabilização de 20 minutos. Contrações musculares em resposta a estímulos máximos foram registradas por tempo de até 240 minutos (fisiógrafo MPM-4A), usando-se transdutor isotônico (NARKO Bio-Systems Inc.).

Os estudos foram realizados com as concentrações de 40 e 80 ug/ml de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* na solução da cuba, sendo que 6 animais foram testados para cada concentração de veneno.

8- RESULTADOS

8.1- TOXICIDADE

Os camundongos injetados com peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentaram perda de tônus muscular, convulsão com rolamento sobre o eixo longitudinal do corpo e mudança de postura, que se caracterizava por extensão da pata de tal forma que os animais se deslocavam tocando apenas com as extremidades das patas no solo.

O valor encontrado para a DL₅₀ em camundongos foi de 36,41 ug/animal ou 1,82mg/k.

Neutralização da toxicidade:

a- A neutralização da atividade tóxica através da pré-incubação com o soro antitetrápico foi da ordem de 1:5,51, ou seja, cada ml de soro conseguiu neutralizar 5,51mg de veneno, com limites de confiança de 95% variando de 4,22 a 7,19.

b- O procedimento de neutralização através do método com inoculação independente mostrou idênticos resultados no que se refere a atividade tóxica, neutralizando os mesmos 5,51mg de veneno para cada ml do soro.

8.2 ATIVIDADE HEMORRÁGICA E SUA NEUTRALIZAÇÃO

A atividade hemorrágica induzida por este veneno foi avaliada com diversas concentrações, mostrando-se dose dependente. A Dose Mínima Hemorrágica (DMH) encontrada foi de 6 μ g (fig 1). A neutralização desta atividade com pré-incubação foi total para 250 μ l de soro/mg de veneno (fig 2), enquanto a neutralização com inoculação independente atingiu 30%, mesmo com 4000 μ g de soro/mg veneno (fig 3).

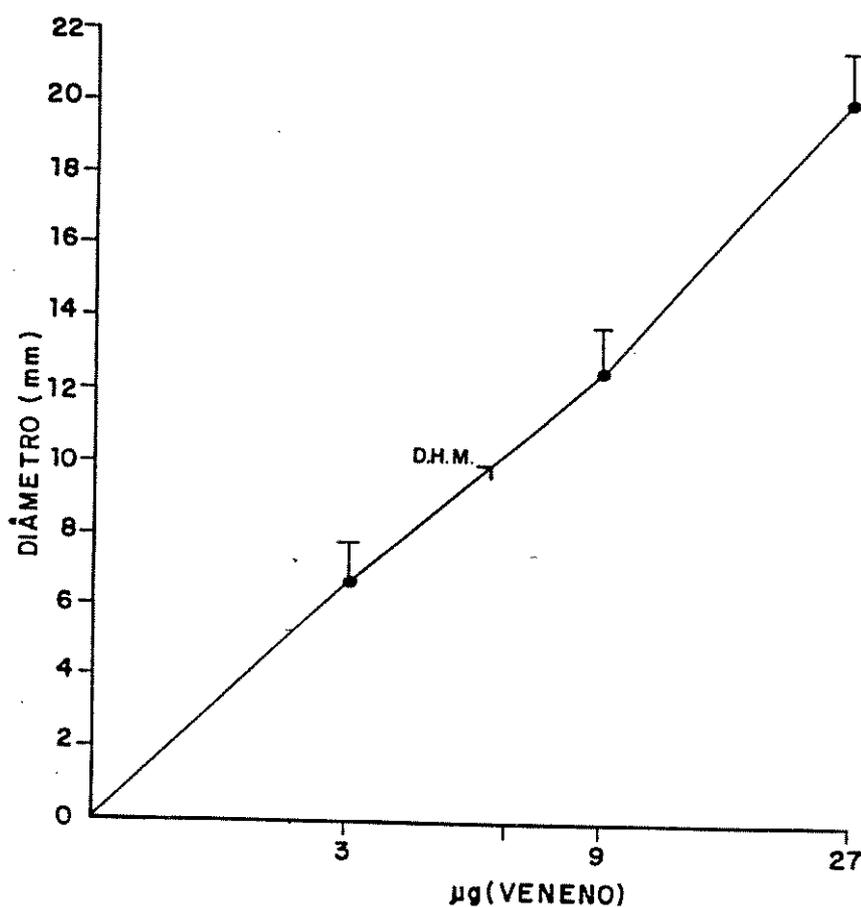


Fig 1- Atividade hemorrágica. Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

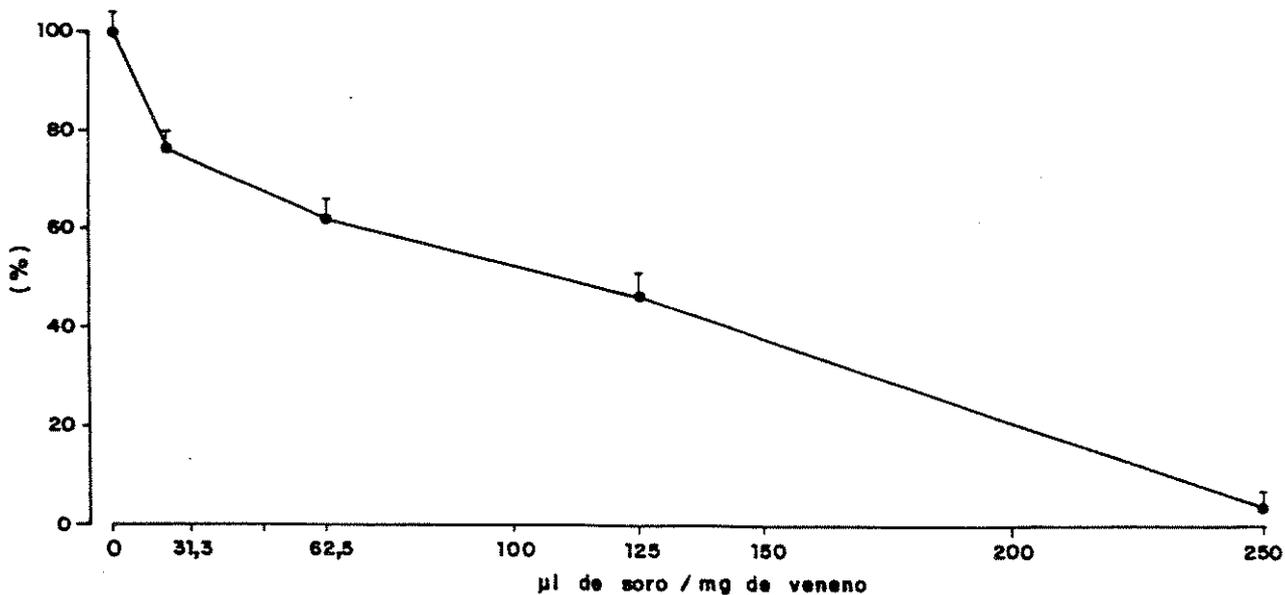


Fig 2- Neutralização da atividade hemorrágica. Pré-incubação do veneno com o soro antihemorrágico.

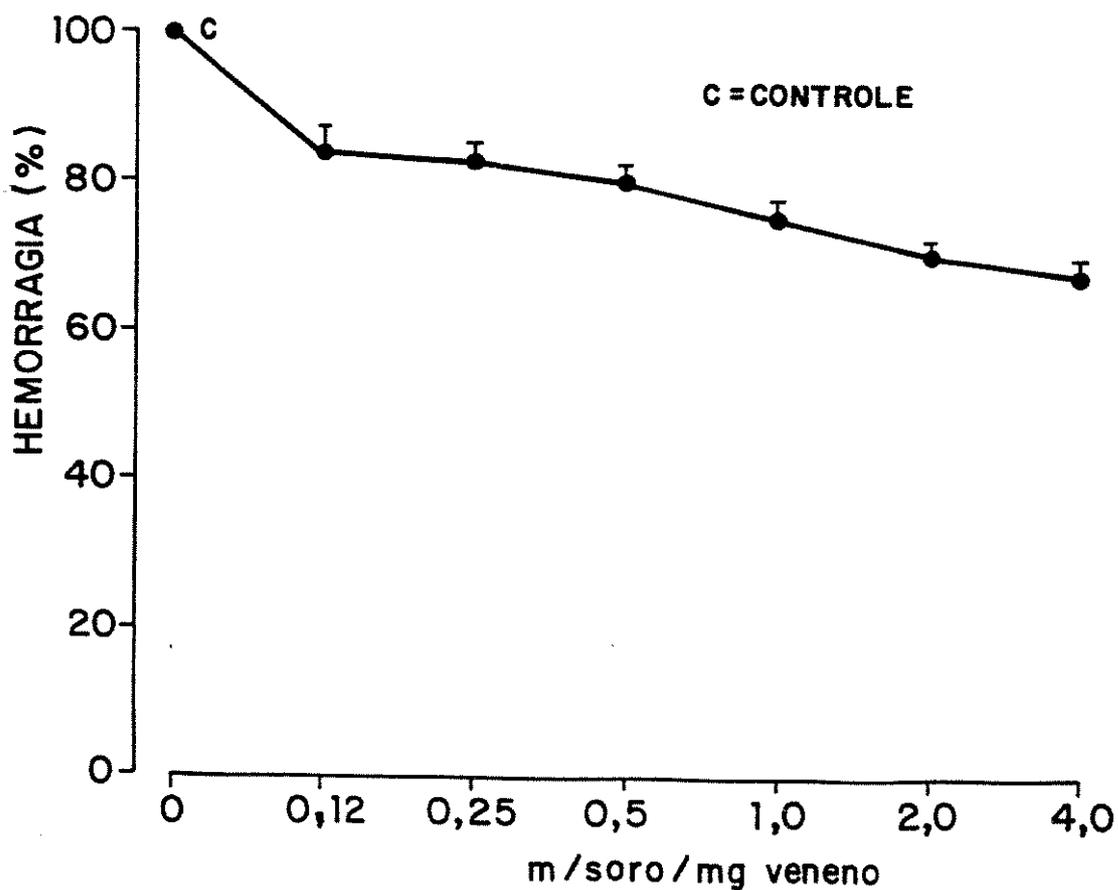


Fig 3- Neutralização da atividade hemorrágica. Inoculação independente de soro e veneno.

8.3 ATIVIDADE EDEMATIZANTE E SUA NEUTRALIZAÇÃO

O edema induzido pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi dose dependente (fig 4), atingindo seu valor máximo em torno de 30 minutos após a inoculação (fig 5), portanto este momento foi considerado como ideal para testarmos a capacidade neutralizante do soro antiofídico sobre esta atividade. A neutralização com pré-incubação foi de 70% com 1000ul de soro/mg de veneno (fig 6). A inoculação independente mostrou-se efetiva apenas em cerca de 30% de redução deste efeito com doses de até 4000ul de soro/mg de veneno (fig 7).

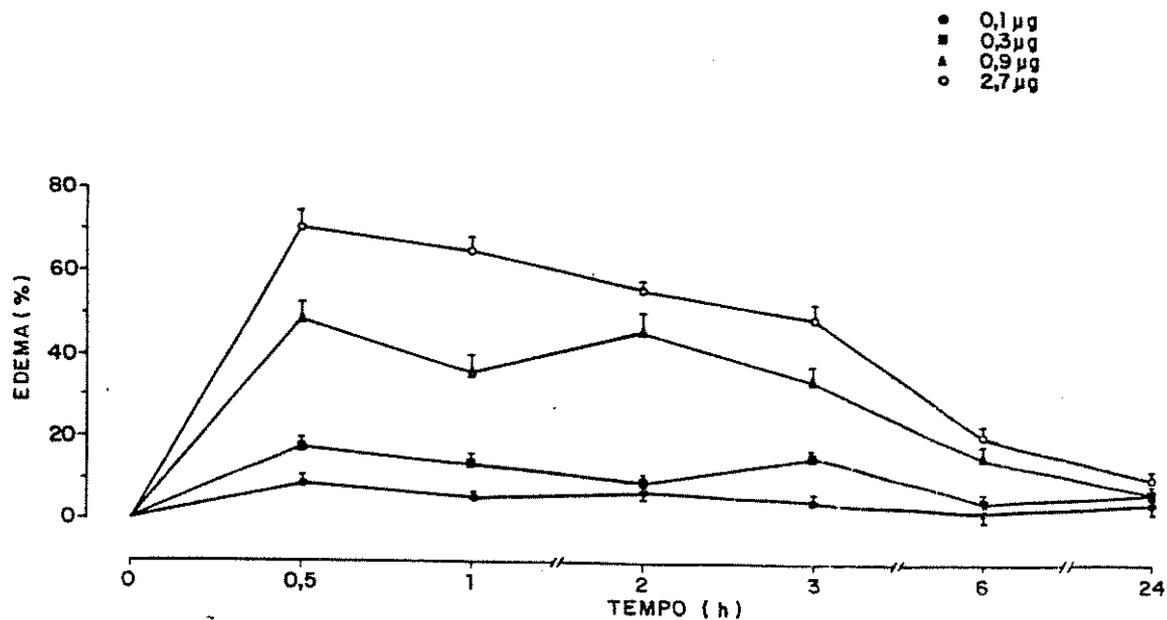


Fig 4- Edema induzido pelo veneno de *B. n. pauloensis*

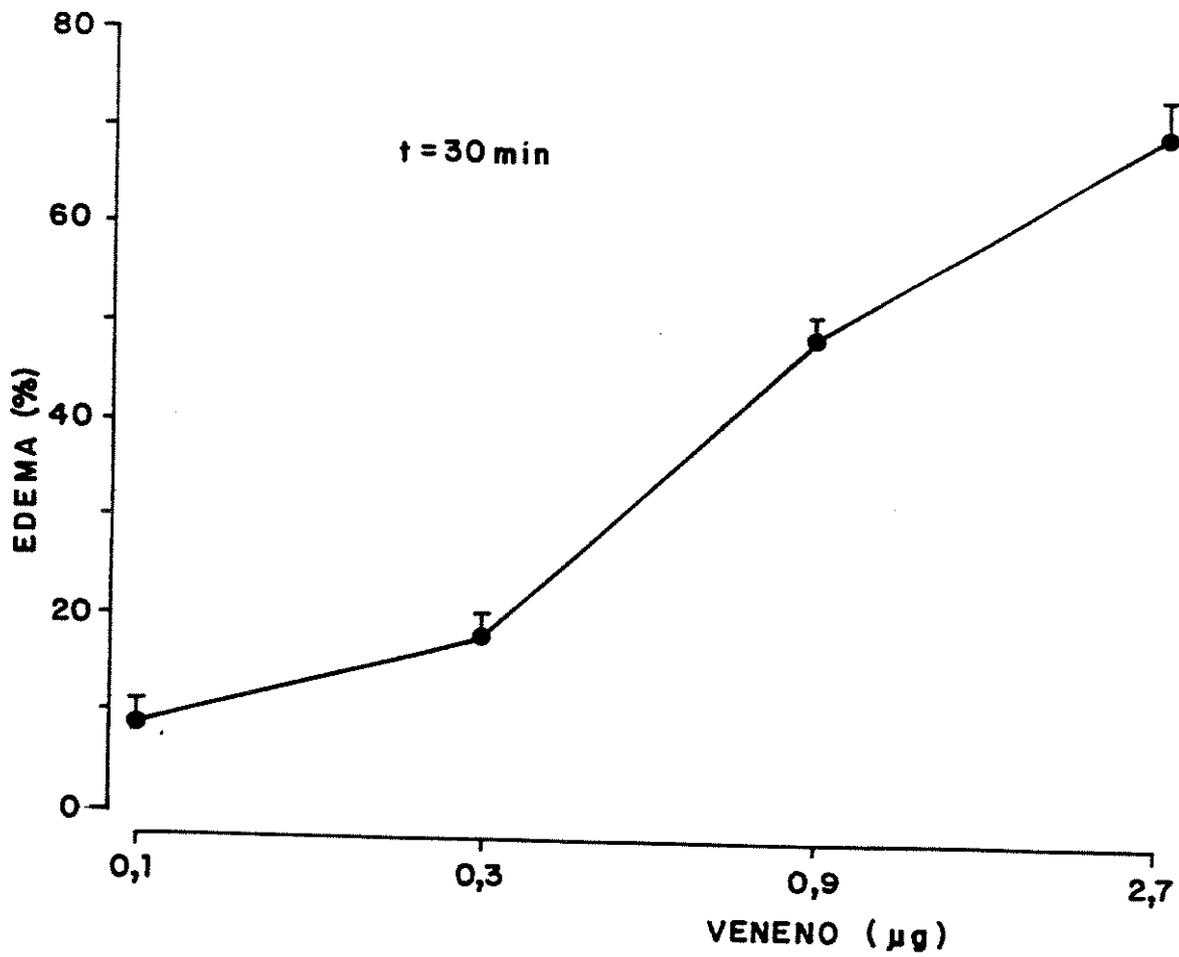


Fig 5- Evolução do edema após 30 minutos da inoculação do veneno de *B. n. pauloensis*.

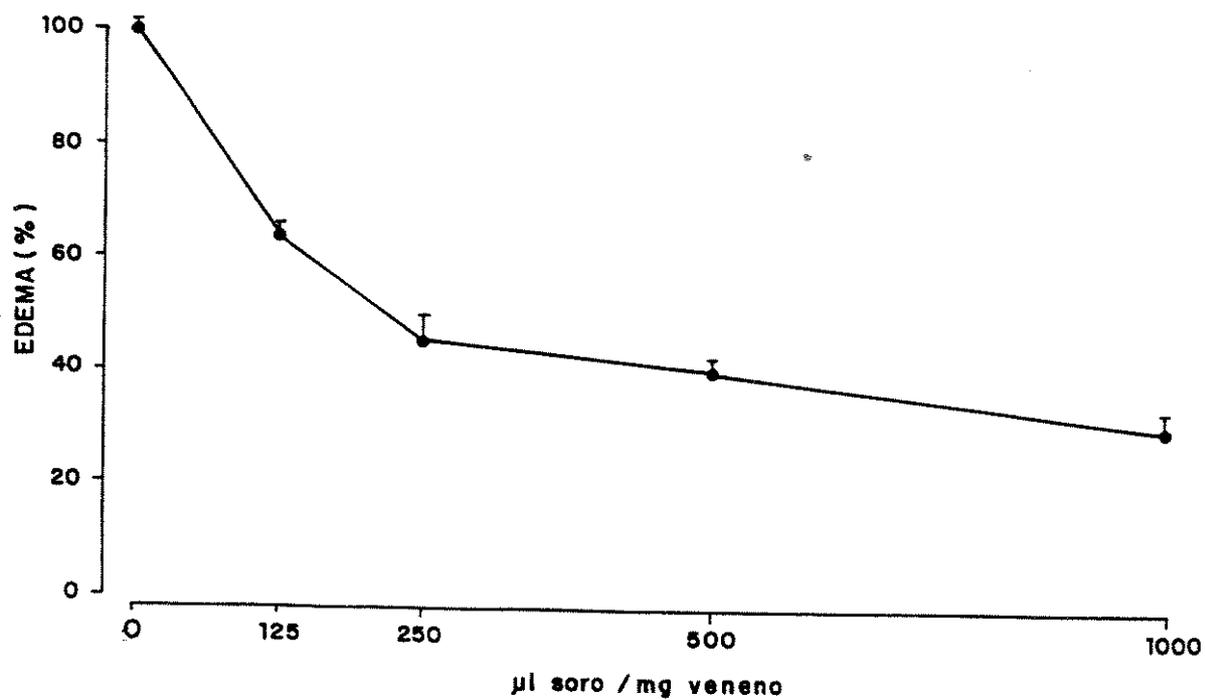


Fig 6- Neutralização da atividade edematizante com pré-incubação do soro com veneno.

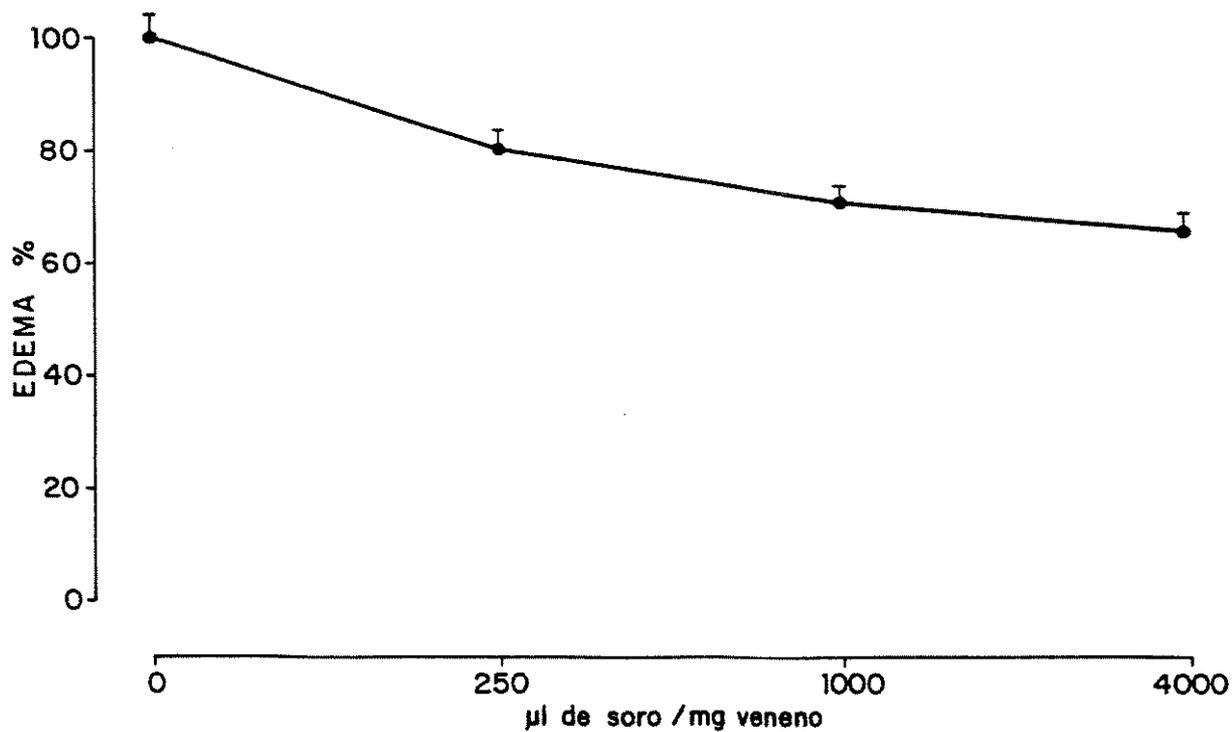


Fig 7- Neutralização da atividade edematizante com inoculação independente.

8.4- ALTERAÇÕES SOBRE A PERMEABILIDADE CAPILAR

A alteração da permeabilidade capilar, medida pela liberação de Azul de Evans foi dose dependente, atingindo seus valores máximos cerca de 30 minutos após a inoculação do veneno (fig 8).

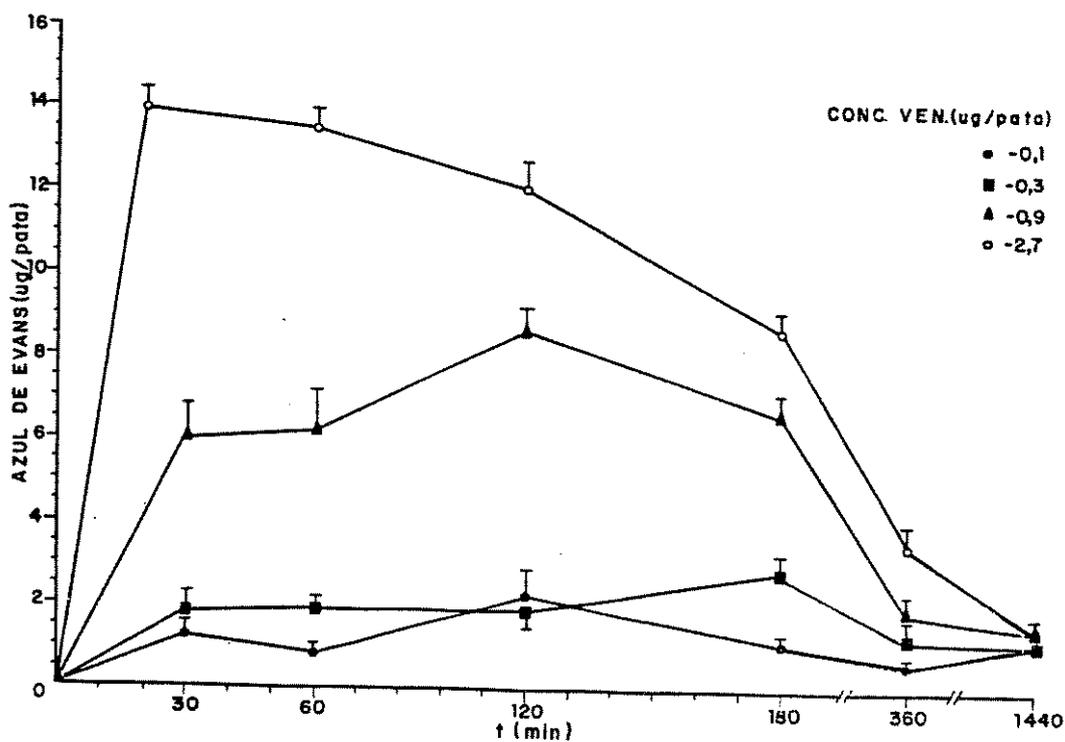


Fig 8- Alterações sobre a permeabilidade capilar induzidas pelo veneno de *B. neuwiedi pauloensis*.

8.5- ATIVIDADE COAGULANTE E SUA NEUTRALIZAÇÃO

A ação do veneno sobre a coagulação do plasma citratado foi também dose dependente (fig 9), sendo a Dose Coagulante Mínima (DCM) de 270 μ g/ml. A neutralização da atividade coagulante foi completa com a relação 250 μ l de soro/mg de veneno(fig 10).

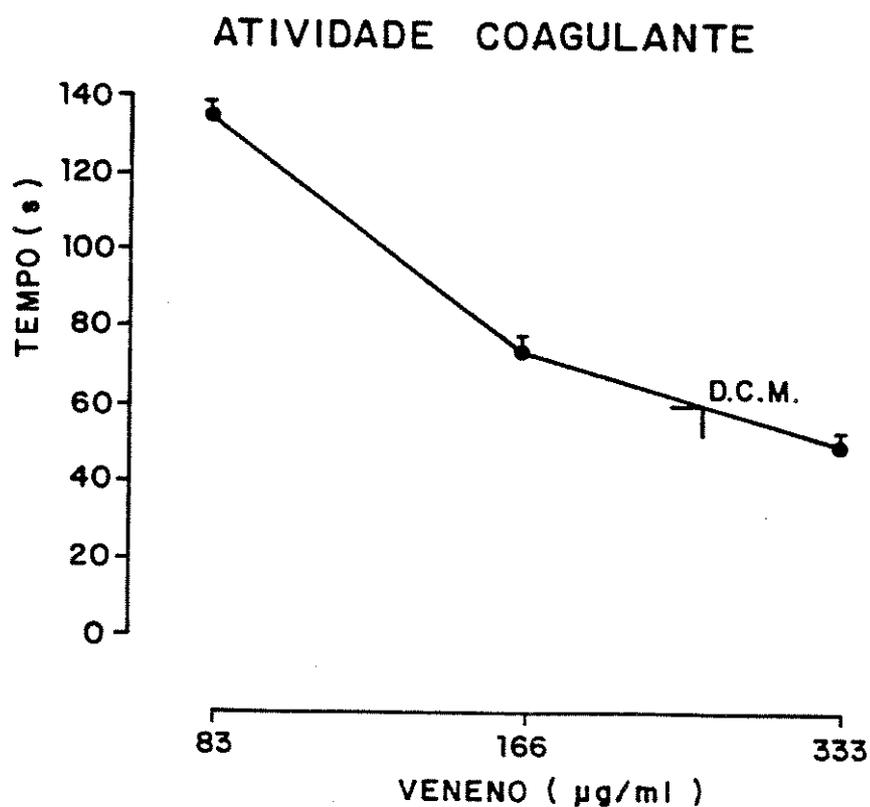


Fig 9 Atividade coagulante induzida pelo veneno. Determinação da Dose Coagulante Mínima (DCM).

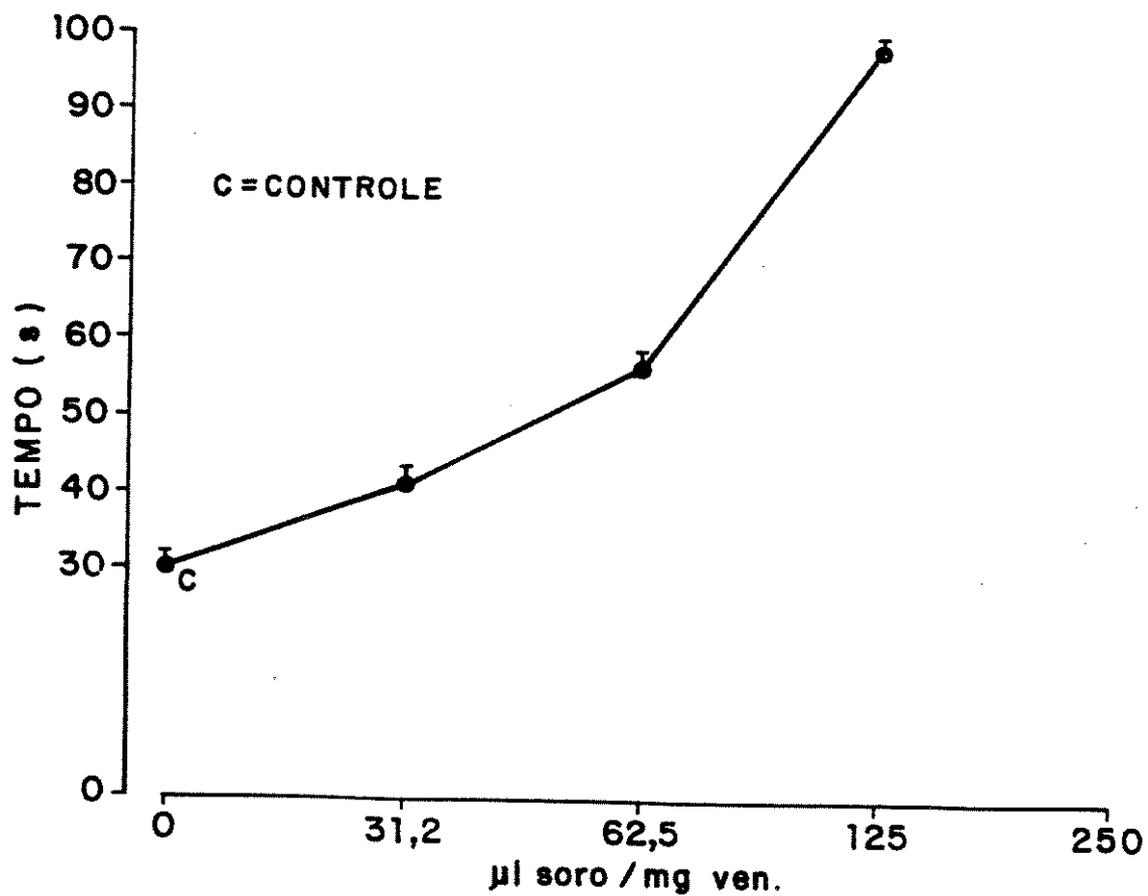


Fig 10- Neutralização da atividade coagulante após incubação com o soro antitrombótico.

8.6- ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Usando-se caseína como substrato, a atividade proteolítica mostrou-se dose dependente (fig 11).

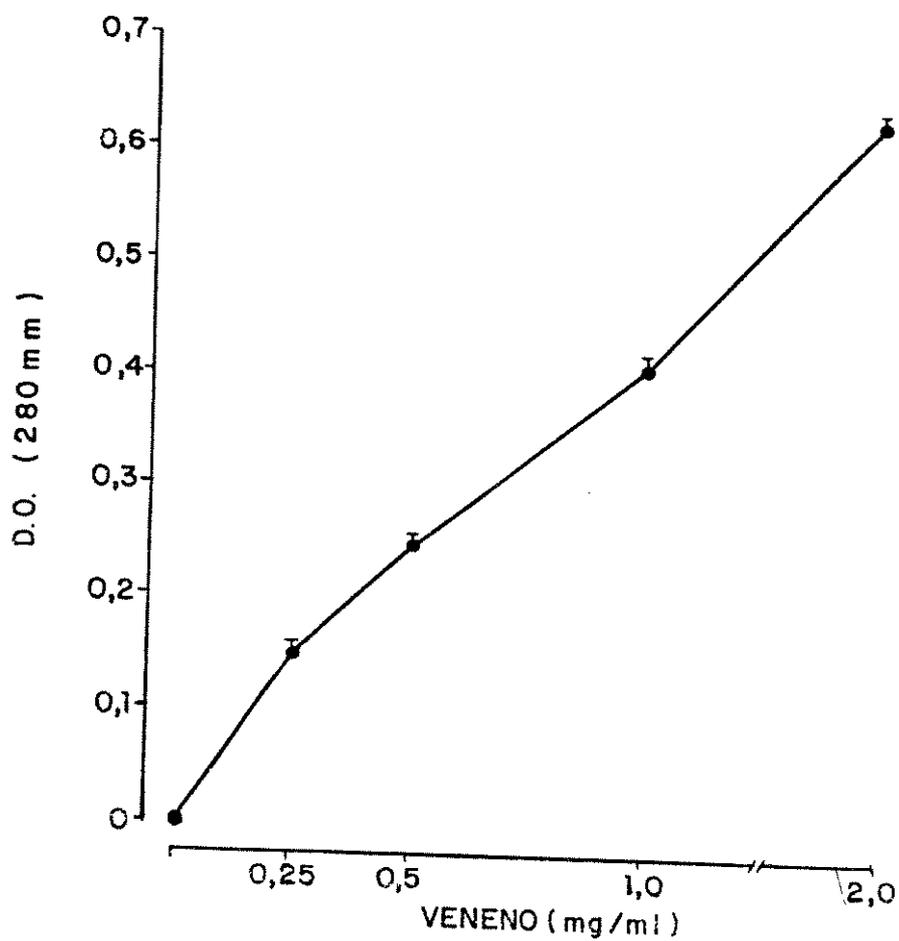


Fig 11- Ação proteolítica do veneno, tendo caseína como substrato.

8.7 ATIVIDADE DESFIBRINANTE

Os animais inoculados com veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentaram o seguinte quadro após de resultados:

veneno (ug/animal)	resultado
20	morte
15	morte
10	morte
5	formação de coágulo
2,5	formação de coágulo
controle (salina)	formação de coágulo

8.8- ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA E SUA NEUTRALIZAÇÃO

A capacidade do veneno em induzir hemólise foi também dose dependente (fig 12). Para a neutralização a nível de 90% foram necessários 4500ul de soro/mg veneno (fig 13)

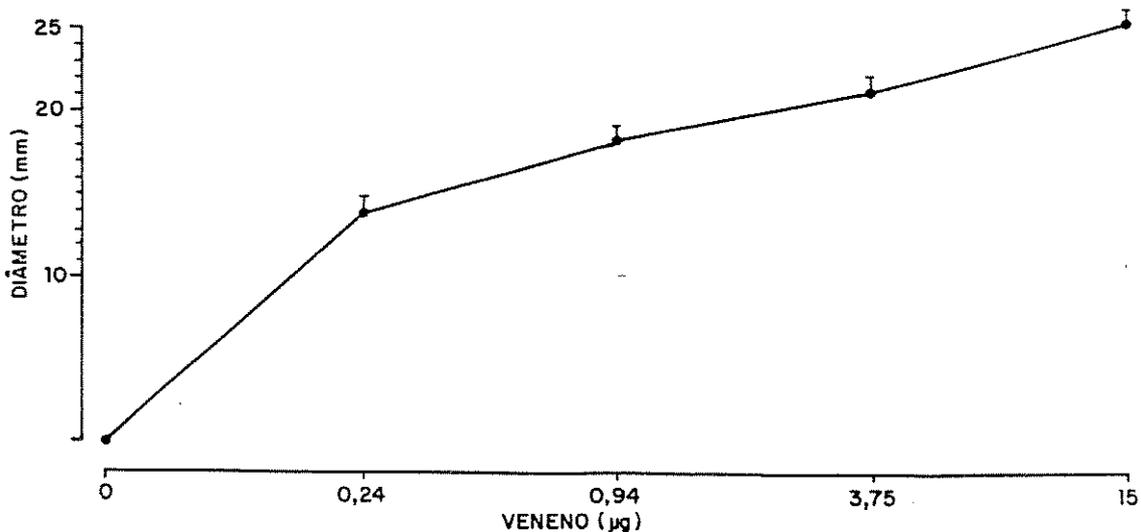


Fig 12- Hemólise induzida pelo veneno de *B. n. pauloensis*.

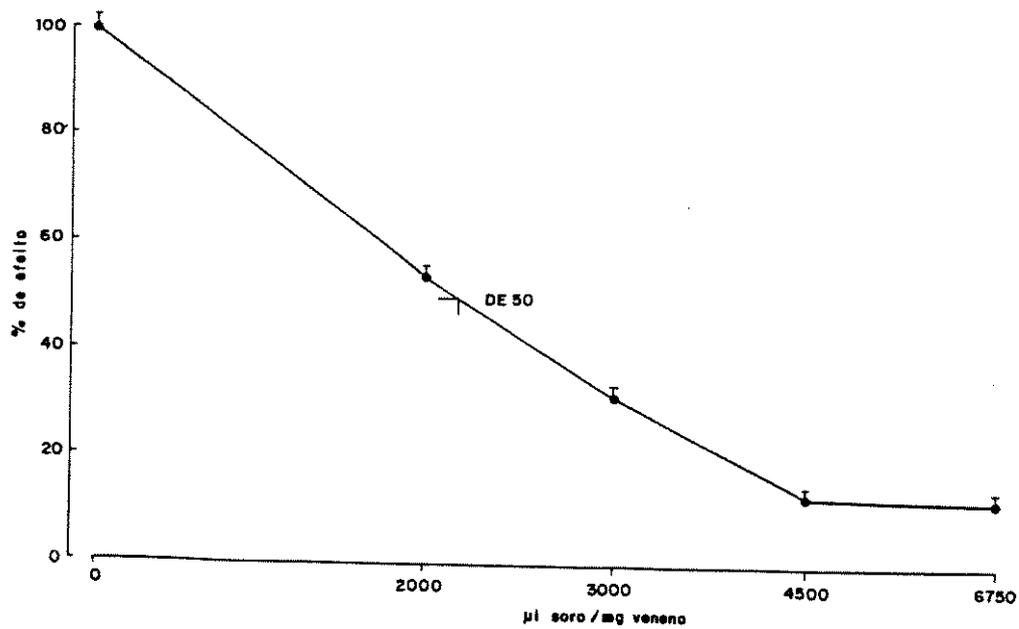


Fig 13- Neutralização da atividade hemolítica pela pré incubação do veneno com o soro antitoxínico, DE₅₀ é a dose efetiva 50%

8.9- ATIVIDADE MIOTÓXICA E SUA NEUTRALIZAÇÃO

Conforme pode ser observado na fig 14 a liberação da enzima muscular creatina quinase (CK) foi máxima em torno de 3 horas após a inoculação do veneno (70ug/animal). A avaliação morfológica das alterações sofridas por células musculares mostra a correlação entre a liberação desta enzima e as lesões observadas. A avaliação macroscópica está representada na foto 2 (A e B) e a microscópica nas fotos 3 a 9.

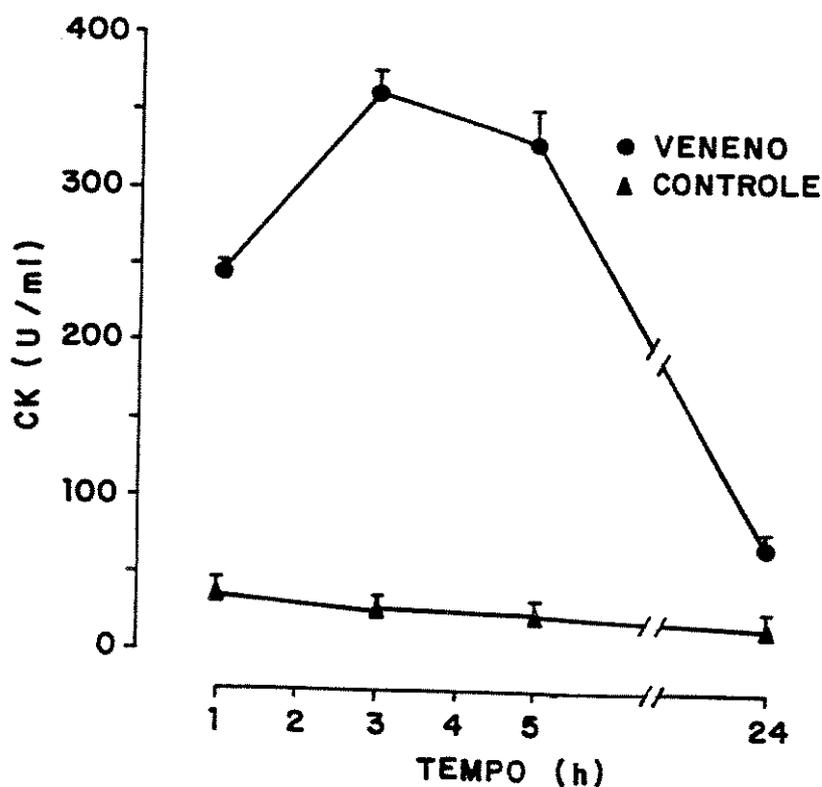


Fig 14 Liberação de creatina quinase (CK) pela inoculação de veneno (70ug/animal).

A



B



FOTO 2 A e B- As fotografias mostram musculatura da perna posterior direita de camundongo, 3 horas após inoculação de A-50 ul de FBS e B- 70 ug(50ul) de veneno de *B. n. pauloensis*, notar a evidente hemorragia e a coloração escura, sugerindo necrose muscular em B.

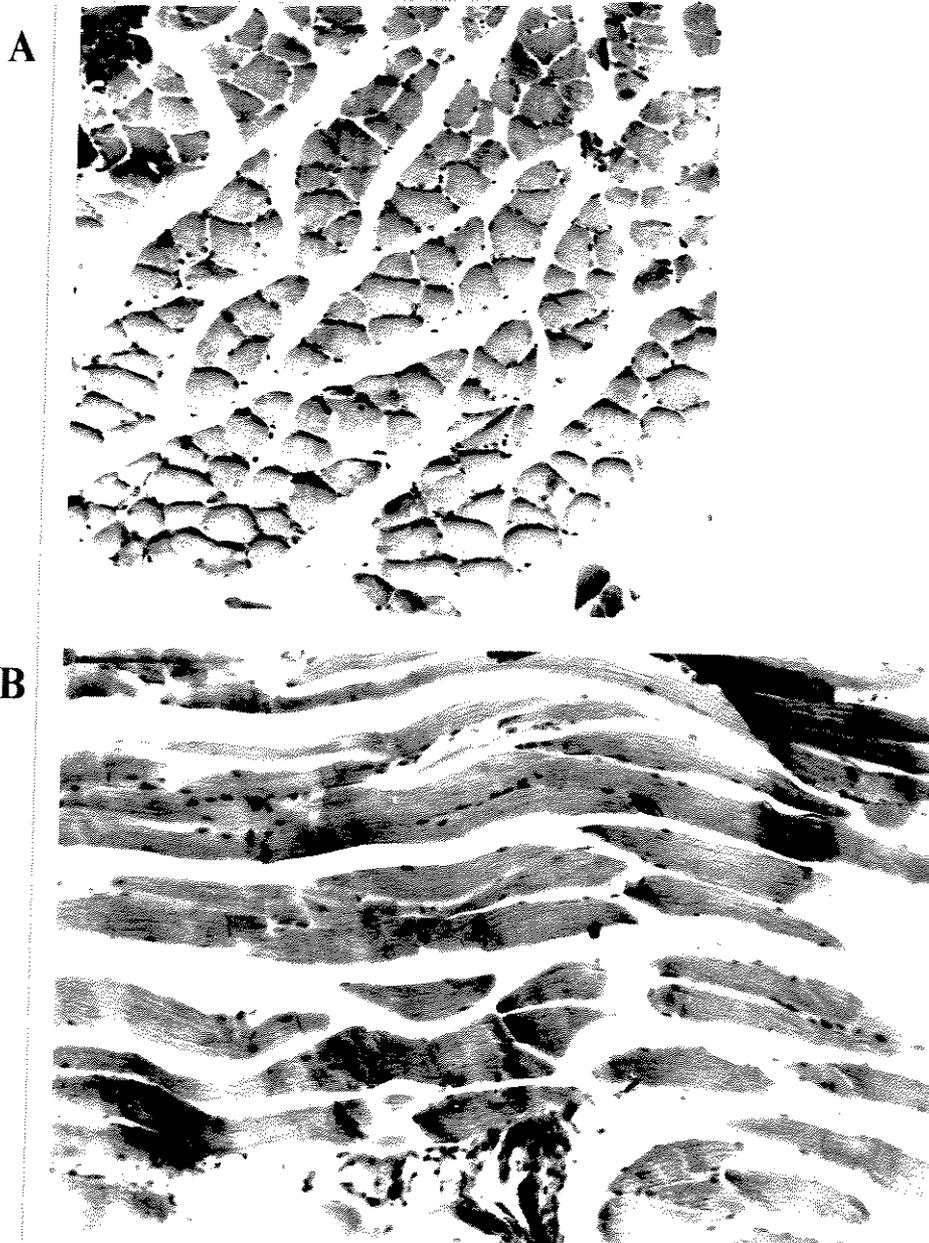
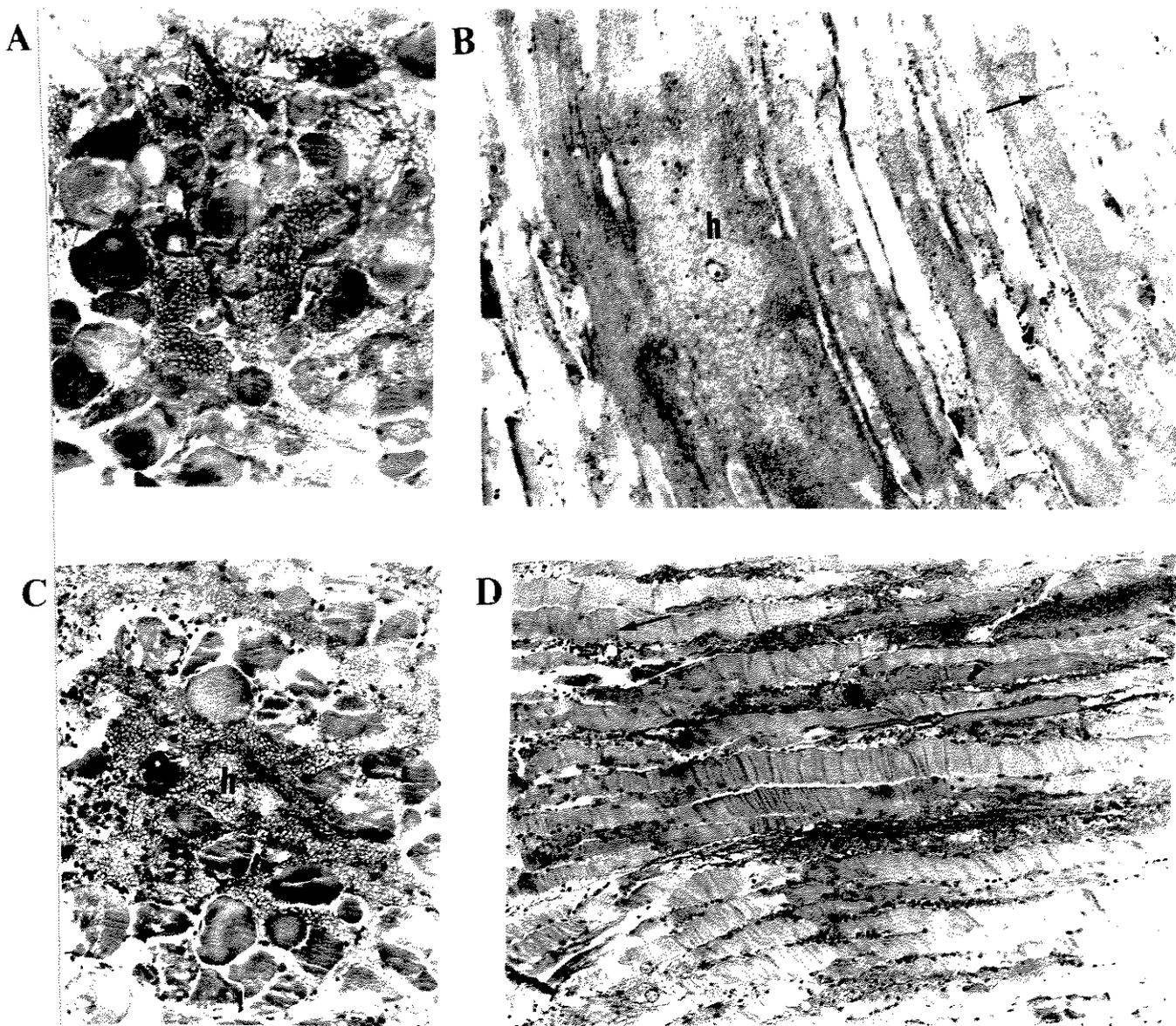


FOTO 3- Micrografias fotônicas de secções coradas em H.E. do músculo gastrocnêmio de camundongos, 3 horas após injeção de PBS (controle) notar a arquitetura normal do tecido muscular, tanto em corte transversal (A), como em longitudinal (B).



Músculo gastrocnêmio de camundongo injetado com veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

FOTO 4-A e B, uma hora após envenenamento: observar contração das fibras musculares esqueléticas (seta), hemorragia entre as fibras musculares esqueléticas (h) e infiltrado leucocitário. A) H.E. X 100; B) T.M. X 60. C e D 3 horas após envenenamento: a extensão das alterações morfológicas está aumentada, apresentando ampla hemorragia (h) sobrepondo-se às fibras musculares em degeneração. A) H.E. X 100; B) T.M. X 60.

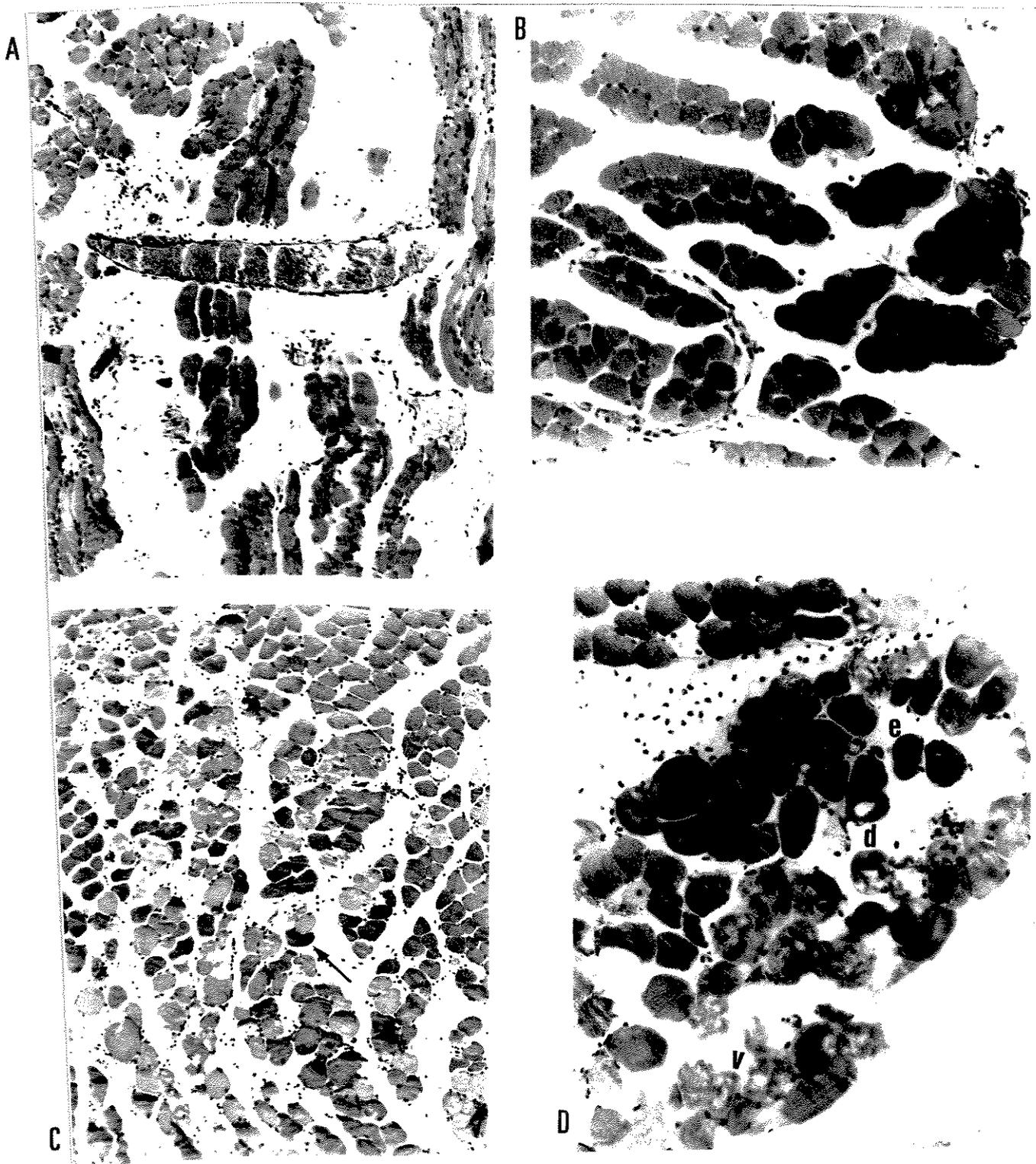


FOTO 5 -Micrografias fotônicas de seccões histológicas do músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com 70ug de veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* após incubação com soro antitoxico. A e B- 1ml de soro/mg de veneno H.E.; T.M.. C e D- 500ul de soro/mg veneno, H.E.; T.M. Notar que a pré incubação com o soro impediu a hemorragia (A e B), mas não impediu a mionecrose, que foi inversamente proporcional à diluição do soro. As alterações degenerativas incluem: Aglutinação das miofibrilas, tornando-as mais escuras (seta), vacuolização (v), lesões delta (d), edema (e), além de áreas com infiltrado inflamatório. A e C x60; B x80; D x100.

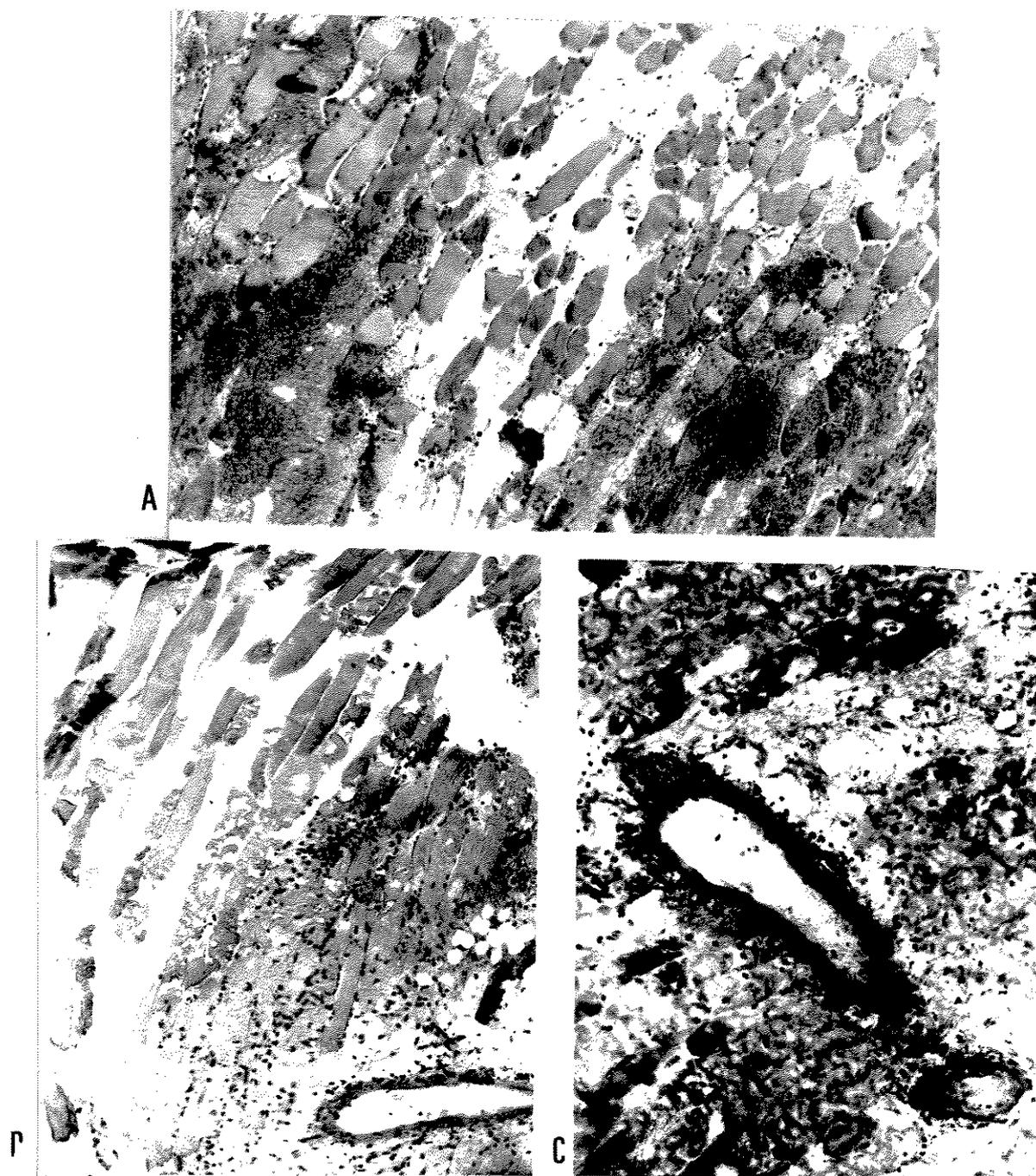


FOTO 6- Músculo gastrocnêmio de camundongo injetado com veneno de *B. n. pauloensis*. A- 5 horas após envenenamento, mostrando evidente desorganização das fibras, com intensa hemorragia e grande quantidade de infiltrado leucocitário, diversas fases de mionecrose, comprometendo a maior parte das fibras (H.E. X 100). B e C- 24 horas após envenenamento (B H.E.; C T.M.): notar que há progressiva degeneração das fibras musculares em relação ao tempo de envenenamento, com diversas fases de mionecrose, em C observa-se um vaso com aparente lesão na parede (B X 60, C X 100)

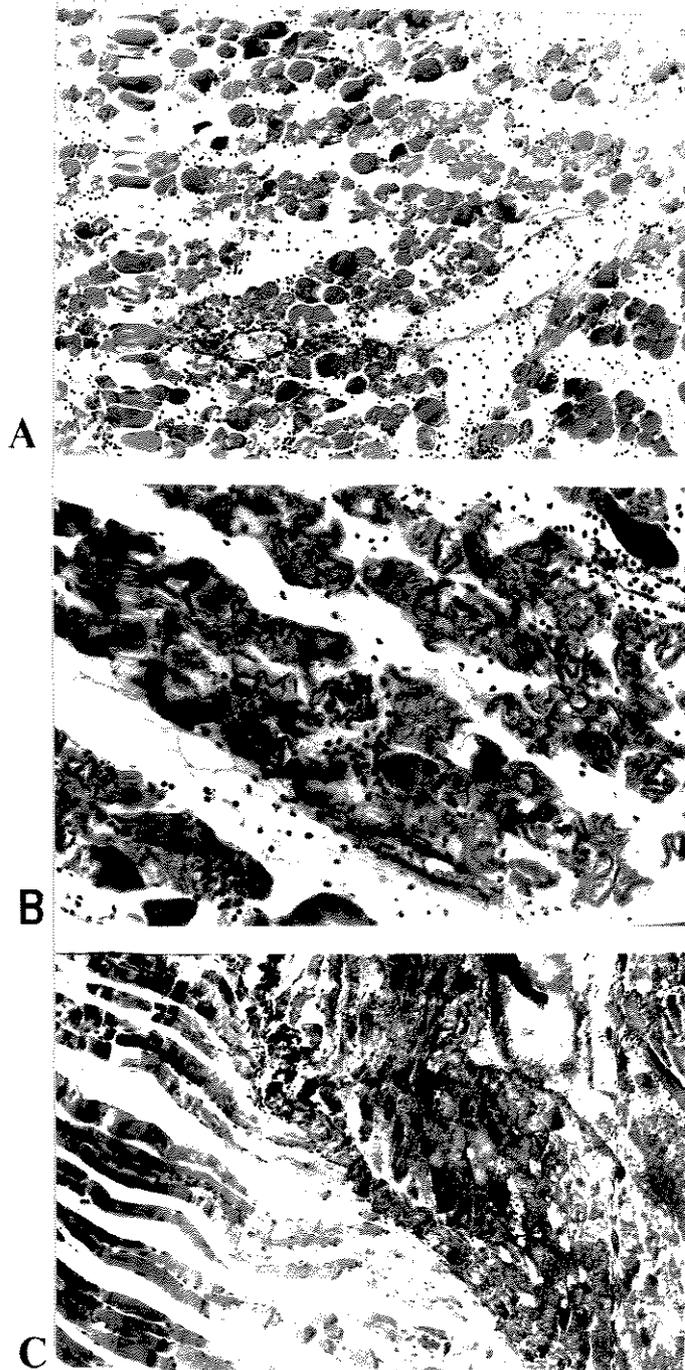


FOTO 7- Micrografia de cortes histológicos de músculo gastrocnêmio de camundongo três horas após inoculação com veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* pré incubado com soro antibotrópico (A = 0,25ml sor/mg veneno; B = 0,125ml soro/mg veneno e C = 0,06ml soro/mg veneno): observar em A e B, presença de células degenerativas e infiltrado leucocitário, em C pode-se também ser observada importante hemorragia.

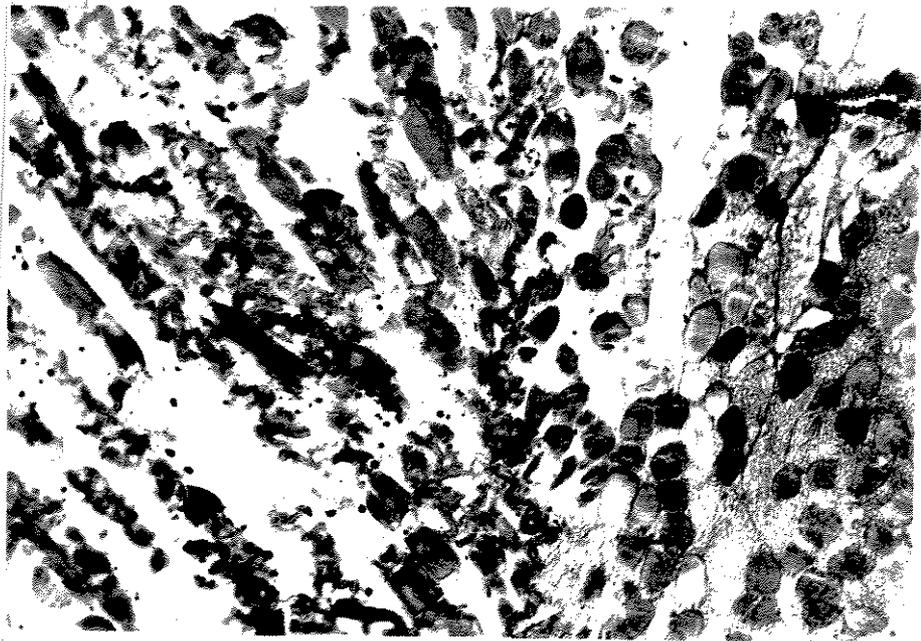


FOTO 8 - Micrografia fotônica três horas após inoculação de veneno neutralizado por inoculação independente. A - soro antibotrópico 0,5ml soro/mg veneno e B- IgG 0,5mg/mgveneno. Notar a presença de células degenerativas, infiltrado leucocitário e hemorragia, demonstrando a incapacidade em neutralizar a miotoxicidade induzida por este veneno.

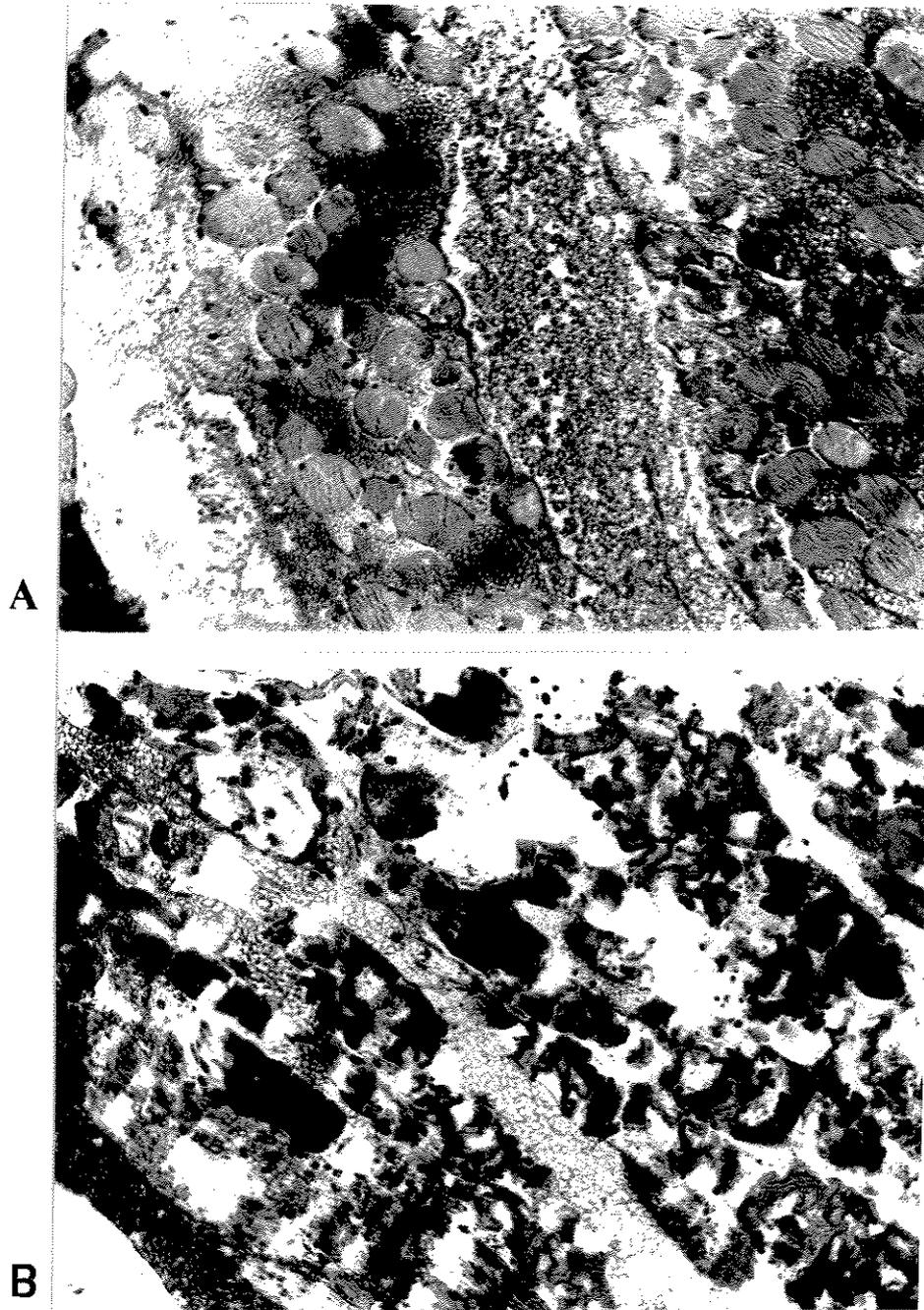


FOTO 9-Micrografia mostrando inoculação de veneno pré incubado com IgG: A 0,5mg IgG/mg veneno e B 0,06mg IgG/mg veneno (T.M. 100X) notar a presença de hemorragia e pouca quantidade de células degenerativas em A, em B pode-se notar grande quantidade de células degenerativas, hemorragia e edema.

8.10- ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Os resultados mostram que foram detectados anticorpos contra veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* tanto no soro antitetrápico do Instituto Butantan quanto no soro polivalente produzido pelo Instituto Clodomiro Picado fig 15.

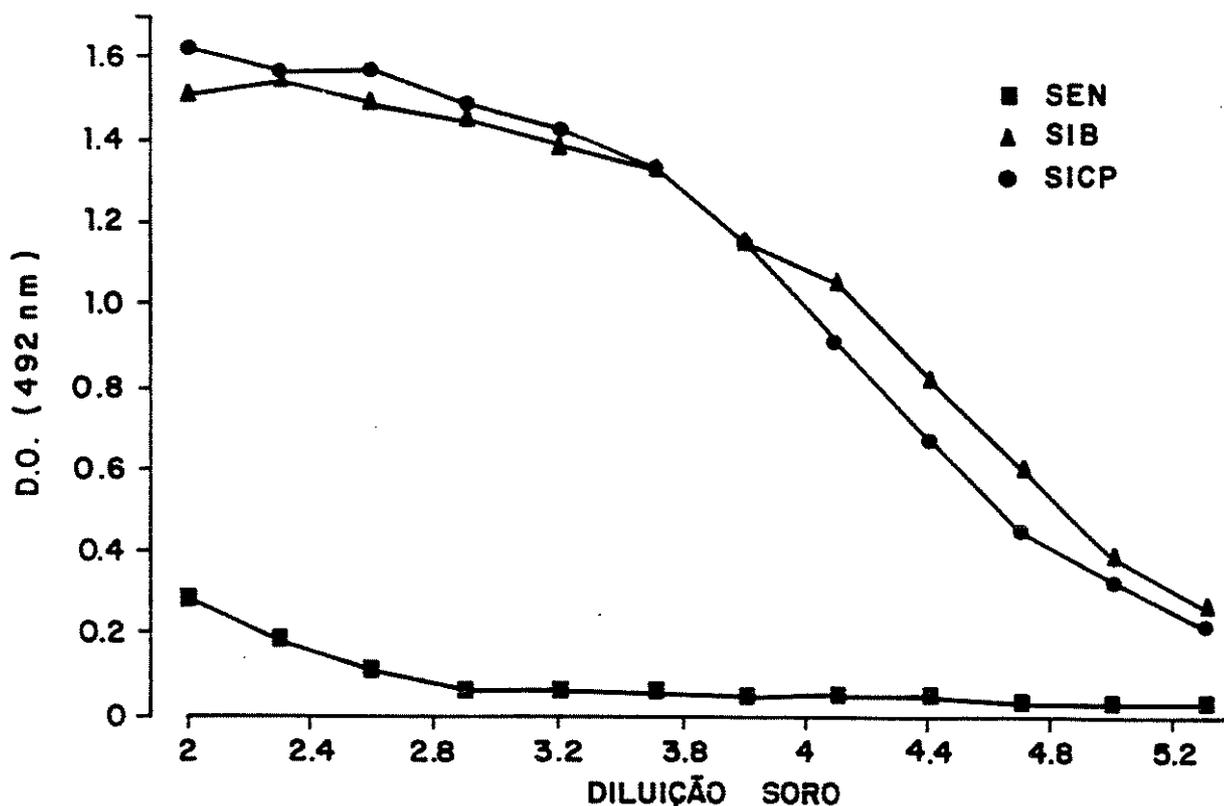


Fig 15- Ensaio imunoenzimático (ELISA), onde: SICP é o soro produzido pelo Instituto Clodomiro Picado, SIB é o soro antitetrápico produzido pelo Instituto Butantan e SEN é soro equino normal, ou seja de cavalo não imunizado.

8.11- ATIVIDADE SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

O veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* mostrou-se capaz de induzir contratura e bloqueio irreversível quando testado na preparação músculo biventer cervicis de pintainho (fig.16), os efeitos foram dose dependentes (tabela I)

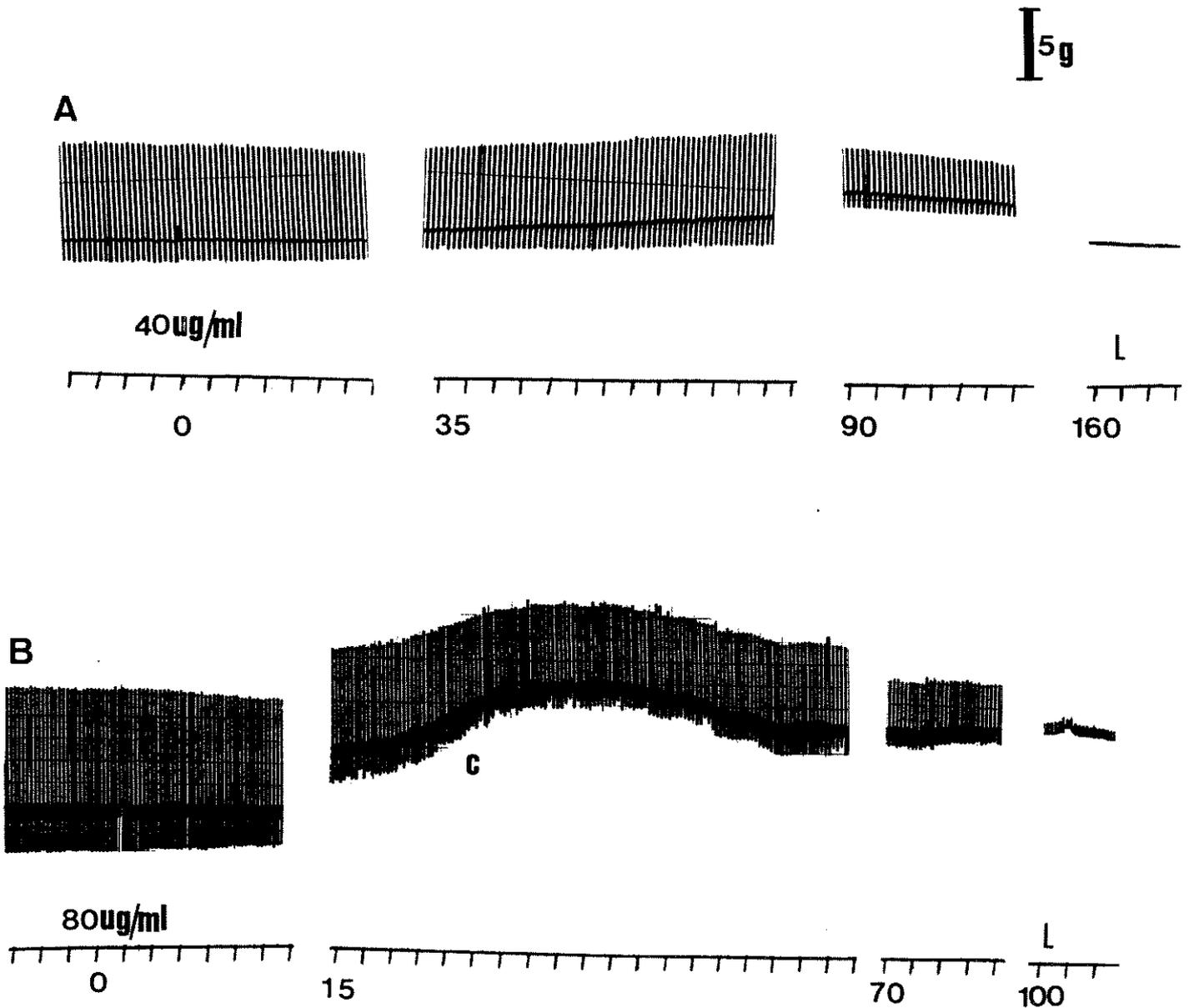


Fig 16- Ação do veneno sobre a preparação biventer cervicis, notar contratura (c) e bloqueio total e irreversível (b), mesmo após diversas lavagens com solução de Krebs (L).

TABELA I

veneno (ug/ml)	tempo para ocorrência de bloqueio	
	50%	100%
40	91 min	174 min
80	58 min	102 min

9- DISCUSSÃO

No Brasil cerca de 25.000 casos de acidentes ofídicos são notificados todos os anos ao Ministério da Saúde, sendo que aproximadamente 88% são atribuídos a serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (Ministério da saúde, 1989), tornando-se um problema para a saúde pública. O homem do campo tem sido a principal vítima das serpentes, uma vez que ele responde pelo plantio e colheita das lavouras, tornando-se mais provável o seu encontro com os animais.

Ao paciente acidentado por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* e que não é atendido rápida e corretamente pode recair o problema da lesão tecidual grave, com necrose e até perda do membro atingido, além de efeitos sistêmicos que podem causar hemorragia do sistema nervoso central. A ação sobre a coagulação sanguínea (Nahas et al, 1979) e a ação nefrotóxica (Steinbeck, 1960; Amaral et al, 1980; Chugh et al, 1975; Lopez et al, 1972) também podem estar presentes, e a somatória de todos estes efeitos é normalmente a causa da morte que pode eventualmente ocorrer.

A peçonha da *B.n.pauloensis* promove coagulação *in vitro* por atividade trombina símile, ativação do fator X e da protrombina (Nahas et al, 1979). Entretanto nossos resultados mostram que em camundongos o sangue do animal inoculado com doses crescentes de veneno, coagulava normalmente. Este resultado contraindica portanto o uso exclusivo do tempo de coagulação como único parâmetro para avaliação da gravidade do envenenamento.

A observação do estado de torpor, precedendo a morte, em animais inoculados com doses letais de veneno, levou-nos a supor que a paresia apresentada pudesse estar relacionada a hiperalgesia ou a um componente muscular. O estudo miográfico realizado em preparação biventer cervicis de pintainho revelou o aparecimento de bloqueio da função muscular, que é irreversível, sendo também, dose e tempo dependente. Além disso o tempo decorrido para o bloqueio total é aproximadamente o mesmo necessário para o evidenciamento do intenso efeito mionecrótico observado. Nossos resultados sugerem que o comprometimento da locomoção ocorra inicialmente a nível muscular.

Com os trabalhos sobre o soro antiofídico, realizados por Calmette em 1907, e a feliz observação de Vital Brazil, ainda no começo do século, sobre a especificidade do soro com relação ao veneno animal, ao contrário do que queria comprovar Calmette, pode-se desenvolver produção de soro particular a cada tipo de envenenamento provocado por serpentes.

Em 1909, Vital Brazil realizando experimentos, inoculava veneno de serpentes em cães e descrevia seus efeitos. Já nesta época o pesquisador evidenciava também a presença de edema importante, bem como mionecrose, que é citada como capacidade de "esfacelo de tecido".

Com a descoberta de metodologias mais modernas, tornou-se possível determinar a ação mionecrótica dos venenos, e até mesmo isolar as principais frações responsáveis por estes efeitos (Gutiérrez, 1984, 1989a,b,c). Utilizando-nos de dois parâmetros diferentes, como sugerido por Mebs (1983), pudemos determinar que o veneno em estudo induz a necrose do tecido muscular. Isto pode ser comprovado tanto pela avaliação morfológica, como pela determinação dos níveis séricos da enzima muscular CK. A neutralização desta ação foi melhor observada com a pré-incubação do soro com o veneno do que com a inoculação independente.

A avaliação da evolução do edema, bem como das alterações sobre a permeabilidade capilar, mostrou-nos a ação aguda sobre este efeitos, uma vez que apenas 30 minutos após a inoculação o edema atingiu seus valores máximos, o mesmo ocorrendo com relação a liberação de Azul de Evans, utilizado como parâmetro para avaliação da permeabilidade capilar. Mais uma vez os testes sobre o poder neutralizante do soro antitoxínico mostrou-se mais eficiente quando testado com pré-incubação com o veneno.

O efeito hemorrágico obtido pela inoculação do veneno de *B.n.pauloensis* deve-se a somatória de pelo menos dois fatores (NHFa e NHFb), caracterizados por Mandelbaum et al em 1984. Este efeito foi testado e igualmente bem neutralizado pela pré-incubação do veneno com o soro, enquanto que a inoculação independente mostrou-se novamente pouco eficaz.

Verificamos em nosso trabalho que a capacidade letal do veneno foi bem neutralizada pelo soro antitoxínico, sendo que este veneno faz parte do pool de venenos na imunização dos cavalos. A neutralização com o soro não sofreu alteração de sua potência quer pela pré incubação do soro com o veneno, quer com a inoculação independente de ambos.

Os efeitos locais induzidos pelo veneno (edema, necrose e hemorragia) mostraram-se melhor neutralizados pela pré incubação com o soro. A neutralização com inoculação independente, mesmo utilizando-nos de concentrações de soro várias vezes maior, mostrou-se menos eficiente, o que está em consonância com os relatos clínicos. De fato, embora a capacidade neutralizante do soro sobre o veneno possa muitas vezes representar a diferença entre a vida e a morte para a vítima, mesmo quando aplicado precocemente, não impede a evolução dos efeitos locais, principalmente se houve a aplicação de torniquete.

A comprovação da presença de anticorpos para *B.n. pauloensis* no soro produzido pelo Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica), merece algumas considerações, uma vez que este animal não ocorre fora dos limites do estado de São Paulo. Este fato leva-nos a admitir a possibilidade de mesma origem filogenética entre animais do mesmo gênero que hoje são encontrados nas duas regiões distintas do continente.

Torna-se por demais importante trabalharmos com estes dois metros de neutralização para podermos compará-los, tentando melhorar a capacidade do soro e também testando novas tâncias que possam de alguma forma diminuir os efeitos vos do veneno ofídico.

Neste trabalho pudemos verificar que o veneno de *B.n. oensis* induz diversos efeitos locais e sistêmicos, e embora os autores Ownby et al, 1983, 1984, 1985, 1986; Gutiérrez) tenham estudado efeitos induzidos por peçonhas de rsas serpentes norte e centro americanas, bem como a ralização de seus efeitos por outros agentes, acreditamos contribuido para o maior conhecimento sobre a capacidade ralizante do soro antibotrópico sobre o veneno de serpentes encentes a este gênero.

10- CONCLUSÕES

1- *in vitro* o veneno mostrou-se capaz de induzir alterações sobre coagulação, hemólise e proteólise.

2- As atividades investigadas *in vivo* (mionecrose, hemorragia, edema e permeabilidade capilar), com excessão da desfibrinante sofreram alterações em presença do veneno.

3- O veneno atua de maneira a impedir, de forma irreversível, a resposta do músculo Biventer Cervicis de pintainho frente a estimulação elétrica.

4- O soro polivalente produzido pelo Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica), quando comparado ao produzido pelo Instituto Butantan, frente ao Ensaio Imunoenzimático, apresenta resposta semelhante.

5- Nos testes, onde foi possível comparar o poder neutralizante do soro por pré-incubação e inoculação independente, verificamos a maior eficácia pelo primeiro método, ou seja, pré-incubação.

6- A inoculação independente neutraliza de forma eficiente a toxicidade do envenenamento experimental, embora sua capacidade em neutralizar os danos no local da picada seja extremamente reduzida.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C. F. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópicos e crotálicos: análise de 63 casos. Rev. Inst. Med. Trop. S. P., 28:220-227, 1986.
- AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on neotropical pit-vipers. Contr. Harv. Inst. Trop. Biol. Med., II, 1925
- CALMETTE, A. Les venins, les animaux venimeux et la sorotherapie anti-venimeuse. Masson, 1907.
- CHUGH, K. S. Acute renal failure following snake bite. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24: 692-697, 1975.
- EBASHI, S.; TOYOKURA, Y.; MOMOI, H.; SUGITA, H. High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. J. Biochem. (Tokyo), 46:103, 1959.
- FABIANO, R. & TU, A. T. Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from prairie rattlesnake venom. Biochemistry, 20:21-27, 1981.
- GINSBORG, B. L. Spontaneous activity in muscle fibers of the chick. J. Physiol., 150:707-717, 1960.
- GINSBORG, B. L. & WARRINER, J. The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. Brit. J. Pharmacol., 15:410, 1960.
- GUTIÉRREZ, J. M.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon, 18:603-610, 1980.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *B. asper* por un antiveneno polivalente. Toxicon, 19:493-500, 1981.
- GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, PORTILLA E., CERDAS, L. & ROJAS. Local effects induced by coral snake venoms: Evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. Toxicon, 21:777-783, 1983.
- GUTIÉRREZ, J. M. & CERDAS, L. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. Rev. Biol. Trop., 32:213-222, 1984.

- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. & ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.*, 40:367-379, 1984.
- GUTIÉRREZ, J. M., ROJAS, G. & CERDAS, L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon*, 25:713-7120, 1987.
- GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for the testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, 21:411-413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; ROJAS, G.; ELIZONDO, J.; AVILA, C.; CERDAS, L. Production of monovalent anti-*Bothrops asper* antivenoms: development of immune response in horses and neutralizing ability. *Rev. Biol. Trop.*, 36:511-517, 1989a.
- GUTIÉRREZ, J. M.; GENE, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snakes venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23:887-893, 1989b.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan.*, 51:211-223, 1989c.
- HARRIS, J. B., JOHNSON, M. A. & MacDONELL, C. A. Muscle necrosis induced by some presynaptically active neurotoxins. In D. Eaker & T. Wadstrom (eds.). *Natural Toxins*. Pergamon Press, Oxford. p. 569-578, 1980.
- HOMMA, M.; and TU, A. T. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br. J. Exp. Pathol.*, 52:538, 1971.
- HOUSSAY, B. A. Classification des actions des venins de serpents sur l'organisme animal. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 105: 308-310, 1930.
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jap. J. Med. Sc. Biol.*, 13:43-51, 1960.

- LOBO DE ARAUJO, A.; DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Comparison of the phospholipase A₂, blood-clotting, caseinolytic, estereolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* venoms. *Toxicon*, 28: 601, 1990.
- LOPEZ, M. Tratamento intensivo das complicações do acidente ofídico. *Rev. Ass. Méd. M.G.*, 23:107-112, 1972.
- MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. and REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon*, 22:193-206, 1984.
- MEBS, D. Myotoxic snake venom factors. *Toxicon*, 20:361, 1982.
- MEBS, D.; EHRENFELD, M. and SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to seru creatine kinase. *Toxicon*, 21:393-404, 1983.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, A. R. Thrombin-like and Factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemost.*, 41:313-328, 1979.
- NAKADA, K.; NAKADA, F.; ITO, E. & INOUE, F. Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. *Toxicon*, 22:92-930, 1984.
- OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema forming effects of snake venoms. In: LEE, C. Y. (ed) *Snake Venoms*. Berlin, Springer Verlag, 1979. p. 480.
- OHTANI, Y. & TAKAHASHI, H. Purification of a capillary permeability increasing enzyme from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (kankoku mammushi). *Toxicon*, 21:871-878, 1983.
- OWNBY, C. L. Pathology of rattlesnake envenomation In: A. T. TU (ed) *Rattlesnake Venoms. Their actions and treatment*. Marcel Dekker, New York. pp. 163-209, 1982.
- OWNBY, C. L.; ODELL, G. V.; WOODS, W. M. and COLBERG, T. R. Ability of antiserum to myotoxin from praire rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myotoxicity and lethal effects of myotoxin A and homologous crude venom. *Toxicon*, 21:35-45, 1983.

- 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*, 22:227-233, 1984.
- OWNBY, C. L., COLBERG, T. R. & ODELL, G. V. In vivo ability of antimyotoxin a serum plus polyvalent (*Crotalidae*) antivenom to neutralize prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*, 24:197-200, 1986.
- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R. Classification of myonecrosis induced by snake venoms : venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) western diamond black rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). *Toxicon*, 26:459-474, 1988.
- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of several venoms of snakes in the family Crotalidae. *Toxicon*, 28:189-199, 1990.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H., ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *B. jararaca* snake venom. *Toxicon*, 23:341-345, 1985.
- QUEIROZ, L. S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. and MANDELBAUM, F. R. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 18:337-340, 1985.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGUESE, N.; SECARELLI, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience*, 10:475-489, 1983.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In W. Bucherl & E. Buckley (eds.) *Venemous Animals and Their Venoms, Vol II, Venemous Vertebrates*. Academic Press, New York. pp 345-384, 1971.
- SUOMELA, H. An Ion exchange method for Immunoglobulin G Protein. In *Methods of plasma Protein Fractionation* J. M. Curling (ed.) Academic Press, 1980.
- STEINBECK, A. W. Nephrotic syndrome developing after snakebite. *Med. J. Aust.*, 1:543-545, 1960.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon*, 17:511-515, 1979.

THEAKSTON, R. D. G.; PUGH, R. N. H.; REID, H. A. Enzyme-linked immunosorbent assay of venom-antibodies in human victims of snake bite. *Jour. Trop. Med. Hyg.*, 84:109-112, 1981.

THEAKSTON, R. D. G.; REID, H. A. and IDDON, D. Standardization tests for estimating defibrinating, coagulant, haemorrhagic and necrotizing effects of snake venom. *Toxicon*, 20:363, 1982.

VITAL BRAZIL, O. & EXCEL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 212:34-35, 1971.

VITAL BRAZIL & RANGEL PESTANA, B. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Rev. Med. de São Paulo*, 19,21,22, 1909.