



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
BOTUCATU, SÃO PAULO, BRAZIL

INGRID MAYARA DA CUNHA BRITO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO ANTIVENENO BOTRÓPICO BRASILEIRO:
NOVOS INSIGHTS SOBRE A EFICÁCIA TERAPÊUTICA PARA O
ENVENENAMENTO POR *BOTHRUPS* SP.**

Orientadora: Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

Botucatu - São Paulo
Janeiro/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
BOTUCATU, SÃO PAULO, BRAZIL

INGRID MAYARA DA CUNHA BRITO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO ANTIVENENO BOTRÓPICO BRASILEIRO:
NOVOS INSIGHTS SOBRE A EFICÁCIA TERAPÊUTICA PARA O
ENVENENAMENTO POR *BOTHRUPS SP.***

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade
de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

Botucatu - São Paulo
Janeiro/2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Brito, Ingrid Mayara da Cunha.

Avaliação pré-clínica do antiveneno botrópico brasileiro : novos insights sobre a eficácia terapêutica para o envenenamento por Bothrops sp. / Ingrid Mayara da Cunha Brito. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lucilene Delazari dos Santos
Coorientador: Roberta Jeane Bezerra Jorge
Capes: 90194000

1. Soroterapia. 2. Bothrops. 3. Medicina tropical.
4. Infecções. 5. Antivenenos.

Palavras-chave: Falha terapêutica; Gênero bothrops; Lesão hemorrágica; Soroterapia.

INGRID MAYARA DA CUNHA BRITO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO ANTIVENENO BOTRÓPICO BRASILEIRO:
NOVOS INSIGHTS SOBRE A EFICÁCIA TERAPÊUTICA PARA O
ENVENENAMENTO POR *BOTHRUPS SP.***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Lucilene Delazari dos Santos

Coorientadora: Roberta Jeane Bezerra Jorge

Data da defesa: 28/02/2023

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Prof^a. Dra. Lucilene Delazari dos Santos/ Instituto de Biotecnologia (IBTEC) – UNESP/Botucatu - SP

Membro Titular: Prof^a. Dra. Bruna Cavecci Mendonça /Instituto de Biotecnologia (IBTEC) – UNESP/Botucatu - SP

Membro Titular: Prof^a. Dr. Tiago Lima Sampaio/ Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas / FFOE/Fortaleza – UFC (Participação Virtual)

Local: Universidade Estadual Paulista Faculdade de medicina/ **UNESP – Campus de Botucatu**

Botucatu - São Paulo
Janeiro/2023

Agradecimentos

Expresso aqui minha gratidão em primeiro lugar a Deus, responsável por toda a caminhada realizada até aqui e base na qual minha vida se estabelece.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dra. Lucilene Delazari dos Santos e a minha coorientadora, Prof^a. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge, pela humanidade, características marcantes nas suas atuações profissionais, pela força, paciência e incentivo, pois, sem o apoio das mesmas, não teria chegado até o fim, tampouco conseguido trilhar todo o caminho percorrido por nós, em decorrência dos inúmeros desafios impostos pela vida durante essa jornada.

Agradeço à minha mãe pela confiança depositada em mim e pelos sacrifícios realizados por ela durante toda minha vida, a fim de garantir que a educação fosse seu maior legado.

Agradeço a todos os amigos que me incentivaram a continuar na luta, apesar dos momentos de cansaço e desânimo.

Por fim, justamente por ser mais importante, agradeço a todos que participaram das pesquisas consultadas por mim durante a elaboração deste trabalho, uma vez que se dispuseram a compartilhar seu conhecimento para que esse trabalho fosse possível.

“Quem estará nas trincheiras ao teu lado? – E isso importa? – Mais do que a própria guerra.”

Adeus às Armas, de Ernest Hemingway

Resumo

Na última década o número de acidentes por serpentes no Brasil variou de 26.000 a 30.000 por ano (Sistema de Informação de Agravos e Notificações – SINAN, 2018). Segundo o (SINAN) cerca de 89% a 98% dos casos de acidentes por serpentes no país é representado pelo o gênero *Bothrops*. A soroterapia ainda é o método mais eficiente utilizado para o tratamento de pacientes picados por serpentes. Entretanto, esse método de tratamento exige especificidade, onde ao qual, cada gênero de serpentes tem um antiveneno específico. Além disso, o tratamento pode acarretar algumas reações que podem agravar o quadro clínico do paciente, como choque anafilático, doenças do soro ou até mesmo a não neutralização do veneno. Isso pode estar relacionado a alguns fatores como: quantidade de antiveneno administrado, a velocidade de infusão, sensibilidade do paciente ou até mesmo a exatidão do antiveneno utilizado. Pois sabe-se que nem todos os venenos de espécimes estão inseridos na composição do pool desses antivenenos, o que pode estar relacionado com a possível falha terapêutica em alguns casos de envenenamento. Tendo em vista os adventos e as possíveis complicações causadas pelos os antivenenos utilizados no Brasil, faz-se necessário ensaios experimentais para o entendimento da falha terapêutica e o possível aprimoramento destes antivenenos utilizados. Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar a patogênese local antes e após a utilização da soroterapia modulada pelo veneno de *B. erythromelas* e *B. jararaca*, a partir de análises histológicas, hematológicas, bioquímicas. Para isso, utilizou-se o modelo experimental em murinos (camundongos swiss) fêmeas. Onde realizou-se a injeção de 25ug de veneno intradermicamente no dorso de camundongos, para tratamento após 5 minutos de realizar a lesão hemorrágica, utilizou-se 40 uL de antiveneno *Botrópico* intravenenoso caudal. Após 2 horas foi verificada a resposta hemorrágica antes e após o tratamento. Para obtenção do material biológico a ser analisado, foi realizada pulsão cardíaca para obtenção do sangue, plasma e soro destes animais, aos quais, foram submetidos a análises hematológicas e bioquímicas (colesterol, triglicerídeos, LDL, HDL E VLDL), os tecidos lesionados foram dissecados e submetidos à análise histopatológica. Ambos os venenos induziram um quadro hemorrágico, que foi percebida na hipoderme, causando alterações na pele dos camundongos, o efeito edematogênico comprometeu a junção dermo-epidérmica e degradação de colágeno no tecido lesionado. Além de causar alterações plaquetárias, bioquímicas como os mediadores lipídicos que

podem estimular a resposta imune. O antiveneno botrópico inibiu parcialmente essas alterações, as quais se demonstraram irreversíveis após o tratamento.

Palavras-chaves: Lesão hemorrágica, gênero bothrops, soroterapia, falha terapêutica

Abstract

In the last decade the number of snake accidents in Brazil has ranged from 26,000 to 30,000 per year (Accident and Notification Information System - SINAN, 2018). According to (SINAN) about 89% to 98% of cases of snake accidents in the country is represented by the genus *Bothrops*. Serotherapy is still the most efficient method used for the treatment of snake-bitten patients. However, this method of treatment requires specificity, where each genus of snakes has a specific antivenom. In addition, treatment may lead to some reactions that may aggravate the patient's clinical picture, such as anaphylactic shock, serum diseases or even non-neutralization of the poison. This may be related to some factors such as: amount of antivenom administered, infusion speed, patient sensitivity or even the accuracy of the antivenom used. For it is known that not all poisons of specimens are inserted in the pool composition of these antivenoms, which may be related to possible therapeutic failure in some cases of poisoning. In view of the advents and possible complications caused by the antivenoms used in Brazil, experimental trials are necessary to understand the therapeutic failure and the possible improvement of these antivenoms used. Thus, the present study aimed to investigate the local pathogenesis before and after the use of serotherapy modulated by the venom of *B. erythromelas* and *B. jararaca*, from histological, hematological, biochemical and coagulation tests. For this, the experimental model was used in female murines (Swiss mice). Where, 25ug of poison intradermically was bloodshot in the back of the mice, for treatment after 5 minutes of performing the hemorrhagic lesion, 40 uL of intrapoisinous Botropic Antivenom was used in the tail of the animal. After 2 hours, the hemorrhagic response was verified before and after treatment. To obtain the biological material to be analyzed, cardiac drive was performed to obtain the blood, plasma and serum of these animals, to which hematological and biochemical analyses were subduced, the injured tissues were dissected and submitted to histopathological analysis. Both poisons induced a hemorrhagic picture, which was perceived in the hypodermis, causing changes in the skin of mice, the edematous effect compromised the dermoepidermal junction and collagen degradation in the injured tissue. In addition to causing platelet, biochemical and coagulation cascade changes. Bothropic antivenom partially inhibited these changes, which proved irreversible after treatment.

Keywords: Hemorrhagic injury, genus bothrops, serotherapy, therapeutic failure

Sumário

Introdução.....	10
Referências	19
Hemorrhagic and neutralization activity of <i>Bothrops erythromelas</i> snake venom. 24	
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Seleção e obtenção das amostras do plasma de murinos.....	30
2.2 Animais e envenenamento experimental.....	30
2.3 Análises histológicas	31
2.4 Níveis de hemoglobina e metahemoglobina.....	31
2.5 Análises hematológicas e lipídicas.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
5. REFERÊNCIAS.....	46
Efficacy of Brazilian antivenom to neutralize local hemorrhagic lesion induced by <i>Bothrops jararaca</i>	50
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAIAS E MÉTODOS	54
2.1 Obtenção do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	54
2.2 Animais e envenenamento experimental.....	55
2.3 Medição de hemoglobina e metemoglobina.....	56
2.4 Análise hematológica e lipídica	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
5. REFERÊNCIAS.....	70

Introdução

1 **Introdução**

2 O envenenamento por serpentes tem representado o principal problema de saúde
3 pública negligenciado em países tropicais e subtropicais (Chippaux, 2017; Chippaux et
4 al., 2019; Gutierrez et al., 2017; Longbottom et al., 2018). Injetado através de presas, o
5 veneno desencadeia um amplo espectro de manifestações fisiopatológicas na vítima
6 (Cardoso et al., 2019; Gutierrez et al., 2017) e coopta as vias de sinalização do organismo
7 envenenado para amplificar sua toxicidade (Bickler, 2020).

8 A mistura de toxinas que co-evoluíram com um mecanismo ativo de liberação
9 (glândula e sistema de injeção) são chamadas de “venenos”, uma mistura de proteínas,
10 peptídeos, aminoácidos, entre outros componentes, que interrompem múltiplos processos
11 bioquímicos e biológicos, sendo prejudiciais a outros organismos. Além disso, é
12 reconhecida uma grande variação na composição dos venenos de serpentes, que tem sido
13 atribuída a múltiplos fatores, tais como: pressão evolutiva, distância filogenética e
14 similaridade taxonômica, dieta, desenvolvimento ontogenético, sexo, distribuição
15 geográfica e habitat (Mikheyev et al., 2020; Casewell et al., 2014; Jackson et al., 2016;
16 Amazonas et al., 2018; Casewell et al., 2020).

17 No Brasil, as espécies de serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela
18 maioria de casos de envenenamentos humano (Moreira; Morato, 2014). A fisiopatologia
19 induzida pelo veneno por essas espécies abrange várias manifestações complexas a nível
20 local e sistêmica, entre elas, edema, dor, hemorragia, necrose e distúrbios hemostáticos
21 (Magalhães et al., 2017; Valle et al., 2018) A serpente *Bothrops erythromelas*,
22 comumente chamada “jararaca da seca”, tem sido apontada como o principal agente
23 causador de acidentes ofídicos no Nordeste brasileiro (Oliveira et al., 2010), região onde
24 seus habitantes elencam a espécie como uma das mais perigosas (Fernandes-Ferreira et
25 al., 2012). *B. erythromelas* apresenta em seu veneno cinco principais famílias de toxinas:
26 snake venom metaloproteases (SVMPs), fosfolipases A2 (PLA2), snake venom
27 serinoproteases (SVSPs), lectinas do tipo C (CTL), peptídeos potencializadores de
28 bradicinina (BPP) e desintegrinas (Jorge et al., 2015). Dentre este coquetel químico, as
29 SVMPs são abundantes em seu veneno, assim como relatado para outras espécies de
30 *Bothrops* (Tasoulis; Isbister, 2017) e, responsáveis pela hemorragia no envenenamento
31 (Gutiérrez et al., 2016).

32 O mecanismo da hemorragia induzida por venenos de serpentes tem sido
33 investigado em vários estudos. Os primeiros registros são dados por Lacerda, em 1984

(De Lacerda, 1984), trabalhando no Brasil descreveu os efeitos hemorrágicos induzidos por venenos botrópicos em animais. Em seu relato sobre os efeitos patológicos encontrados experimentalmente, ele relatou: "O tecido celular subcutâneo é todo infiltrado e apresenta de um lugar para outro, manchas pretas, manchas arroxeadas e dispersas, nuances difusas, vivas e muitos extravasamentos sanguíneos. O tecido celular que trabalha os músculos também é infiltrado, tem uma aparência gelatinosa e é mais ou menos encharcado de sangue negro, parcialmente coagulado". Outros esforços dos cientistas em investigarem o processo hemorrágico dos venenos de serpentes viperídeas transpassaram até os dias atuais. Tais investigações deram luz ao conhecimento do mecanismo da atividade supramencionada, descrevendo observações macroscópicas em tecidos afetados e introduzindo a análise histológica de lesões hemorrágicas demonstrando as alterações tissulares em decorrência do envenenamento (Baldo et al., 2010).

Após envenenamento, as SVMPs hemorrágicas localizam-se preferencialmente na membrana basal de vênulas pós-capilares, arteríolas e capilares permanecendo funcionalmente ativas (Herrera et al., 2015). Um evento fundamental para a gênese hemorrágica proposto consiste na degradação dos componentes da membrana basal vascular (Herrera et al., 2015; Gutiérrez et al., 2016), constituída principalmente por colágeno tipo IV, laminina, nidogênio/entactina e perlecan (Kalluri, 2003; LeBleu et al., 2007). Dessa forma, a ação hidrolítica de toxinas do veneno sobre os componentes supramencionados, comprometeria a estabilidade mecânica do endotélio resultando em sangramento (Gutiérrez et al., 2016). Apesar da sólida evidência experimental que sustenta a hipótese de que a degradação da membrana basal é o passo chave na patogênese dos danos nos microvasos, uma visão alternativa emergiu recentemente, baseada na observação de que uma SVMP hemorrágica cliva os receptores relacionados à lipoproteína de baixa densidade 5 e 6 (LRP5 / 6) em células endoteliais, causando uma realocação de VE-caderina e γ -catenina, com a consequente abertura das junções intercelulares e extravasamento (Seo et al., 2017).

Outro mecanismo que parece contribuir para a hemorragia é a incoagulabilidade sanguínea. As toxinas do veneno catalisam a ativação de zimogênios de fatores de coagulação e precursores das integrinas ou receptores o que resulta, consequente, em uma coagulação intravascular disseminada seguida de uma coagulopatias de consumo (Kini; Koh, 2016). Entretanto, a relação entre este fenômeno e a hemorragia ainda não estão bem esclarecidos. SVMPs também interagem com proteínas contendo domínios vWF-A1, através do seu domínio rico em Cys. Isso sugere um mecanismo pelo qual os SVMPs

interferem na adesão plaquetária resultando consequentemente em manifestações hemorrágicas. As SVMPs de classe P-II e P-III apresentam atividade inibitória da agregação plaquetária, sendo que a da classe P-III. A atividade é induzida por clivagem do colágeno. Em adição, estas, interferem a ativação de plaquetas dependentes de vWF por ligação e/ou hidrólise do receptor vWF e GPIb (Sajevic et al., 2011).

Muitas são as especulações e estudos que abordam como temática a gênese hemorrágica deflagrada por venenos de serpentes, no entanto, os eventos moleculares e celulares precisos associados à ruptura dos microvasos permanecem desconhecidos. Um estudo com abordagem proteômica indica a degradação de proteínas da matriz extracelular (principalmente colágenos e proteoglicanos), proteínas citosólicas, do citoesqueleto e ativação de collagenases em lesões hemorrágicas induzidas por um SVMPs. No plasma, evidenciou-se a degradação da fibronectina e presença em maiores concentrações de inibidores da proteinase plasmática (Paes Leme et al., 2017).

Modelos animais foram desenvolvidos para experimentação e seu uso abrange todos os campos da pesquisa biomédica atual. Em Toxinologia, os primeiros experimentos com animais visavam identificar um modelo que se apresentasse como ideal para as manifestações fisiopatológicas de venenos como as observadas em vítimas humanas. Assim, Vital Brazil (1914; 1918) verificou que os venenos Bothrops e Crotalus apresentavam elevada toxicidade para animais de sangue quente, especialmente grandes herbívoros e aves, enquanto porcos e gatos apresentavam resistência a esses venenos. Por via intramuscular, os cavalos apresentaram alta sensibilidade aos venenos Bothrops e Crotalus, induzindo rápida letalidade, não havendo tempo de sobrevivência suficiente para observar reações no local da injeção. Por outro lado, os ovinos também apresentaram alta sensibilidade, letalidade e formação de edema.

Segundo François Jacob (1993) “a abordagem alternativa da história da Biologia envolve a tentativa de descobrir como os objetos se tornam acessíveis à investigação, permitindo então que novos campos científicos sejam desenvolvidos”. Como muitos campos científicos, a “Toxinologia” apareceu como uma ciência descritiva, e as limitações técnicas restringiam o entendimento do mecanismo do veneno. No entanto, a toxinologia evoluiu devido à necessidade de entender como as toxinas agem, como neutralizá-las e como tratar a fisiopatologia induzida, principalmente nos envenenamentos por serpentes, que causam grande número de mortes anualmente em todo o mundo.

101 Apesar de que, durante o envenenamento, múltiplos efeitos tóxicos irrompem
102 simultaneamente no organismo, os estudos experimentais de envenenamento têm se
103 limitado ao uso de conjuntos de testes voltados a um único efeito, sejam alterações locais
104 ou sistêmicas, necessitando de um repertório experimental diversificado, envolvendo
105 modelos para o estudo da dor, edema, lesões hemorrágicas, miotoxidade,
106 neurotoxicidade, entre outros efeitos. Aqui está uma breve descrição das metodologias
107 empregadas para avaliar esses efeitos.

108 O primeiro ensaio para o estudo de lesões hemorrágicas foi desenvolvido em 1960,
109 baseado em um ensaio cutâneo utilizando coelhos como modelo experimental.
110 Previamente (um dia antes do teste), a área dorsal foi submetida a depilação com sulfeto
111 de bário e, uma vez finalizada a depilação, a área correspondente foi esfregada com óleo
112 de zinco. Para o ensaio, foram feitas múltiplas injeções intracutâneas com soluções
113 contendo diferentes quantidades de veneno no mesmo animal, obedecendo a um
114 espaçamento de 2,5 cm entre as injeções, simulando um tabuleiro de xadrez. Os grupos
115 experimentais corresponderam a 2 ou 3 coelhos, e 24 horas após o envenenamento, a pele
116 foi retirada, espalhada e fixada em uma placa de vidro, e os diâmetros horizontais das
117 manchas hemorrágicas foram medidos, obtendo-se uma média entre os 2 diâmetros de
118 uma coloração (Kondo et al., 1960).

119 Mais tarde, com a publicação de “Desenvolvimento de procedimentos de ensaio
120 padrão simples para a caracterização de veneno de serpente”, em 1983, os coelhos foram
121 substituídos por ratos como modelo experimental. Com base no ensaio cutâneo de Kondo
122 et al. (1960), o novo método também se baseava na injeção de diferentes quantidades de
123 veneno na pele dorsal tricotada. No entanto, após 24 horas, os animais foram submetidos
124 à eutanásia, sua pele dorsal foi retirada e o diâmetro da lesão foi medido em duas direções
125 perpendiculares, com auxílio de paquímetro e iluminação de fundo. Além disso, pela
126 primeira vez, falou-se da Dose Hemorrágica Mínima (MHD), definida como a menor
127 quantidade de veneno (peso seco) que causa uma lesão hemorrágica de 10 mm de
128 diâmetro, 24 horas após sua administração (Theakston e Reid, 1983).

129 Em seguida, os modelos hemorrágicos induzidos por venenos tiveram outro salto,
130 em que o MHD passou de cumprir apenas um papel único na caracterização do potencial
131 hemorrágico dos venenos, para um papel de mensuração, na validação de antivenenos
132 para o tratamento dos venenos. Em 1985, o método de Kondo et al. (1960) foi modificado
133 quanto ao tempo de avaliação após o envenenamento e ao modelo animal utilizado. Tal
134 modificação, utilizando camundongos e um tempo de duas horas como parâmetro de

avaliação, tornou-se amplamente utilizada para quantificar o efeito hemorrágico e sua neutralização até os dias atuais. Neste protocolo, diferentes doses de veneno em um volume de 0,1 ml são injetadas por via intradérmica em camundongos e, duas horas após o envenenamento, os animais são sacrificados, sua pele é removida e o halo hemorrágico medido. Os diâmetros são calculados e o MHD permaneceu como a dose de veneno que induziu uma lesão de 10 mm de diâmetro.

Para validar os soros, esse método foi incorporado às Diretrizes da Organização Mundial da Saúde, compondo o repertório de testes “essenciais” e “recomendados” para avaliação pré-clínica de soros. Mas, apesar do trabalho original apresentar dois delineamentos experimentais: (i) experimentos com veneno e incubação do soro antes da injeção e (ii) experimentos com injeção do veneno e posterior administração do soro em diferentes intervalos de tempo após o envenenamento. No entanto, apenas o primeiro tem sido utilizado para identificar o volume/quantidade de antiveneno que causa uma mitigação de 50% da lesão hemorrágica (Gutiérrez et al., 1985).

Apesar de ser um método amplamente utilizado, seu uso tem, entre suas limitações, a precisão na determinação da DMH, uma vez que lesões hemorrágicas com diâmetros semelhantes frequentemente tendem a variar em profundidade e intensidade. Mesmo após ser relatado o possível uso da hemoglobina liberada entre as camadas da pele sobre o halo hemorrágico, tal façanha exige um movimento econômico para a aquisição de reagentes e aparelhos espectrofotométricos adequados. Nesse contexto, Jenkins et al. (2017), considerando a variabilidade de área, profundidade e intensidade da hemorragia, ampliou a metodologia da pele murina, ao sugerir uma análise de quantificação hemorrágica por meio da aplicação de ferramentas computacionais e análise de imagens.

A compreensão sobre venenos de serpentes cresceu exponencialmente na última década, devido ao uso de metodologias combinadas com espectrometria de massas que possibilitaram o conhecimento das composições dos venenos, bem como suas variações inter e intra-específicas. A complexidade dos venenos, aliada às limitações das ferramentas mais convencionais utilizadas para estudar a fisiopatologia dos envenenamentos, representam um verdadeiro desafio a ser superado. No entanto, estamos otimistas de que o progresso em direção a tal entendimento será possível através da aplicação de técnicas “ômicas” para este fim.

A espectrometria de massa, em particular, deu uma grande contribuição para a compreensão da composição dos venenos; no entanto, sua aplicação ao entendimento detalhado de distúrbios em moléculas que estão associadas a processos endógenos

contribuirá para novos conhecimentos. Em última análise, se a nova abordagem e os processos de dissecação específica da via bioquímica mudarem durante o envenenamento por picada de cobra, isso permitirá que os sistemas sejam compreendidos em sua totalidade funcional, desde proteômica, metabolômica e lipidômica, ampliando o conhecimento sobre mecanismos já conhecidos, mas também relatando aqueles além do nosso pensamento. Juntas, “ômicas” baseadas em espectrometria de massa podem gerar novos direcionamentos terapêuticos e desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico e monitoramento.

Paralelamente à expansão da proteômica, o desenvolvimento de instrumentação de espectrometria de massa e ferramentas de investigação de proteínas, também permitiram novas aplicações no campo da 'venômica' (Melani et al., 2017; Patra et al., 2017; Andrade-Silva et al., 2018; Ghezellou et al., 2019). A espectrometria de massa de tempo de voo por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) permite a análise de venenos brutos sem a necessidade de fracionamento, enquanto a análise de veneno por ressonância de ciclotron iônico de transformada de Fourier (FT-ICR) LC/MS/MS expandiu o grau de cobertura do proteoma do veneno (Fox et al., 2006), enquanto FT-ICR MS/MS usando dissociação por captura de elétrons (ECD), dissociação multifóton infravermelho (IRMPD) e dissociação induzida por colisão (CID) têm sido empregadas no estudo de modificações pós-traducionais (revisado por Escoubas et al., 2008).

Os antivenenos têm a função básica de neutralizar a ação das toxinas, presentes nos venenos, que desencadeiam uma série de sintomas fisiológicos nos indivíduos acometidos. São compostos basicamente por anticorpos, ou fragmentos destes que atuam sobre as toxinas do veneno (Gutiérrez, 2017; Laustsen et al., 2018). Os antivenenos são produzidos a partir da imunização de modelos animais, com pools de venenos de certas espécies de serpentes (Gutiérrez, 2019). Em 2019, a OMS lançou uma campanha priorizando o desenvolvimento de novos antivenenos eficazes, acessíveis e de baixo custo (Minghui et al., 2019). Atualmente, existem desafios relacionados à capacidade de neutralização dos antivenenos atuais, que não apresentam todos os anticorpos capazes de reconhecer e neutralizar as proteínas presentes nos venenos. Devido a isso, o desenvolvimento de novas terapias e estudos de venenos mais aprofundados são necessários para o desenvolvimento de novos tratamentos (Calvete et al., 2016; Gómez-Betancur et al., 2019; Alangode et al., 2020).

Como resultado das avaliações pré-clínicas dos antivenenos, é possível obter informações, como a dose efetiva capaz de neutralizar os diversos efeitos tóxicos

induzidos pelos venenos (Habib e Warrell, 2013; Gutiérrez et al., 2017); quais componentes são reconhecidos pelos anticorpos utilizados na produção dos antivenenos; ou que não estejam ligados a anticorpos, possibilitando a caracterização do perfil de reatividade dos antivenenos (Pla et al, 2012). Além dos ensaios pré-clínicos para avaliar a capacidade de neutralização dos soros, nos últimos anos, o desenvolvimento de soros tornou-se mais elaborado, devido à aplicação de ferramentas proteômicas para a análise da imunorreatividade dos soros (Laustsen et al., 2018; Deka, 2019).

Assim, surge a antivenômica, empregando ferramentas proteômicas para identificar proteínas de veneno que carregam epítomos reconhecidos por soro específico (Calvete, et al., 2009). Um pré-requisito para a execução de antivenenos é a caracterização dos proteomas do veneno a serem analisados (Whiteley, 2019). Em seguida, é necessário classificar amplamente o perfil de toxinas dos venenos de interesse, sendo essencial a aplicação de estudos de proteômica (Bermúdez-Méndez et al., 2018).

A antivenômica tem proporcionado uma melhor investigação do perfil imunológico dos antivenenos, permitindo a quantificação da reatividade quanto aos venenos homólogos e heterólogos, seguindo protocolos baseados em análises proteômicas (Lomonte et al, 2008; Calvete et al., 2018). Juntamente com os ensaios pré-clínicos de neutralização padrão, os antivenenos representam uma ferramenta importante para avaliar a possível adequação e o alcance da aplicação clínica de antivenenos comerciais ou experimentais (Gutiérrez, 2013; Calvete et al, 2016). Além disso, auxilia na determinação da quantidade de antiveneno necessária para neutralizar os efeitos desencadeados pelo veneno (Pla., et al 2019).

A antivenômica de primeira geração consiste na imunoprecipitação ou imunodepleção in vitro de uma solução contendo complexos antígeno-anticorpo (Calvete, 2009). De acordo com o protocolo original para antivenenos de primeira geração, após a determinação proteômica da fração de toxina que permanece solúvel após a imunoprecipitação, a imunorreatividade do soro pode ser inferida diretamente (Pla et al., 2012), sendo possível identificar proteínas em condições cromatográficas idênticas de venenos (Calvete et al., 2007). No entanto, a aplicação do protocolo antiveneno de primeira geração foi recomendada principalmente para o perfil imunológico de soros antivenenos IgG inteiros.

Apesar de demonstrar sua utilidade em muitos projetos que reconheceram múltiplos antivenenos homólogos e heterólogos, a técnica de imunodepleção é um fator limitante para a exploração detalhada de antivenenos (Calvete et al, 2009; Pla et al., 2012). Dessa

forma, o protocolo de primeira geração foi redesenhado em 2012 para incluir a avaliação de antivenenos baseados em Fab e Fab2 (Pla et al., 2012). O grande diferencial desta atualização foi a imobilização das moléculas do soro antiofídico em uma matriz cromatográfica, para gerar uma coluna de imunoafinidade.

A segunda geração de antivenômica é baseada na cromatografia de afinidade, que produz traços cromatográficos mais leves do que o protocolo de imunodepleção original, fornecendo uma descrição mais detalhada das proteínas ligantes e não ligantes do veneno (Pla et al., 2012; Sintiprungrat et al., 2016). Inicialmente, as moléculas do soro são imobilizadas em uma matriz cromatográfica, após o uso de uma coluna contendo Sepharose, em seguida, um tampão de acoplamento é disposto à coluna, juntamente com IgG e moléculas específicas do soro (Calvete et al., 2018).

Por meio da cromatografia de afinidade, é possível analisar Fab2 antiveneno e reutilizar colunas de afinidade, o que permite maior reprodutibilidade e economia. No entanto, limitações ainda são encontradas, uma vez que as frações do veneno não podem se ligar à coluna de afinidade (Pla; Gutiérrez; Calvete, 2012; Sintiprungrat et al, 2016). Após a incubação do soro antiofídico com o veneno de interesse, é possível obter as frações eluídas (imunocapturadas), ou seja, proteínas que foram retiradas da coluna devido a sua afinidade pelas moléculas do soro antiofídico ou frações não retidas (não imunocapturadas) ou não imunogênicas proteínas analisadas por HPLC. Esta técnica permite obter resultados qualitativos e quantitativos de conjuntos de proteínas de veneno homólogas e heterólogas que exibem epítomos reconhecidos pelo antiveneno e aqueles que apresentam imunorreatividade prejudicada (Pla et al., 2012; Pla et al., 2017). Dessa forma, fornece informações diretas sobre toxinas ligadas e não ligadas previamente caracterizadas, com base na imunoafinidade do soro antiofídico estudado. Essas atualizações permitiram uma melhor resolução e uma quantificação mais precisa de um perfil de imunoreconhecimento do antiveneno do que o protocolo de imunodepleção original.

A antivenômica de terceira geração é um método mais refinado e sensível (Deka et al, 2019; Pla et al, 2019). Essa geração de antivenenos permite uma melhor indicação da capacidade máxima de ligação do antiveneno para neutralizar as toxinas do veneno, bem como a quantificação da fração de anticorpos específicos para toxinas presentes no antiveneno. Então, por meio de equações específicas, é possível quantificar a fração de moléculas de antiveneno com imunoafinidade contra toxinas de veneno. e outros, 2019). Essa geração de antivenenos indica maior precisão e quantificação por toxina resolvida

com base em perfil imunológico reconhecido, bem como sua capacidade máxima de ligação ao veneno e o cálculo da fração de moléculas antiveneno específicas das toxinas. Esses parâmetros fornecem forte suporte para a identificação de antivenenos com potencial terapêutico mais adequado (Laustsen et al., 2015).

Referências

- Alangode, A., Rajan, K., Nair, B. G., 2020. Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. *Biochemical Pharmacology*. 181, 114135. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114135>.
- Amazonas, D. R., Portes-Junior, J. A., Nishiyama-Jr, M. Y., Nicolau, C. A., Chalkidis, H. M., Mourão, R. H. V., Moura-da-Silva, A. M., 2018. Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. *Journal of Proteomics*. 181 (15), 60-72. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.032>
- Andrade-Silva, D., Ashline, D., Tran, T., Lopes, A. S., Travaglia Cardoso, S. R., Reis, M. da S., Reinhold, V., 2018. Structures of N-Glycans of Bothrops Venoms Revealed as Molecular Signatures that Contribute to Venom Phenotype in Viperid Snakes. *Molecular Cellular Proteomics*. 17 (7), 1261-1284. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000748>.
- Baldo, Cristiani, et al. "Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis." *PLoS neglected tropical diseases* 4.6 (2010): e727.
- Bermúdez-Méndez, E., Fuglsang-Madsen, A., Føns, S., Lomonte, B., Gutiérrez, J., Laustsen, A., 2018. Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. *Toxins*. 10 (11), 452 . <https://doi.org/10.3390/toxins10110452>.
- Bickler, P. E., 2020. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling Pathways. *Toxins*. 12 (2), 68. <https://doi.org/10.3390/toxins12020068>.
- Brazil, V., 1914. La défense contre l'ophidisme, 1th ed. Pocaí Weiss, Saint-Paul.
- Brazil, V., Rangel Pestana, B., 1918. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Tyo Diario Oficial*. 149-193.
- Calvete, J. J., Arias, A. S., Rodríguez, Y., Quesada-Bernat, S., Sánchez, L. V., Chippaux, J. P., Gutiérrez, J. M., 2016. Preclinical evaluation of three polyspecific antivenoms against the venom of *Echis ocellatus*: Neutralization of toxic activities and antivenomics. *Toxicon*. 119, 280-288 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.022>.
- Calvete, J. J., Juárez, P., Sanz, L., 2007. Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*. 42 (11), 1405-1414. <https://doi.org/10.1002/jms.1242>.
- Calvete, J. J., Rodríguez, Y., Quesada-Bernat, S., Pla, D., 2018. Toxin-resolved antivenomics-guided assessment of the immunorecognition landscape of antivenoms. *Toxicon*. 148, 107-122. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.015>.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., 2009. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Letters*. 583 (11), 1736-1743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., 2009. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Letters*. 583 (11), 1736-1743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>.
- Casewell, N. R., Wagstaff, S. C., Wuster, W., Cook, D. A. N., Bolton, F. M. S., King, S. I., Harrison, R. A., 2014. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (25), 9205-9210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>.

- Casewell, Nicholas R., Jackson, T. N. W., Laustsen, A. H., Sunagar, K., 2020. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 41 (8), 570-581. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>.
- Chippaux, J.-P., 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 23, 38. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>.
- Chippaux, J.-P., Massougboji, A., Habib, A. G., 2019. The WHO strategy for prevention and control of snakebite envenoming: a sub-Saharan Africa plan. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 25, e20190083. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0083>
- De Lacerda, J.B. *Leçons sur le Venin des Serpents du Brésil*; Lombaerts: Rio de Janeiro, Brasil, 1884. (In French)
- Deka, A., Gogoi, A., Das, D., Purkayastha, J., Doley, R., 2019. Proteomics of *Naja kaouthia* venom from North East India and assessment of Indian polyvalent antivenom by third generation antivenomics. *Journal of Proteomics*. 207, 103463. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103463>.
- Escoubas, P., Quinton, L., Nicholson, G. M., 2008. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 43 (3), 279-295. <https://doi.org/10.1002/jms.1389>.
- Fernandes-Ferreira, Hugo, et al. "Crenças associadas a serpentes no estado do Ceará, Nordeste do Brasil." *Sitientibus* 11.2 (2012): 153-163.
- Fox, J. W., Ma, L., Nelson, K., Sherman, N. E., Serrano, S. M. T., 2006. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*. 47 (6), 700-714. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.022>.
- Ghezellou, P., Garikapati, V., Kazemi, S. M., Strupat, K., Ghassempour, A., Spengler, B., 2019. A perspective view of top-down proteomics in snake venom research. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 33 (S1), 20-27. <https://doi.org/10.1002/rcm.8255>.
- Gómez-Betancur, I., Gogineni, V., Salazar-Ospina, A., León, F., 2019. Perspective on the Therapeutics of Anti-Snake Venom. *Molecules*. 24 (18), 3276. <https://doi.org/10.3390/molecules24183276>.
- Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., Warrell, D. A., 2017. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*. 3 (1), 17063. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>.
- Gutiérrez, José María, Gené, J., Rojas, G., Cerdas, L., 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 23 (6), 887-893. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90380-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90380-0).
- Gutiérrez, José, et al. "A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming." *Toxins* 8.10 (2016): 304.
- Gutiérrez, José, et al. "Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding." *Toxins* 8.4 (2016): 93.

363 Gutiérrez, José, et al. "Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey
364 of discovery and understanding." *Toxins* 8.4 (2016): 93.

365 Gutiérrez, José, Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, Á., Vargas, M., Calvete, J.,
366 2017. Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming:
367 State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins*. 9 (5), 163.
368 <https://doi.org/10.3390/toxins9050163>.

369 Gutiérrez, José., 2019. Global Availability of Antivenoms: The Relevance of Public
370 Manufacturing Laboratories. *Toxins*. 11 (1), 5. <https://doi.org/10.3390/toxins11010005>.

371 Habib, A. G., Warrell, D. A., 2013. Antivenom therapy of carpet viper (*Echis ocellatus*)
372 envenoming: Effectiveness and strategies for delivery in West Africa. *Toxicon*. 69, 82-
373 89. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.002>.

374 Herrera, Cristina, et al. "Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI,
375 PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced
376 hemorrhage." *PLoS neglected tropical diseases* 9.4 (2015): e0003731.

377 Jackson, T., Koludarov, I., Ali, S., Dobson, J., Zdenek, C., Dashevsky, D., Fry, B., 2016.
378 Rapid Radiations and the Race to Redundancy: An Investigation of the Evolution of
379 Australian Elapid Snake Venoms. *Toxins*. 8 (11), 309.
380 <https://doi.org/10.3390/toxins8110309>.

381 Jacob, F., 1993. The logic of life: A history of heredity. Princeton University Press, New
382 Jersey.

383 Jenkins, T. P., Sánchez, A., Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T. K., Gutiérrez,
384 J. M., 2017. An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage
385 in a murine model. *Toxicon*. 139, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.005>.

386 Jorge, Roberta Jeane B., et al. "Venomics and antivenomics of Bothrops erythromelas
387 from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern
388 Brazil." *Journal of proteomics* 114 (2015): 93-114.

389 Kalluri, Raghu. "Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in
390 tumour angiogenesis." *Nature Reviews Cancer* 3.6 (2003): 422.

391 Kini, R., and Cho Koh. "Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and
392 platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction
393 sites." *Toxins* 8.10 (2016): 284.

394 Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., Ohsaka, A., 1960. studies on the
395 quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom.
396 Japanese Journal of Medical Science and Biology. 13 (1-2), 43-51.
397 <https://doi.org/10.7883/yoken1952.13.43>.

398 Laustsen, A. H., Lohse, B., Lomonte, B., Engmark, M., Gutiérrez, J. M., 2015. Selecting
399 key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by
400 a Toxicity Score. *Toxicon*. 104, 43-45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.334>.

401 Laustsen, A. H., María Gutiérrez, J., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermúdez-Méndez,
402 E., Cerni, F. A., Pucca, M. B., 2018. Pros and cons of different therapeutic antibody
403 formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*. 146, 151-175.
404 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.03.004>.

405 LeBleu, Valerie S., Brian MacDonald, and Raghu Kalluri. "Structure and function of
406 basement membranes." *Experimental biology and medicine* 232.9 (2007): 1121-1129.

407 Lomonte, B., Escolano, J., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., Calvete,
408 J. J., 2008. Snake Venomics and Antivenomics of the Arboreal Neotropical Pitvipers
409 *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of Proteome Research*. 7 (6),
410 2445-2457. <https://doi.org/10.1021/pr8000139>.

411 Longbottom, J., Shearer, F. M., Devine, M., Alcoba, G., Chappuis, F., Weiss, D. J., Pigott,
412 D. M., 2018. Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. *The*
413 *Lancet*. 392 (10148), 673-684. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31224-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31224-8).

414 Magalhães, Hemerson Iury, et al. "Relato de acidente botrópico que resultou em
415 amputação." *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade* 10.1 (2017).

416 Melani, R. D., Nogueira, F. C. S., Domont, G. B., 2017. It is time for top-down venomics.
417 *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 23 (1), 44.
418 <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0135-6>.

419 Minghui, R., Malecela, M. N., Cooke, E., Abela-Ridder, B., 2019. Who's snakebite
420 envenoming strategy for prevention and control. *The Lancet Global Health*. 7 (7), e837-
421 e838. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30225-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30225-6).

422 Moreira, João Paulo Lima, and Rúbia Gomes Morato. "Incidência e ocorrência de ataques
423 ofídicos no Brasil em 2012." *Simpósio Mineiro de Geografia* 1 (2014).

424 Oliveira, Fagner Neves, et al. "Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the
425 State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects." *Revista da Sociedade Brasileira*
426 *de Medicina Tropical* 43.6 (2010): 662-667.

427 Paes Leme, Adriana F., et al. "Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom
428 metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood
429 plasma." *Journal of proteome research* 11.1 (2011): 279-291.

430 Patra, A., Kalita, B., Chanda, A., Mukherjee, A. K., 2017. Proteomics and antivenomics
431 of *Echis carinatus carinatus* venom: Correlation with pharmacological properties and
432 pathophysiology of envenomation. *Scientific Reports*. 7 (1), 17119.
433 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17227-y>.

434 Pla, D., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., 2012. Second generation snake antivenomics:
435 Comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon*. 60 (4), 688-699.
436 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.342>

437 Pla, D., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., 2012. Second generation snake antivenomics:
438 Comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon*. 60 (4), 688-699.
439 <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.342>

440 Pla, D., Rodríguez, Y., Resiere, D., Mehdaoui, H., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., 2019.
441 Third-generation antivenomics analysis of the preclinical efficacy of Bothrofav®
442 antivenom towards *Bothrops lanceolatus* venom. *Toxicon*: X. 1, 100004.
443 <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2018.100004>.

444 Sajevic, Tamara, Adrijana Leonardi, and Igor Križaj. "Haemostatically active proteins in
445 snake venoms." *Toxicon* 57.5 (2011): 627-645.

446 Seo, Tadahiko, et al. "Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAM
 447 s cleave LRP 5/6, which disrupts cell–cell adhesions in vitro and induces haemorrhage in
 448 vivo." *The FEBS journal* 284.11 (2017): 1657-1671.

449 Sintiprungrat, K., Chaisuriya, P., Watcharatanyatip, K., Ratanabanangkoon, K., 2016.
 450 Immunoaffinity chromatography in antivenomics studies: Various parameters that can
 451 affect the results. *Toxicon*. 119, 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.017>.

452 Theakston, R. D. G., Reid, H. A., 1983. Development of simple standard assay procedures
 453 for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the world health organization*, 61
 454 (6), 949. PMID: 6609011 PMCID: PMC2536230.

455 Valle, Luísa Abero, et al. "Amputação bilateral de extremidades inferiores após acidente
 456 botrópico grave: relato de um caso." *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de*
 457 *Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo* 53.2 (2018): 81-84.

458 Whiteley, G., Casewell, N. R., Pla, D., Quesada-Bernat, S., Logan, R. A. E., Bolton, F.
 459 M. S., Harrison, R. A., 2019. Defining the pathogenic threat of envenoming by South
 460 African shield-nosed and coral snakes (genus *Aspidelaps*), and revealing the likely
 461 efficacy of available antivenom. *Journal of Proteomics*. 198, 186-198.
 462 <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.019>

Hemorrhagic and neutralization activity of *Bothrops erythromelas* snake venom.

Ingrid Mayara Cunha de Brito ¹, Joeliton S. Cavalcante ^{1,2}, Cayo Almeida ³, Ivynna
Suellen J. Vidal ⁴, Bruno César Rossini ⁵, Renata Sousa Alves ⁶, Roberta Jeane Bezerra
Jorge⁷, Lucilene Delazari dos Santos ^{1,5,8*}

¹ Graduate Program in Tropical Diseases, Botucatu Medical School (FMB), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

² Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

³ Center of Mathematics, Computing Sciences and Cognition, Federal University of ABC, São Paulo, SP, Brazil.

⁴ Graduate Program in Translational Medicine, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil

⁵ Biotechnology Institute (IBTEC), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

⁶ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-160, Brazil.

⁷ Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil.

⁸ Graduate Program in Medical Biotechnology (Research and Development), Botucatu School of Medicine (FMB), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Autor correspondente

Resumo

Popularmente conhecida como jararaca-da-seca a espécie *Bothrops erythromelas*, é uma serpente endêmica da Caatinga brasileira. O envenenamento pelo gênero *Bothrops* é conhecido por causar distúrbios de hemostasia, dor local, eritema, edema, equimose e em casos mais graves distúrbios renais e até necrose do membro afetado. O tratamento consiste na administração do antiveneno botrópico. O antiveneno se apresenta eficaz na neutralização dos processos fisiopatológicos e sistêmicos, porém ineficaz no tratamento dos danos tissulares. Tendo em vista a importância de tais fatores citados anteriormente para a patologia do envenenamento, o presente estudo teve por objetivo investigar os processos hematológicos, histopatológicos e bioquímicos causados pelo veneno de *B. erythromelas* antes da soroterapia e após o tratamento com o antiveneno botrópico. Para isso, utilizaram-se testes de lesão hemorrágica (in vivo). Foram realizadas injeções de 25ug do veneno de *B. erythromelas* intradermicamente no dorso de camundongos swiss, os animais foram separados em três grupos, grupo controle salina (n=6) grupo envenenados (n=6) e grupos envenenados e tratados (n=6) com soro antibotrópico, os grupos de animais que foram tratados receberam 40uL de soro (intravenoso) via caudal. Após o período de 2 horas os animais foram anestesiados e eutanasiados via pulsão cardíaca, sendo coletado o sangue destes para as análises bioquímicas e hematológicas. De forma complementar, tecidos lesionados foram dissecados e submetidos à análise histopatológica. Como resultado observou-se hemorragia deflagrada, principalmente, na hipoderme. O efeito hemorrágico no tecido lesionado foi discretamente neutralizado pelo o antiveneno. Os dados hematológicos demonstraram alterações plaquetárias e na cascata de coagulação, já as análises bioquímicas demonstraram pequenas alterações no colesterol total e triglicerídeos. Após o tratamento os animais apresentaram poucas alterações na lesão formada, porém apresentaram alterações nos testes de coagulação e hematológico, sendo o antiveneno incapaz de inibir totalmente o efeito hemorrágico do veneno de *B. erythromelas*.

Palavras-chave: jararaca da seca, hemorrágico, antiveneno, danos tissulares, coagulação

Abstract

Popularly known as jararaca-da-seca the species *Bothrops erythromelas*, is a snake endemic to the Brazilian Caatinga. *Bothrops* poisoning is known to cause disorders of hemostasis, local pain, erythema, edema, ecchymosis and in more severe cases of the affected limb. Treatment consists of the administration of bothropic antivenom. Antivenom is effective in neutralizing pathophysiological and systemic processes, but ineffective in the treatment of tissue damage. In view of the importance of such factors mentioned earlier for the pathology of poisoning, the present study aimed to investigate the hematological, histopathological and biochemical processes caused by the poison of *B. erythromelas* before serotherapy and after treatment with botropic antivenom. For this, hemorrhagic injury tests (in vivo) were used. Injections of 25ug of *B. erythromelas* venom were performed intradermally into the back of Swiss mice, the animals were separated into three groups, saline control group (n=6) poisoned group (n=6) and enonandant and treated groups (n=6) with antibotrophic serum, groups of animals that were treated received 40uL of serum (intravenous) via caudal. After the 2-hour period, the animals were anesthetized and euthanized via cardiac drive, and their blood was collected for biochemical and hematological analyses. In addition, injured tissues were dissected and submitted to histopathological analysis. As a result, hemorrhage was observed, mainly, in the hypomendum. The hemorrhagic effect on the injured tissue was mildly neutralized by the antivenom. Hematological data showed platelet and coagulation cascade alterations, while biochemical analyses showed small changes in total cholesterol and triglycerides. After treatment, the animals presented few alterations in the formed lesion, however, they showed changes in the coagulation and hematological tests, antivenom is unable to fully inhibit the hemorrhagic effect of *B. erythromelas* venom.

Keywords: jararaca da seca, haemorrhagic, antivenom, damage to the liver, coagulation

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as espécies de serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria de casos de envenenamentos humano (Moreira, 2014). A fisiopatologia induzida pelo veneno por essas espécies abrange várias manifestações complexas a nível local e sistêmica, entre elas, edema, dor, hemorragia, necrose e distúrbios hemostáticos (Magalhães et al., 2017; Valle et al., 2018). A serpente *Bothrops erythromelas*, comumente chamada “jararaca da seca”, tem sido apontada como o principal agente causador de acidentes ofídicos no Nordeste brasileiro (Oliveira et al., 2010), região onde seus habitantes elencam a espécie como uma das mais perigosas (Fernandes-Ferreira et al., 2012). *B. erythromelas* apresenta em seu veneno cinco principais famílias de toxinas: snake venom metaloproteases (SVMPs), fosfolipases A2 (PLA2), snake venom serinoproteases (SVSPs), lectinas do tipo C (CTL), peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) e desintegrinas (Jorge et al., 2015). Dentre este coquetel químico, as SVMPs são abundantes em seu veneno, assim como relatado para outras espécies de *Bothrops* (Gay et al., 2016; Gonçalves-Machado et al., 2016; Tasoulis & Isbister, 2017), responsáveis pela hemorragia no envenenamento (Gutiérrez et al., 2016).

O mecanismo da hemorragia induzida por venenos de serpentes tem sido investigado em vários estudos. Os primeiros registros são dados por Lacerda, (1984), trabalhando no Brasil descreveu os efeitos hemorrágicos induzidos por venenos botrópicos em animais. Em seu relato sobre os efeitos patológicos encontrados experimentalmente, ele relatou: "O tecido celular subcutâneo é todo infiltrado e apresenta de um lugar para outro, manchas pretas, manchas arroxeadas e dispersas, nuances difusas, vivas e muitos extravasamentos sanguíneos. O tecido celular que trabalha os músculos também é infiltrado, tem uma aparência gelatinosa e é mais ou menos encharcado de sangue negro, parcialmente coagulado". Outros esforços dos cientistas em investigarem

o processo hemorrágico dos venenos de serpentes viperídeas transpassaram até os dias atuais. Tais investigações deram luz ao conhecimento do mecanismo da atividade supramencionada, descrevendo observações macroscópicas em tecidos afetados e introduzindo a análise histológica de lesões hemorrágicas demonstrando as alterações tissulares em decorrência do envenenamento (Baldo et al., 2010).

Após envenenamento SVMPs hemorrágicas localizam-se preferencialmente na membrana basal de vênulas pós-capilares, arteríolas e capilares permanecendo funcionalmente ativas (Herrera et al., 2015). Um evento fundamental para a gênese hemorrágica proposto consiste na degradação dos componentes da membrana basal vascular (Herrera et al., 2015; Gutiérrez et al., 2016), constituída principalmente por colágeno tipo IV, laminina, nidogênio/entactina e perlecan (Kalluri, 2003; LeBleu, 2007). Dessa forma, a ação hidrolítica de toxinas do veneno sobre os componentes supramencionados, comprometeria a estabilidade mecânica do endotélio resultando em sangramento (Gutiérrez et al., 2016)

Apesar da sólida evidência experimental que sustenta a hipótese de que a degradação da membrana basal é o passo chave na patogênese dos danos nos microvasos, uma visão alternativa emergiu recentemente, baseada na observação de que uma SVMP hemorrágica cliva os receptores relacionados à lipoproteína de baixa densidade 5 e 6 (LRP5 / 6) em células endoteliais, causando uma realocação de VE-caderina e γ -catenina, com a consequente abertura das junções intercelulares e extravasamento (Seo et al., 2017). Outro mecanismo que parece contribuir para a hemorragia é a incoagulabilidade sanguínea. As toxinas do veneno catalisam a ativação de zimogênios de fatores da coagulação e precursores das integrinas ou receptores o que resulta, consequente, em uma coagulação intravascular disseminada seguida de uma coagulopatias de consumo (Kini; koh, 2016). Entretanto, a relação entre este fenômeno e a hemorragia ainda não estão bem

esclarecidos. SVMPs também interagem com proteínas contendo domínios vWF-A1, através do seu domínio rico em Cys. Isso sugere um mecanismo pelo qual os SVMPs interferem na adesão plaquetária resultando consequentemente em manifestações hemorrágicas. As SVMPs de classe P-II e P-III apresentam atividade inibitória da agregação plaquetária, sendo que a da classe P-III. A atividade é induzida por clivagem do colágeno. Em adição, estas, interferem a ativação de plaquetas dependentes de vWF por ligação e/ou hidrólise do receptor vWF e GPIb (Sajevic, 2011).

Muitas são as especulações e estudos que abordam como temática a gênese hemorrágica deflagrada por venenos de serpentes, no entanto, os eventos moleculares e celulares precisos associados à ruptura dos microvasos permanecem desconhecidos. Um estudo com abordagem proteômica indica a degradação de proteínas da matriz extracelular (principalmente colágenos e proteoglicanos), proteínas citosólicas, do citoesqueleto e ativação de collagenases em lesões hemorrágicas induzidas por um SVMPs. No plasma, evidenciou-se a degradação da fibronectina e presença em maiores concentrações de inibidores da proteinase plasmática (Paes Leme et al., 2011).

A necessidade de se obter um conhecimento mais detalhado a neutralização dos efeitos locais, e se obter um indicador para o monitoramento da resposta terapêutico do indivíduo ao antiveneno nos levou a estudar o plasma de camundongos envenenados por *B. erythromelas* para avaliar a eficácia do antiveneno na neutralização da hemorragia local causada por esse veneno. Este estudo propôs identificar quais proteínas e processos biológicos são alterados no plasma de camundongos em resposta ao veneno e ao tratamento com antiveneno. Nosso estudo oferece novos insights moleculares sobre a gênese da lesão hemorrágica causada pelo veneno de *B. erythromelas*, sua neutralização e as limitações do antiveneno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção e obtenção das amostras do plasma de murinos

Para isolar o plasma, maximizar a pureza da amostra, minimizar a lise dos glóbulos vermelhos e acomodar o deslocamento de órgãos de tumores, a cavidade torácica dos animais foram abertas e usando uma agulha de calibre 23 milímetros. Em torno de 500-700 µL de sangue foram coletados de cada animal por punção cardíaca. O sangue foi imediatamente transferido para tubos contendo EDTA ou citrato de sódio e foram mantidos em banho de gelo. Para obtenção de plasma, tubos com o sangue EDTA ou citrato de sódio foram centrifugados a 1.000 rpm por 10 min à 4 ° C. Para as análises por espectrometria de massas 10µL a cada duas amostras de plasma foram agrupadas, ou seja, amostras de dois animais formaram um pool (3 repetições biológicas por grupo experimental) e o restante foram estocados em freezer -80 o C. O número de amostras utilizados no agrupamento foi realizado na combinação de duas amostras levando em consideração a (i) redução do efeito da variabilidade biológica, uma vez que resulta em média biológica para proteínas e menor variabilidade geral e (ii) evitar que amostras específicas pudessem dominar o sinal de todo o seu pool (Maes et al., 2016).

2.2 Animais e envenenamento experimental

Para identificar o perfil neutralizante do antiveneno brasileiro frente a lesão hemorrágica causada pelo veneno de *B. erythromelas*, três grupos amostras foram adotados nesta investigação de forma similar aos estudos de Rucavado et al., 2011: (i) GC – grupo controle (n=6 animais) que receberam 15 uL de salina estéril à 0,9% (m/v); (ii) GV – grupo envenenado com 25µg de veneno em 15µL de salina estéril à 0,9% (m/v) e (ii) GA – grupo tratado com antiveneno botrópico pentavalente comercial (fabricante Instituto Vital Brasil) (n=6 animais), onde os animais que receberam 40 µL do antiveneno cinco minutos após a injeção de 25µg de veneno de *B. erythromelas* em 15µL de salina

estéril à 0,9% (m/v). Após a incubação, a mistura foi injetada via intradérmica no dorso dos camundongos. Após duas horas das injeções, os camundongos foram anestesiados com ketamina e xilazina e o sangue foi coletado via punção cardíaca. Os procedimentos experimentais com os animais foram aprovados pelo Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA, do Núcleo de Pesquisa de Novos Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará sob número 03090221-0).

2.3 Análises histológicas

As regiões que receberam as injeções indicadas anteriormente e que continham halos hemorrágicos, foram excisadas, cortados em duas metades no meio e uma parte fixado em solução de formol a 10% (v/v).

Os tecidos correspondentes ao sítio de injeção do veneno e suas áreas adjacentes foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% (v/v) (PFA) suplementada com 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4) submetidas à uma bateria de desidratação em soluções crescentes de álcool etílico e, por fim, diafanizadas em xilol, emblocadas em parafina e submetidas à microtomia. Posteriormente os cortes de 5 µm foram processados rotineiramente para coloração utilizando Hematoxilina/Eosina e Tricômico de Masson e analisados por microscopia óptica de luz, microscópio optico ZEISS AXIO LAB.A1 com câmera digital AxioCam MRc. Todo o diagnóstico foi realizado em objetiva óptica com aumento de 10X.

2.4 Níveis de hemoglobina e metahemoglobina

A outra parte do halo hemorrágico foi fragmentado e homogeneizado com 2 mL de água Mili-Q para extração de hemoglobina de acordo com Félix-Silva e colaboradores (2017). Após incubação por 48 h à 8°C, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 16000x g por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL deste sobrenadante foi centrifugado a 16000xg por 30 min à 4°C. Por fim, o sobrenadante

204 límpido obtido foi lido a 540 nm e 630nm em um leitor de microplacas utilizando água
205 Mili-Q. Essas porcentagens de hemoglobina oxidados a metemoglobina foram calculados
206 de acordo com a equação (Naoum & Moraes, 2004). A hemorragia foi expressa como o
207 conteúdo de hemoglobina extraída do halo hemorrágico excisado formado após a injeção
208 subcutânea de veneno. As amostras de cada animal foram analisadas em triplicata e a
209 média dessas determinações foi utilizada para expressar o resultado como média $\pm$ erro
210 padrão da média.

211 *2.5 Análises hematológicas e lipídicas*

212 As amostras de sangue contendo EDTA foram analisadas em um contador
213 hematológico automatizado BC-5000 (Mindray®). Os parâmetros medidos incluíram
214 contagem de glóbulos vermelhos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT),
215 volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM),
216 concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), contagem de glóbulos
217 brancos (WBC), neutrófilos (Neu), linfócitos (Lym) e plaquetas (PLT). Além disso,
218 amostras de soro foram usadas para medir colesterol, triglicerídeos, colesterol de
219 lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol de lipoproteína de baixa densidade
220 (LDL) e colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade (VDL). A análise estatística
221 foi realizada por meio do teste T, one Way-ANOVA, seguido do teste de comparação
222 múltipla ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É sabido que nos casos de envenenamento humano por *B. erythromelas*, manifestações hemorrágicas sistêmicas nos pacientes ocorrem mesmo após a soroterapia e, dessa forma, isto nos motivou a estudar a neutralização frente o efeito hemorrágico causado por esse veneno. A dose mínima hemorrágica (MHD) do veneno de *B. erythromelas* é estimada em 5.0µg, mas para estudos da neutralização do efeito hemorrágico por antivenenos, utiliza-se uma dose de desafio de veneno correspondente a cinco MHDs (Gutiérrez et al., 2017).

Assim, validou-se, inicialmente, a alteração deflagrada pela a salina que apresentou apenas um pequeno ponto hemorrágico no local da injeção (Figura 1) no grupo controle. Essa alteração foi observada na amostra durante o tempo estabelecido (Figura 1A). Após verificar que a salina solução utilizada para a dissolução do veneno não induziu hemorragia, procedeu-se a investigação das amostras com injeção do veneno. Já no grupo experimental com veneno, uma intensa hemorragia pode ser observada após duas horas da injeção do veneno (Figura 1 B). Para estimarmos a área das lesões induzidas pelo veneno, utilizou-se ferramentas computacionais. Desta forma, verificamos que a área hemorrágica variou entre 93 mm² e 233 mm² (Figura 1 C) entre os intervalos observados.

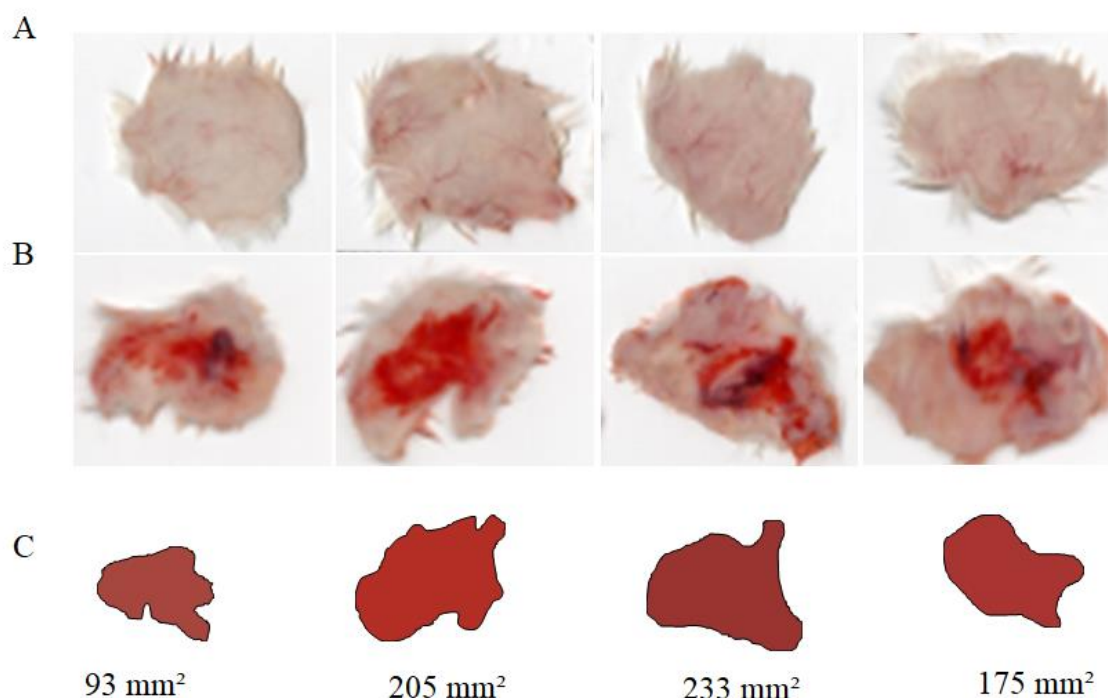


Figura 1. **A.** Fotografias de lesões hemorrágicas de tamanhos comparáveis induzidas pela injeção de 15 µL solução salina 0,9% (m/v). **B.** Fotografias de lesões hemorrágicas no dorso de camundongos induzidas por 25µg de veneno de *Bothrops erythromelas*. **C.** Determinação da gravidade da hemorragia apenas por área no dorso de camundongos envenenados.

Nas análises histopatológicas do grupo envenenado, foi possível verificar que o veneno de *B. erythromelas* causou hemorragia drástica na hipoderme de camundongos, levando ao comprometimento do arranjo espacial do tecido evidenciado pela alteração dos folículos e afrouxamento das fibras colágenas (Figura 2). Já no grupo envenenado e tratado com antiveneno, os efeitos tóxicos na pele de camundongos persistiram, embora em menor intensidade, mostrando que o antiveneno tem a capacidade de neutralizar parcialmente o efeito hemorrágico do veneno de *B. erythromelas* (Figura 2).

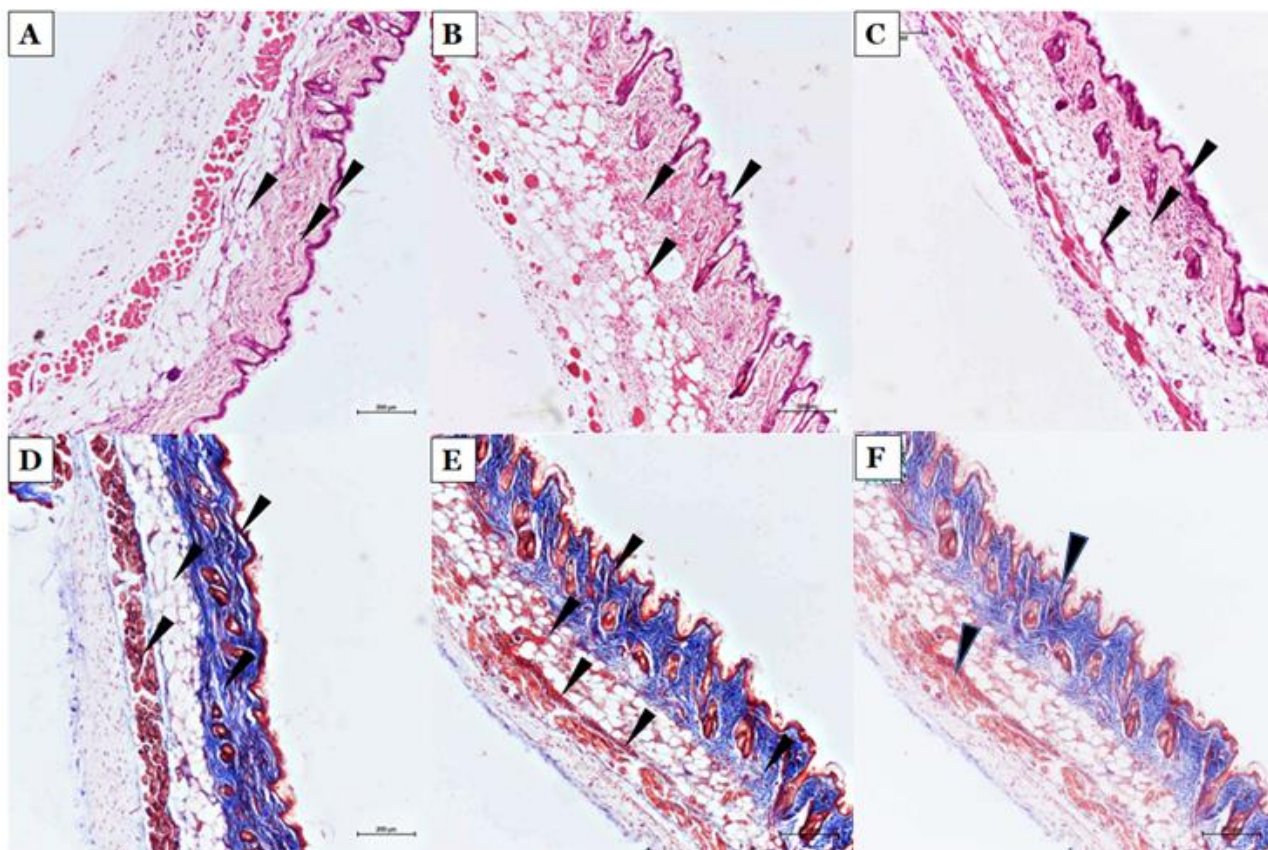


Figura 2. As setas indicam ação do veneno de *Bothrops erythromelas* na pele do camundongo e sua neutralização, imagem de microscópio óptico aumento 10x. **A e D:** Visão microscópica da pele do camundongo 120 minutos após a injeção i.d. de salina. Não foi observada hemorragia nas amostras controle, nem outras alterações. **B e E:** Visão microscópica da pele do camundongo 120 minutos após a injeção i.d. de veneno de *Bothrops erythromelas*. O veneno induziu sangramento na hipoderme, alteração no arranjo espacial da matriz extracelular devido a degradação de colágeno e hiperqueratinação. **C e F:** Visão microscópica da pele do camundongo 120 minutos após a injeção i.d. de veneno e coinjeção de antiveneno. Mesmo com o tratamento, o veneno foi capaz de induzir hemorragia hipodérmica ascendente, alteração no arranjo espacial da matriz extracelular devido a degradação de colágeno e hiperqueratinação.

A deflagração da hemorragia na hipoderme e o afrouxamento do tecido decorrente da ação do veneno de *B. erythromelas* nas fibras colágenas já foram investigados anteriormente. Baldo e colaboradores (2010) constataram que a toxina jararagina, uma metaloprotease (SVMP) de classe III, induz um quadro hemorrágico na hipoderme de camundongos, na qual a toxina é responsável por causar afrouxamento dos feixes colágenos. Assim, os efeitos histopatológicos encontrados neste estudo, provavelmente,

podem resultar da ação da jararagina sobre os componentes da matriz extracelular e, em maior predominância, sobre o colágeno.

Assim, pode-se inferir que, o mecanismo hemorrágico do veneno de *B. erythromelas* é devido a combinação de efeitos sobre a parede capilar em sinergismo com a hidrólise de componentes da matriz extracelular, o que causa o enfraquecimento mecânico dos vasos. Sabe-se que o fracionamento e a caracterização de toxinas hemorrágicas para o veneno de *B. erythromelas* ainda são desconhecidos. Segundo investigações, as SVMPs da classe P-III são as principais toxinas envolvidas na gênese hemorrágica (Fox; Gutiérrez, 2018; Gutiérrez et al., 2016). Porém, a SVMP da classe P-III chamada Berytractivase, apresenta-se destituída de tal atividade sendo um potente ativador de protrombina (Silva et al., 2003).

Já a análise da neutralização do efeito hemorrágico do veneno de *B. erythromelas* utilizando o antiveneno botrópico pentavalente comercial no grupo envenenado e tratado com antiveneno, pode-se observar uma redução da lesão hemorrágica, o que foi perceptível pela região centralizada em torno do sítio de injeção (Figura 3 B). Verificou-se uma menor variação entre os dados da área da lesão em relação aos animais envenenados e não tratados. A área hemorrágica nos animais tratados com antiveneno variou entre 119 mm² e 182 mm² (Figura 3 C) nos diferentes tempos observados.

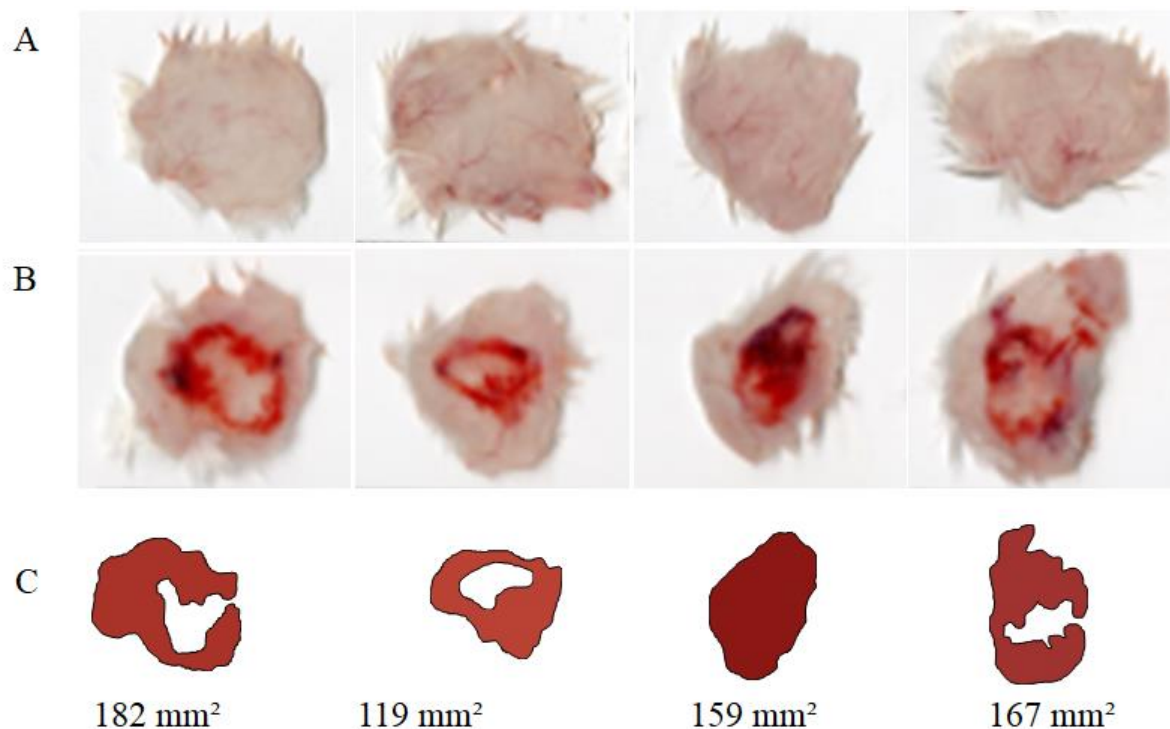
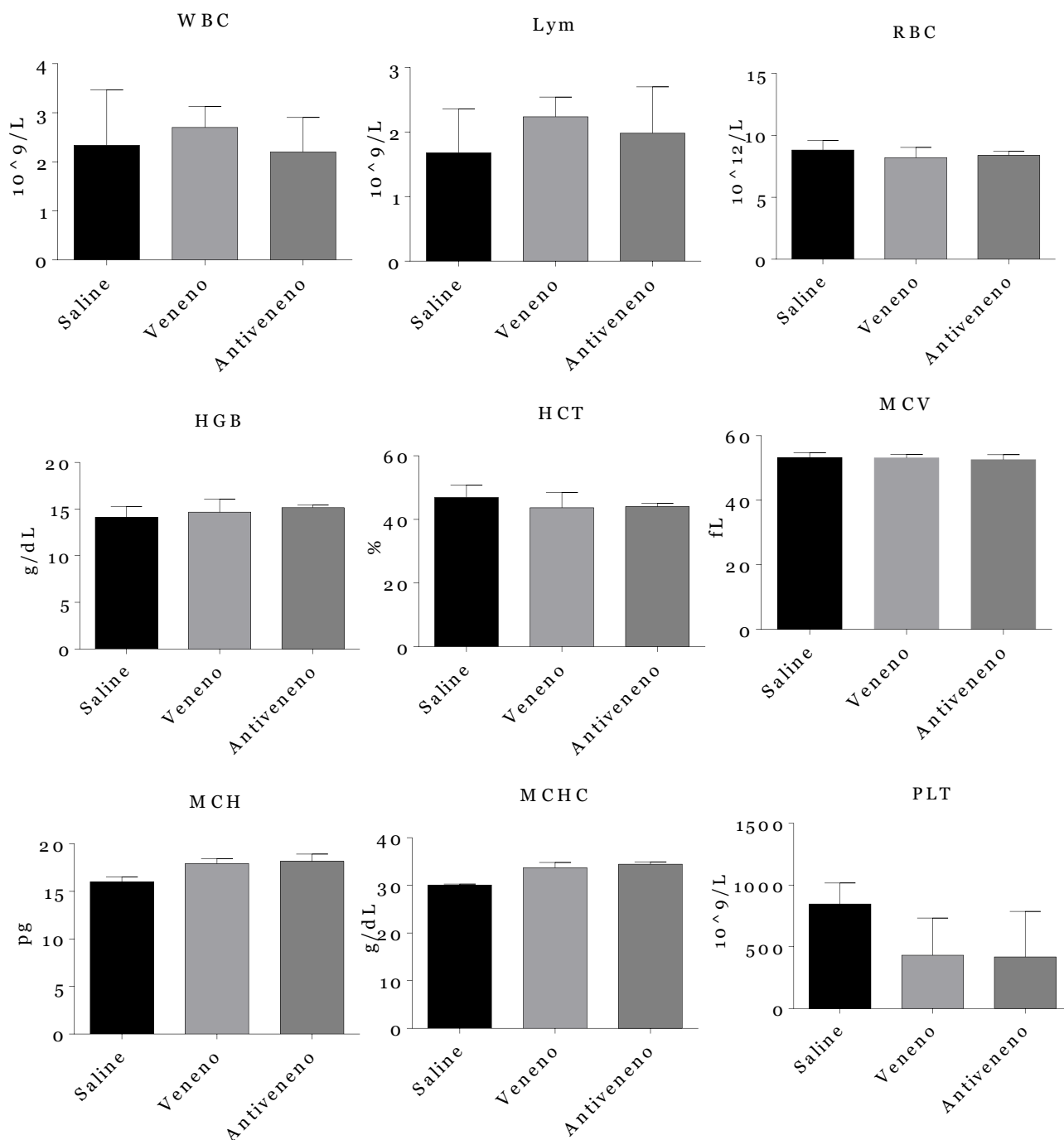


Figura 3. A: Fotografias de lesões hemorrágicas de tamanhos comparáveis induzidas pela injeção de solução salina. **B:** Fotografias de lesões hemorrágicas no dorso de camundongos tratados com antiveneno de tamanhos comparáveis, mas intensidades variadas, induzidas por 25µg de veneno de *Bothrops erythromelas*. **C:** Determinação da gravidade da hemorragia por medida da área no dorso de camundongos tratados com soro antibotrópico.

Nos dias atuais, o envenenamento da vítima é avaliado através de parâmetros hematológicos utilizados para o acompanhamento do quadro clínico, diagnóstico e evolução do caso. Assim, com base nas análises dos hemogramas de camundongos envenenados, percebe-se que o veneno de *B. erythromelas* e suas toxinas não têm como alvo os eritrócitos. Todos os valores da série vermelha, número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, permaneceram dentro dos valores normais quando comparados ao grupo controle (Figura 4).



309

310 **Figura 4.** Contagem de leucócitos totais (WBC), linfócitos (Lym), Glóbulos Vermelhos
 311 (RBC), Hematócrito (HCT), Hemoglobina (HGB), Volume Corpuscular Médio (MCV),
 312 Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), Concentração Corpuscular Média de
 313 Hemoglobina (MCHC) e plaquetas (PLT) circulantes no sangue de camundongos
 314 injetados com veneno de *B. erythromelas* e tratados com antiveneno. As células em
 315 amostras de sangue foram contadas em um analisador hematológico automatizado. As
 316 colunas representam a média $\pm$ DP (n = 6/grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,005 e
 317 ****p < 0,0005 para as comparações indicadas (ANOVA one-way).

No presente estudo, após a injeção do veneno de *B. erythromelas*, os camundongos não apresentaram um quadro de trombocitopenia até 120 minutos da aplicação. Cavalcante e colaboradores (2016) ao estudar os dados plaquetométricos de pacientes envenenados por *B. erythromelas*, constataram que 2 horas após envenenamentos, ocorria um quadro trombocitopênico. Assim, a presente investigação fornece dados que alertam para a importância do rápido atendimento ao paciente. A partir do exposto, sugere-se que o quadro trombocitopênico, induzido pelo veneno de *B. erythromelas*, ocorra em um período de tempo entre 1 e 3 horas após a exposição do indivíduo. Provavelmente, essa manifestação sistêmica já relatada, poderia ser parcialmente ou totalmente inibida com a introdução precoce da soroterapia.

Já os parâmetros hematológicos obtidos neste estudo, foram analisados após a injeção do veneno de *B. erythromelas* no dorso dos animais e tratados com antivenenos. Yamashita et al. (2011) obtiveram resultados contraditórios aos aqui apresentados ao constatarem uma redução de cerca de 25% do edema modulado pelo veneno de *B. jararaca* em ratos trombocitopênicos, sugerindo assim, uma interface plaquetas-edema no modelo de envenenamento. Além disso, Yamashita (2013) identificou um quadro de leucocitose induzida pelo veneno de *B. jararaca* após 3 e 6 horas decorridas do envenenamento. De forma similar, Santoro e colaboradores (2008) identificaram um quadro de leucocitose em pacientes picados por *B. jararaca*. Entretanto, corroborando com o presente estudo, Oliveira e colaboradores (2017) identificaram um quadro de leucopenia induzido de forma dose-resposta pelo veneno de *Philodryas olfersi* em camundongos.

Os venenos animais são considerados uma inovação predatória no reino animal (Casewell et al., 2013). Assim, em contrapartida, a defesa fisiológica da presa/vítima contra a ação do envenenamento é tentar capturar as toxinas perto do local da picada, com

a mobilização de leucócitos para gerar uma armadilha extracelular (Katkar et al., 2016). É importante mencionar que o processo de migração celular, como uma estratégia de defesa para captura de toxinas presentes no tecido local consiste também em um mecanismo de ativação do sistema de reparo tecidual (Gutiérrez et al., 2018). Uma vez que o sistema de entrega do veneno, em associação a toxinas citotóxicas danifica o local (Jackson; Fry, 2016), há como resultado a presença de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio lesado (Rucavado et al., 2016).

A migração de leucócitos está relacionada a uma resposta inflamatória, assim como o extravasamento de líquidos e a vasodilatação arteriolar. Stock e Hoffman (2000) mostram que a leucopenia é uma queda global do número de células relacionadas à resposta imunológica do organismo. Frequentemente, essa manifestação é desencadeada pela redução no número circulante de neutrófilo, seguido da redução de leucócitos. Neutrófilos e monócitos desempenham um importante papel na defesa do organismo através da fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios. Entretanto, o neutrófilo é o tipo celular predominante durante a fase aguda do processo inflamatório, sendo depois substituído pelos monócitos (Abbas; Kumar; Fausto, 2005).

Wanderley e colaboradores (2014) identificaram um quadro de neutropenia induzido pelo veneno de *B. jararacussu* via intraplantar. Isso deve-se ao fato de que os neutrófilos são uma das primeiras células a deixar a vasculatura e migrar para o tecido durante o processo inflamatório. Essas células são atraídas por quimiocinas e mediadores inflamatórios, como IL-8 e INF-g liberados pelas células endoteliais ativadas, macrófagos e mastócitos, e pelos produtos C3a e C5a do complemento ativado por veneno (Delafontaine et al., 2017, 2018; Owen et al., 2013). A migração é orientada pelo gradiente de concentração de mediadores (mecanismo denominado quimiotaxia) que são reconhecidos por receptores de superfície dos neutrófilos. Esta interação favorece o

deslocamento dos neutrófilos pela matriz extracelular e sua rápida chegada ao sítio inflamatório (Mesquita et al., 2008).

No que se refere à população linfocitária neste estudo, foi identificado um quadro de linfopenia induzido pelo veneno de *B. erythromelas* no tempo de análise. Quando investigada a diferenciação das populações linfocitárias, foi revelado que o quadro de linfopenia deu-se devido a queda do número de linfócitos atípicos. Um quadro de linfopenia também foi verificado em camundongos envenenados por *P. olfersi* por Oliveira e colaboradores (2017). Entretanto, os autores não realizaram a diferenciação linfocitária. Já Luna (2010), através da identificação de marcadores da superfície de células do sangue periférico, observou uma queda em relação ao percentual de linfócitos T 12 horas após o tratamento soroterápico. Subsequentemente, ocorreu a manutenção de níveis semelhantes nos pacientes leves e um ligeiro aumento seguido de leve diminuição ou manutenção de níveis semelhantes antes do tratamento em pacientes graves ou moderados (Luna, 2010).

O quadro de linfopenia sugere que, a queda do número de linfócitos indicaria a migração dessas células para os tecidos e sistemas afetados, contribuindo e/ou regulando os quadros inflamatórios observados; com isso, sua diminuição no sangue periférico, mas aqui não foi identificadas alterações no número de linfócitos. No entanto, com o fim do tratamento e a remissão dos sintomas e o equilíbrio percentual desses linfócitos seria estabelecido.

As manifestações hemorrágicas locais em casos de envenenamento humano podem ser os principais indicadores do gênero que inferiu danos ao paciente, dependendo da localidade e o ambiente onde o indivíduo foi lesionado. No Brasil o gênero *Bothrops*, tem sido um dos principais causadores de acidentes, e, tais manifestações hemorrágicas podem indicar a terapêutica a ser aplicada. Diante dessa observação, procurou-se

quantificar a hemoglobina livre e a hemoglobina oxidada no modelo experimental deste trabalho (Figura 5).

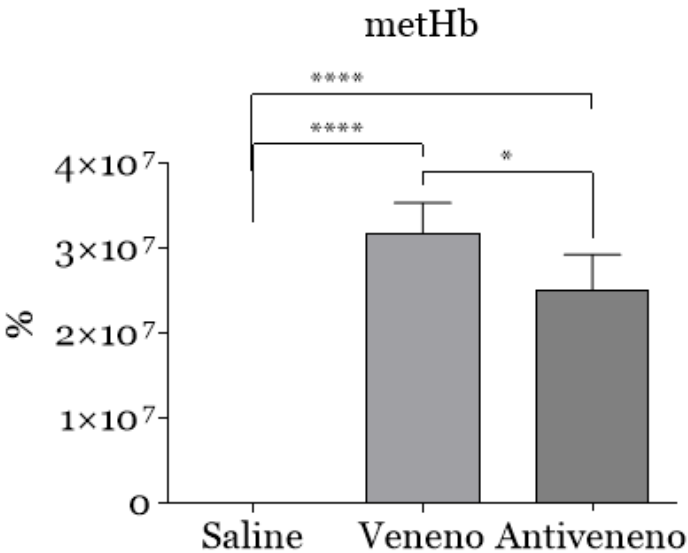


Figura 5. Determinação da hemoglobina livre e da hemoglobina oxidada, a partir da utilização de 25ug de veneno bruto de *Bothrops erythromelas*, em murinos. Os resultados foram expressos como nas colunas representam a média $\pm$ DP (n = 6/grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,005 e ****p < 0,0005 para as comparações indicadas (ANOVA one-way).

A metemoglobina é a forma oxidada de oxihemoglobina, onde o Fe²⁺ do grupo heme é oxidado para o férrico (Fe³⁺), não podendo assim, se ligar ao oxigênio (Baraka et al, 2001). Na atividade oxidante, a quantidade de veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, utilizada de 25ug promoveu a formação de metemoglobina. Atualmente alguns estudos tentam compreender a ação oxidativa dos venenos de serpentes nas hemoglobinas, tal ação pode estar correlacionada a presença do L-aminoácido oxidases (svLAAOs) e/ou o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Melendez-Martinez et al, 2017).

Os LAAOs são glicoenzimas diméricas ou flavoenzimas que interagem através de ligações não covalentes com as enzimas, a glicosilação pode ser responsável pela a interação enzima-célula, sendo a liberação do peróxido de hidrogênio concentrado em um

ponto da célula o que poderia levar a um dano mais rápido na célula devido a alta concentração de peróxido de hidrogênio nesse ponto (Moustafa et al, 2006). Na literatura já se encontra descrito a presença (LAAOs) no veneno do gênero *Crotalus*. Acredita-se que as L-aminoácido oxidases (LAAOs) estão presentes no veneno crotálica essas flavoenzimas catalisam a oxidação de L-aminoácidos, produzindo, concomitantemente, peróxido de hidrogênio e amônia (Moustafa et al, 2006).

Sabe-se que a avaliação do quadro clínico, diagnóstico e evolução de vítimas envenenadas por serpentes é realizada a partir da observação de alterações locais e parâmetros hematológicos e exames complementares, os quais, são os meios efetivos de diagnósticos atuais. A partir disso, é importante a utilização de novos métodos de diagnóstico para se avaliar as alterações sofridas durante o envenenamento por serpentes. Assim, a análises do perfil lipídico de pacientes envenenados pode ser uma dessas ferramentas de diagnóstico.

Com base nas análises realizadas em camundongos envenenados e camundongos envenenados e tratados com soro antibotrópico, percebe-se que o veneno de *B. erythromelas* e suas toxinas causam pequenas alterações no perfil lipídico, onde os valores de HDL, VLDL, LDL, colesterol e triglicerídeos, sofreram pequenas alterações nos animais envenenados e em relação aos animais do grupo controle (Figura 6).

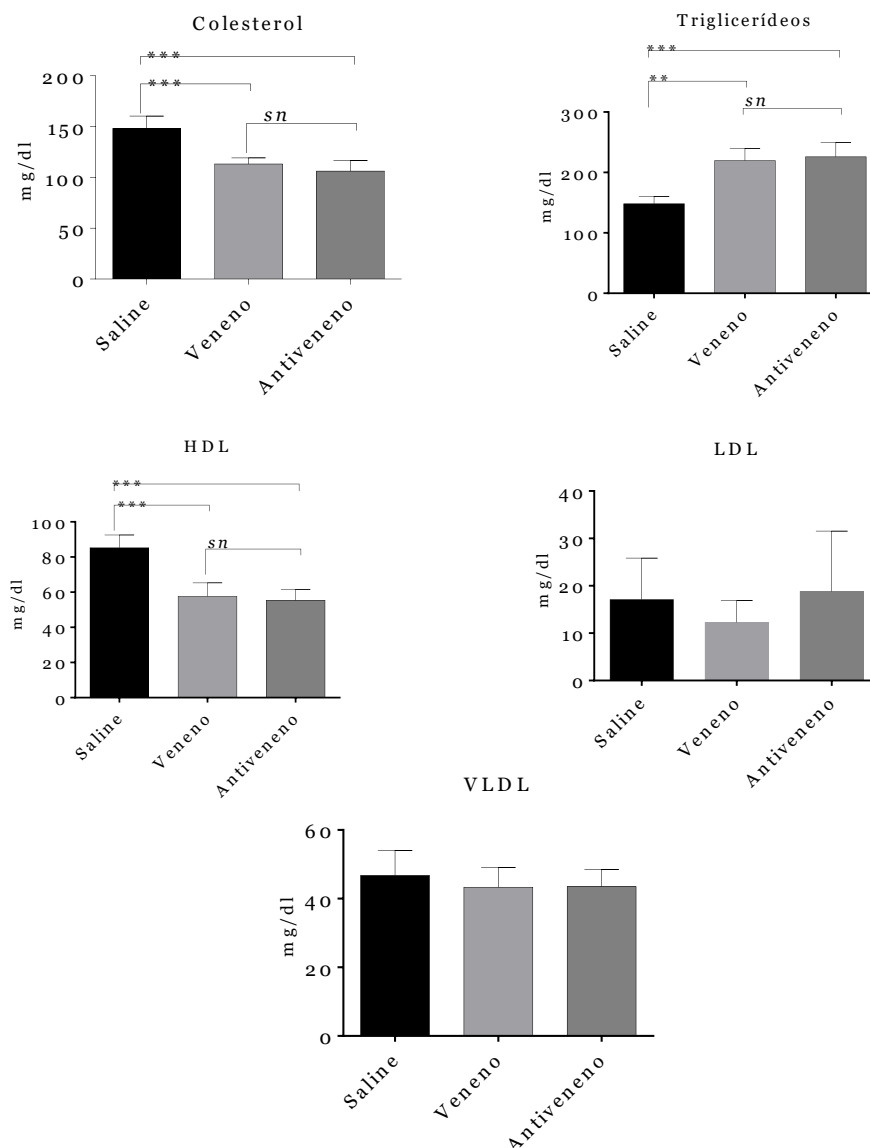


Figura 6. Perfil lipídico do soro de camundongos injetados com 25ug de veneno de *B. erythromelas* e tratados com 40uL de antiveneno Botrópico. Foram analisados, Colesterol total (CT), Triglicerídeos (TG), Lipoproteína de alta densidade (HDL), Lipoproteína de baixa densidade (LDL), Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). As amostras de soro foram processadas em um analisador automatizado. As colunas representam a média $\pm$ DP (n = 6/grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,005 e ****p < 0,0005 para as comparações indicadas (ANOVA one-way).

É sabido que os mediadores lipídicos são fortes estimuladores da resposta imune (Rogerio et al., 2015), portanto, colesterol, LDL e HDL podem estar relacionados à gravidade do envenenamento. Entretanto, existe uma divergência entre métodos

utilizados o que pode estar relacionada com a sensibilidade destes. A espectrometria detecta e infere proteínas em uma amostra de forma mais sensível, enquanto ensaios bioquímicos analisam as concentrações de marcadores lipídico (Cavalcante, 2022).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os achados na literatura sobre a clínica, sobre o tratamento e sobre a falha terapêutica com antiveneno botrópico em pacientes envenenados por *B. erythromelas*. As análises demonstraram alterações nos animais que sofreram envenenamento, assim como a ação do antiveneno nos animais lesionados. Entretanto, verificou-se que o antiveneno não é capaz de sanar completamente a ação deflagrada pelo veneno botrópico.

Nossas descobertas fornecem uma nova visão acerca da necessidade de desenvolvimento novos tratamentos e métodos de diagnósticos mais eficazes para o tratamento de envenenamentos por serpentes, assim, como a necessidade de averiguar mais a fundo a ação do veneno durante o envenenamento, buscar possíveis biomarcadores, explorar as proteínas envolvidas no envenenamento por *Bothrops* e quais proteínas não são neutralizadas pelos os antivenenos atuais.

Contudo isso, prevemos um avanço no desenvolvimento de ensaios clínicos baseados nas patologias presentes no envenenamento, sendo possível monitorar a gravidade e a complexidade da ação do veneno nos pacientes afligidos, assim como, a possível falha no tratamento atual, não apenas *B. erythromelas* mas também para outros venenos.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran-Patologia. Elsevier Brasil, 2005.
- Baldo, Cristiani, et al. "Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis." *PLoS neglected tropical diseases* 4.6 (2010): e727.
- Baraka A.S, Ayoub C. M, Kaddoum R. N, Maalouli J. M, Chehab I. R, Hadi U. M. Severe oxyhemoglobin desaturation during induction of anesthesia in a patient with congenital methemoglobinemia. *Anesthesiology* 2001; 95(5): 1296-7.
- CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in ecology & evolution*, v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013.
- De Lacerda, J.B. Leçons sur le Venin des Serpents du Brésil; Lombaerts: Rio de Janeiro, Brasil, 1884. (In French).
- DELAFONTAINE, M.; VILLAS-BOAS, I.; MATHIEU, L.; JOSSET, P.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. Enzymatic and pro-inflammatory activities of *Bothrops lanceolatus* venom: Relevance for envenomation. *Toxins*, v. 9, n. 8, p. 244, 2017.
- DELAFONTAINE, M.; VILLAS-BOAS, I. M.; PIDDE, G.; VAN DEN BERG, C. W.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Venom from *Bothrops lanceolatus*, a Snake Species Native to Martinique, Potently Activates the Complement System. *Journal of immunology research*, v. 2018, 2018.
- FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J.A.; XAVIER-SANTOS, J.B.; PASSOS, J.G.; SILVAJUNIOR, A.A.; TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. *Toxicon*, v.125, p. 74-83, 2017.
- Fernandes-Ferreira, Hugo, et al. "Crenças associadas a serpentes no estado do Ceará, Nordeste do Brasil." *Sitientibus* 11.2 (2012): 153-163.
- Fox, J.; Gutiérrez, J. M. (Ed.). Snake venom metalloproteinases. MDPI, 2018.
- Gay, Carolina, et al. "Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina." *Toxins* 8.1 (2016): 9.
- Gonçalves-Machado, Larissa, et al. "Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest." *Journal of proteomics* 135 (2016): 73-89.
- Gutiérrez, José, et al. "Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding." *Toxins* 8.4 (2016): 93.

GUTIÉRREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; VARGAS, M.; VILALLTA, M.; SÁNCHEZ, A.; SANZ, L.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; CALVETE, J.J. Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead. *Toxins*, v. 9, n. 5, p. 163, 2017.

GUTIÉRREZ, J.; ESCALANTE, T.; HERNÁNDEZ, R.; GASTALDELLO, S.; SARAIVA-OTTEN, P.; RUCAVADO, A. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? *Toxins*, v. 10, n. 5, p. 182, 2018.

Gutiérrez, José, et al. "A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming." *Toxins* 8.10 (2016): 304.

Herrera, Cristina, et al. "Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage." *PLoS neglected tropical diseases* 9.4 (2015): e0003731.

Jackson, T.; Fry, B. A tricky trait: Applying the fruits of the "function debate" in the philosophy of biology to the "venom debate" in the science of toxinology. *Toxins*, v. 8, n. 9, p. 263, 2016.

Jorge, Roberta Jeane B., et al. "Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil." *Journal of proteomics* 114 (2015): 93-114.

Kalluri, Raghu. "Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis." *Nature Reviews Cancer* 3.6 (2003): 422.

Katkar, G. D et al. NETosis and lack of DNase activity are key factors in *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction. *Nature communications*, v. 7, p. 11361, 2016.

Kini, R., and Cho Koh. "Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites." *Toxins* 8.10 (2016): 284.

LeBleu, Valerie S., Brian MacDonald, and Raghu Kalluri. "Structure and function of basement membranes." *Experimental biology and medicine* 232.9 (2007): 1121-1129.

LUNA, K.P.O.; XAVIER, E.M.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, V.R.A. Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 6, p. 731-732, 2010.

Magalhães, Hemerson Iury, et al. "Relato de acidente botrópico que resultou em amputação." *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade* 10.1 (2017).

Melendez-Martinez D, Munoz JM, Barraza-Garza G, et al. Rattlesnake *Crotalus molossus nigrescens* venom induces oxidative stress on human erythrocytes. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2017; 23: 24-30.

- Mesquita J. R, et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 10, p. 66-81, 2008.
- Mise, Y. F., Lira-da-Silva, R. M., & Carvalho, F. M. (2007). Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(5), 569-573.
- Moreira, João Paulo Lima, and Rúbia Gomes Morato. "Incidência e ocorrência de ataques ofídicos no Brasil em 2012." *Simpósio Mineiro de Geografia* 1 (2014).
- Moustafa, I. M. et al. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 364, n. 5 , p. 991-1002, 2006.
- Naoum, P.C.R. J.; Moraes, M. S., Dosagem espectrometrica de metaemoglobina sem interferentes quimicos ou enzimaticos. *Ver Bras. Hematol Hemoter*, 2004; 26: 19-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842004000100004>
- Oliveira, Fagner Neves, et al. "Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43.6 (2010): 662-667.
- OLIVEIRA, J. S.; SANT'ANNA, L. B.; JUNIOR, M. C. O.; SOUZA, P. R.; SOUZA, A. S. A.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C. Local and hematological alterations induced by Philodryas olfersii snake venom in mice. *Toxicon*, v. 132, p. 9-17, 2017.
- OWEN, J. A. *Kuby immunology*. New York: WH Freeman, 2013.
- Paes Leme, Adriana F., et al. "Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma." *Journal of proteome research* 11.1 (2011): 279-291.
- Rogério, A.D.P.; Sorgi, C.A.; Sadikot, R.; Carlo, T. The role of lipids mediators in inflammation and resolution. *BioMed Res. Int.* 2015. 605959.
- Rucavado, A.; Nicolau, C.; Escalante, T.; Kim, J.; Herrera, C.; Gutiérrez, J.; Fox, J. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. *Toxins*, v. 8, n. 12, p. 349, 2016.
- Sajevic, Tamara, Adrijana Leonardi, and Igor Križaj. "Haemostatically active proteins in snake venoms." *Toxicon* 57.5 (2011): 627-645.
- Santoro, M. L.; Sano-Martins, I. S.; Fan, H. W.; Cardoso, J. L.; Theakston, R. D. G.; Warrell, D. A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon*, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.
- Seo, Tadahiko, et al. "Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP 5/6, which disrupts cell-cell adhesions in vitro and induces haemorrhage in vivo." *The FEBS journal* 284.11 (2017): 1657-1671.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C. A.; POZNER, R. G.; VENTURA, J. S.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator from Bothrops erythromelas (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochemical Journal*, v. 369, n. 1, p. 129-139, 2003.

STOCK, W.; HOFFMAN, R. White blood cells 1: non-malignant disorders. *The Lancet*, v. 355, n. 9212, p. 1351-1357, 2000.

Tasoulis, Theo, and Geoffrey Isbister. "A review and database of snake venom proteomes." *Toxins* 9.9 (2017): 290.

Valle, Luísa Abero, et al. "Amputação bilateral de extremidades inferiores após acidente botrópico grave: relato de um caso." *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo* 53.2 (2018): 81-84.

Wanderley, C. W. S.; Silva, C. M. S.; Wong, D. V. T.; Ximenes, R. M.; Morelo, D. F. C.; Cosker, F.; Brito, G. A. C. Bothrops jararacussu snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid-and neutrophil-dependent manner. *Toxicon*, v. 90, p. 134-147, 2014.

Yamashita, K. M.; et al. "Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and Bothrops jararaca snake venom." *Journal of thrombosis and haemostasis*, v. 9, n. 10, p. 2057-2066, 2011.

Yamashita, K. M. Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente Bothrops jararaca. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo

**Efficacy of Brazilian antivenom to neutralize local hemorrhagic lesion induced by
*Bothrops jararaca***

Ingrid Mayara Cunha de Brito ^{1*}, Joeliton S. Cavalcante ^{1,2*}, Cayo Almeida ³, Renata
Sousa Alves ⁴, Roberta Jeane Bezerra Jorge ⁵, Lucilene Delazari dos Santos ^{1,6,7,#}

* These authors contributed equally to this work

¹ Graduate Program in Tropical Diseases, Botucatu Medical School (FMB), São Paulo
State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

² Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), São Paulo State
University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

³ Center of Mathematics, Computing Sciences and Cognition, Federal University of ABC,
São Paulo, SP, Brazil.

⁴ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará,
Fortaleza 60430-160, Brazil

⁵ Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University
of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil.

⁶ Biotechnology Institute (IBTEC), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP,
Brazil.

⁷ Graduate Program in Medical Biotechnology (Research and Development), Botucatu
School of Medicine (FMB), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo,
Brazil.

#Autor correspondente

689

690 **Resumo**

691 A análise do plasma sanguíneo representa uma ferramenta valiosa para investigar a
692 patologia tecidual e avaliar o sucesso terapêutico de várias intervenções. Neste estudo, a
693 foi avaliada a capacidade de neutralização do antiveneno brasileiro constituído por F(ab)₂
694 derivados de cavalos, sobre a lesão hemorrágica induzida pelo veneno da serpente
695 *Bothrops jararaca*. A partir, de análises histológicas, bioquímicas e hematológicas do
696 plasma sanguíneo de camundongos swiss fêmeas. Pode-se acompanhar as alterações
697 causadas pelo veneno *B. jararaca*, antes e a após o tratamento com o antiveneno
698 botrópico, em experimentos envolvendo a injeção independente (primeiro o veneno, e
699 após o antiveneno). A atividade hemorrágica foi significativamente reduzida pelo
700 antiveneno.

701

702 **Palavras-chaves:** Atividade hemorrágica, tratamento, veneno botrópico, patologia
703 tecidual.

704

705

Abstract

Blood plasma analysis is a valuable tool for investigating tissue pathology and evaluating the therapeutic success of various interventions. In this study, the neutralization capacity of the Brazilian antivenom consisting of F(ab)₂ derived from horses on the hemorrhagic lesion induced by the venom of the snake *Bothrops jararaca* was evaluated. From histological, biochemical and hematological analyses of blood plasma of female Swiss mice. Changes caused by *B. jararaca* poison can be followed before and after treatment with bothropic antivenom in experiments involving independent injection (first the poison, and after the antivenom). Hemorrhagic activity was significantly reduced by antivenom.

Keywords: Hemorrhagic activity, treatment, bothropic venom, tissue pathology.

1. INTRODUÇÃO

Bothrops jararaca é uma serpente semi-arbórea que apresenta uma ampla distribuição no Brasil, e representa uma das maiores causadoras de acidentes ofídicos em algumas regiões do país, particularmente em áreas densamente povoadas do sudeste do Brasil, onde é responsável pela maioria dos envenenamentos humanos (Puerto; França; Fan, 1992; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Chippaux, 2015). O veneno dessa espécie induz um quadro clínico que inclui edema local, petéquias, equimose, e bolhas no membro afetado, sangramento sistêmico espontâneo em vários órgãos, hemorragia subconjuntival e distúrbios de coagulação (Roodt, 1997; Cardoso et al., 2019; Gutiérrez et al., 2017). Além disso, outras manifestações fatais envolvendo distúrbios hemostáticos, hemorragia intracraniana, choque e insuficiência renal também são relatados (Kouyoumdjian, 1986;).

A patogênese dos distúrbios hemorrágicos causados pelo veneno de *B. jararaca* tem sido investigada a nível local, evidenciando lesão celular, comprometimento do sistema de vasos sanguíneos e linfáticos e degradação da matriz extracelular (MEC) (Sanchez et al., 2015). Concomitante ao dano tecidual direto, desenvolve-se uma reação inflamatória que pode potencializar a degradação do tecido de forma exacerbada, porém estes efeitos tem sido estudados por ferramentas reducionistas (Rucavado et al., 2016;). Dessa forma, os efeitos sistêmicos associados aos envenenamentos por serpentes exigem de novas ferramentas para investigação dos aspectos mais sutis do dano tecidual e seu reflexo no sistema.

A necessidade de se obter um conhecimento mais profundo da neutralização dos efeitos locais, e se obter uma plataforma mais abrangente para o monitoramento da resposta terapêutico do indivíduo ao antiveneno nos levou a estudar o plasma de camundongos envenenados por *B. jararaca* para avaliar a eficácia do antiveneno na

neutralização da hemorragia local causada por esse veneno. Este estudo propôs identificar quais proteínas e processos biológicos são alterados no plasma de camundongos em resposta ao veneno e ao tratamento com antiveneno. Nosso estudo oferece novos insights moleculares sobre a gênese da lesão hemorrágica causada pelo veneno de *B. jararaca*, sua neutralização e as limitações do antiveneno.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do veneno de *Bothrops jararaca*

O pool de veneno de *Bothrops jararaca* foi obtido de 50 espécimes capturados no interior do estado de São Paulo (Figura 1) e mantidos no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) sob autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA 35/1/92/0044-1, Proc. nº 02001.005670/90-77). Este projeto de pesquisa está registrado no Sistema Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o nº A54E8E8. Para a extração do veneno, as serpentes foram anestesiadas com CO₂, e o veneno preparado de acordo com Santos et al. (2021).

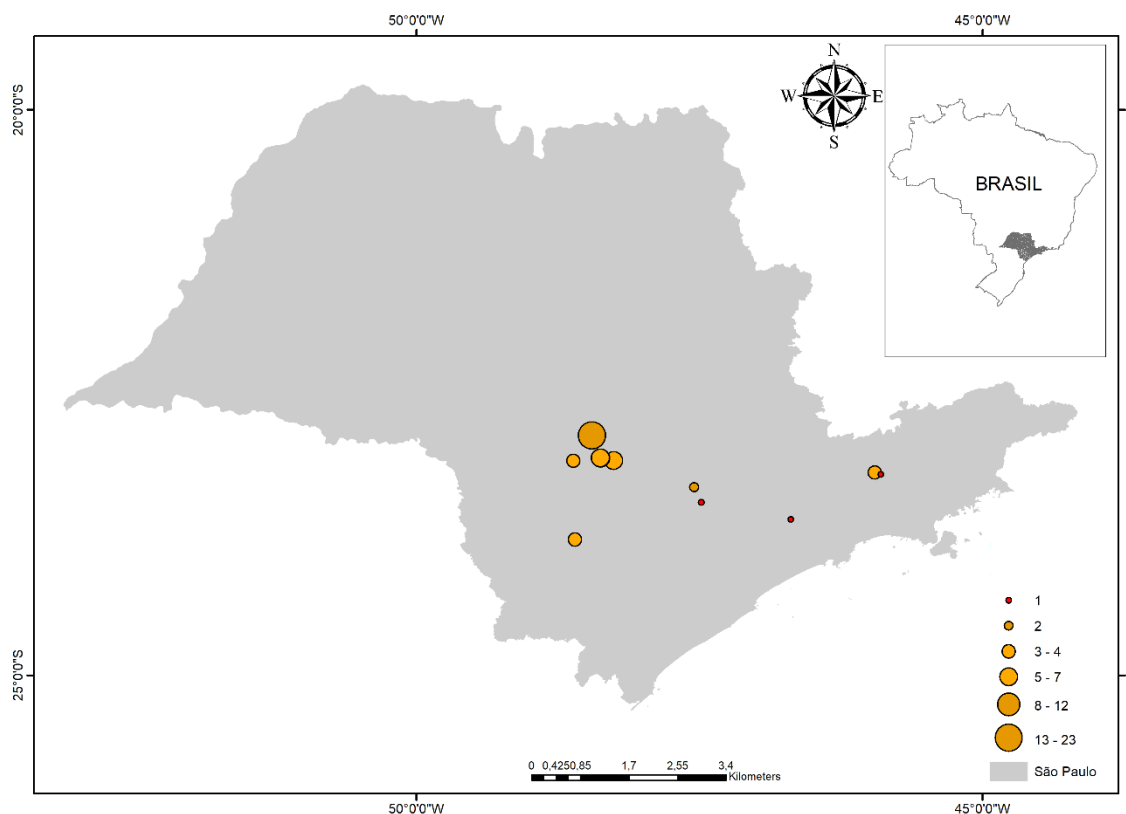


Figura 1. Mapa demonstra o local no Estado de São Paulo onde foi realizada a captura dos espécimes de serpentes de *B. jararaca* utilizadas para coleta de veneno e a obtenção do pool

2.2 Animais e envenenamento experimental

Para identificar o perfil neutralizante do antiveneno brasileiro frente a lesão hemorrágica causada pelo veneno de *B. jararaca*, dois tipos de desenho experimental foram usados: (i) incubação de veneno e antiveneno, antes da injeção em camundongos, e (ii) injeção independente de veneno e antiveneno, ou controle (Rucavado et al., 2011). Os experimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA), do Núcleo de Pesquisa de Novos Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará.

Para os experimentos com (i) incubação de veneno e antiveneno antes da injeção, misturas contendo 40µL de antiveneno foram adicionados a uma solução fisiológica salina estéril (NaCl) contendo 25µg (15µL) de veneno de *B. jararaca* e incubadas a 37 C por 30 min. Após a incubação, a mistura foi injetada via intradérmica no dorso dos camundongos

(n=6). O grupo controle recebeu apenas NaCl ou antiveneno. Duas horas após a injeção, os camundongos foram anestesiados e o sangue coletado via punção cardíaca (Cavalcante et al., 2022).

As regiões contendo o halo hemorrágico foram excisadas, cortados em duas metades no meio e uma parte fixado em solução de formol a 10% (v/v), processados e incluídos em parafina. Cortes de tecido foram coletados e corados com hematoxilina-eosina para observação microscópica. A outra metade correspondente foi armazenada em água MiliQ (3 - 4°C) para dosagens de hemoglobina. Para os experimentos de (ii) injeção independente, alíquotas de 25µg (15µL) de veneno de *B. jararaca* foram injetadas por via intradérmica no dorso dos animais. Cinco minutos após a injeção, os camundongos receberam uma segunda injeção contendo o antivenenos (40µL) e o protocolo seguiu conforme descrito anteriormente.

2.3 Medição de hemoglobina e metemoglobina

O potencial de oxidação de venenos brutos de *Bothrops jararaca* na hemoglobina de camundongos Swiss foram realizados, in vitro. Utilizando o tecido do dorso envenenado destes animais, a parte do halo hemorrágico foi fragmentado e homogeneizado com 2 mL de água MiliQ para extração de hemoglobina (Félix-Silva et al., 2017). Após incubação por 48 h a 8°C, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 16000x g por 10 min, em temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL deste sobrenadante foi centrifugado a 16000x g por 30 min, a 4°C. Por fim, o sobrenadante obtido foi lido a 540 nm e 630nm em um leitor de microplacas utilizando água MiliQ. A hemorragia foi expressa como o conteúdo de hemoglobina extraída do halo hemorrágico excisado formado após a injeção subcutânea de veneno. As amostras de cada animal foram analisadas em triplicata e a

média dessas determinações foi utilizada para expressar o resultado como média $\pm$ erro padrão da média.

2.4 Análise hematológica e lipídica

Para obtenção do sangue, após 30 minutos a indução da lesão hemorrágica, todos os camundongos receberam cetamina (80 mg/kg, ip) e xilazina (8 mg/kg, ip), e foram sangrados via punção cardíaca. Amostras de sangue contendo EDTA foram analisadas em um contador automatizado de hematologia BC-5000 (Mindray®). Os parâmetros medidos incluíram contagem de hemácias (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (CMH), concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC), contagem de leucócitos (leucócitos), neutrófilos (Neu), linfócitos (Lym) e plaquetas (PLT). Além disso, amostras de soro foram utilizadas para medir colesterol, triglicerídeos, colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade (VDL). A análise estatística foi realizada por meio do teste T, one Way-ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na constituição do veneno botrópico, podemos encontrar algumas proteínas que podem apresentar atividade catalítica e outras não, como fosfolipases A2, L-aminoácido oxidase, lectinas tipo C, proteases (metaloproteases e serina proteases), hialuronidases, acetilcolinesterases, crescimento fatores e ativadores da proteína C (Markland, 1998; Jorge et al., 2015).

820 É sabido que nos casos de envenenamento humano por *B. erythromelas*,
821 manifestações hemorrágicas sistêmicas nos pacientes ocorrem mesmo após a soroterapia
822 e, dessa forma, isto nos motivou a estudar a neutralização frente o efeito hemorrágico
823 causado por esse veneno. A dose mínima hemorrágica (MHD) do veneno de *B.*
824 *erythromelas* é estimada em 5.0µg, mas para estudos da neutralização do efeito
825 hemorrágico por antivenenos, utiliza-se uma dose de desafio de veneno correspondente a
826 cinco MHDs (Gutiérrez et al., 2017).

827 Assim, validou-se, inicialmente, a alteração deflagrada pela salina que apresentou
828 apenas um pequeno ponto hemorrágico no local da injeção (Figura 1) no grupo controle.
829 Essa alteração observada na amostra durante o tempo observado (Figura 1A). Após
830 verificar que a salina solução utilizada para a dissolução do veneno não induziu
831 hemorragia, procedeu-se a investigação das amostras com injeção do veneno. Já no grupo
832 experimental grupo envenenado, uma intensa hemorragia pode ser observada após duas
833 horas da injeção do veneno (Figura 1 B). Para estimarmos a área das lesões induzidas
834 pelo veneno, utilizou-se ferramentas computacionais. Desta forma, verificamos que a área
835 hemorrágica variou entre 345 mm² e 557 mm² (Figura 1 C) entre os intervalos observados.

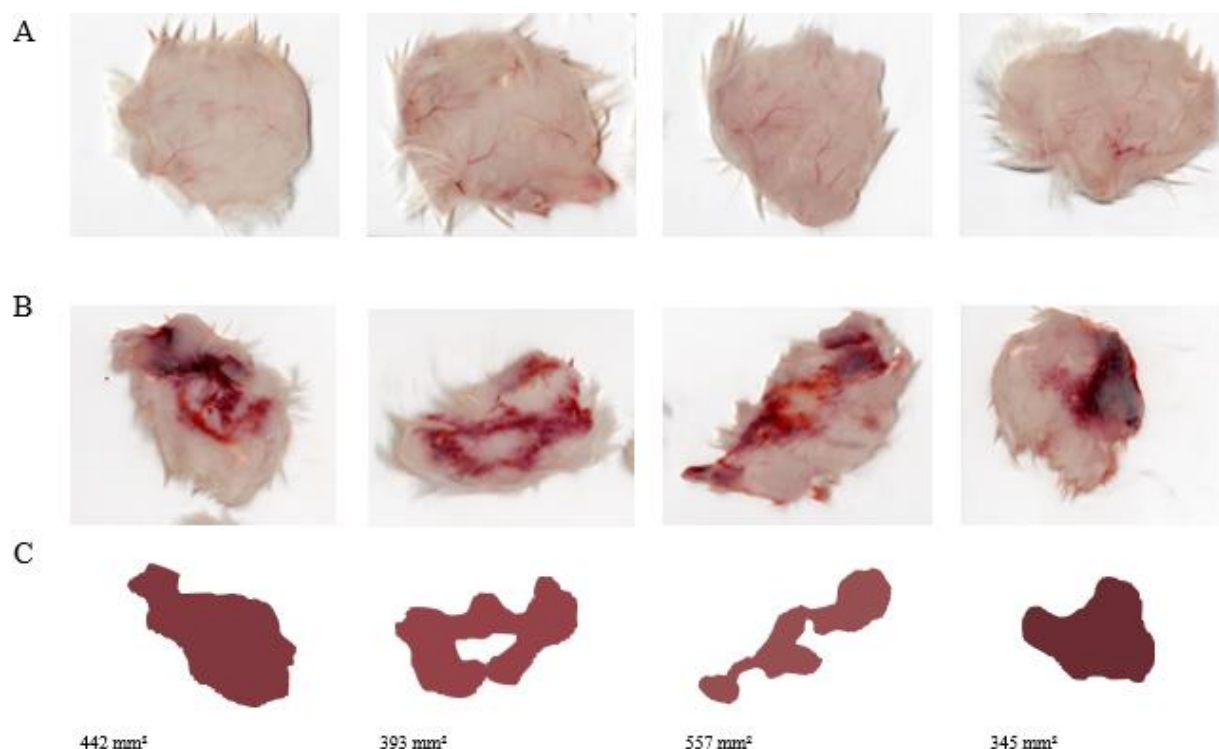


Figura 1. **A.** Fotografias de lesões hemorrágicas de tamanhos comparáveis induzidas pela injeção de 15 µL solução salina 0,9% (m/v). **B.** Fotografias de lesões hemorrágicas no dorso de camundongos induzidas por 25µg de veneno de *Bothrops jararaca*. **C.** Determinação da gravidade da hemorragia apenas por área no dorso de camundongos envenenados.

Nas análises histopatológicas do grupo com veneno, foi possível verificar que o veneno de *B. jararaca* causou hemorragia na hipoderme de camundongos, levando ao comprometimento do arranjo espacial do tecido evidenciado pela alteração dos folículos e afrouxamento das fibras colágenas (Figura 2). Já no grupo veneno e tratamento com antiveneno, os efeitos tóxicos na pele de camundongos persistiram, embora em menor intensidade, mostrando que o antiveneno tem a capacidade de neutralizar parcialmente o efeito hemorrágico do veneno de *B. jararaca* (Figura 3).

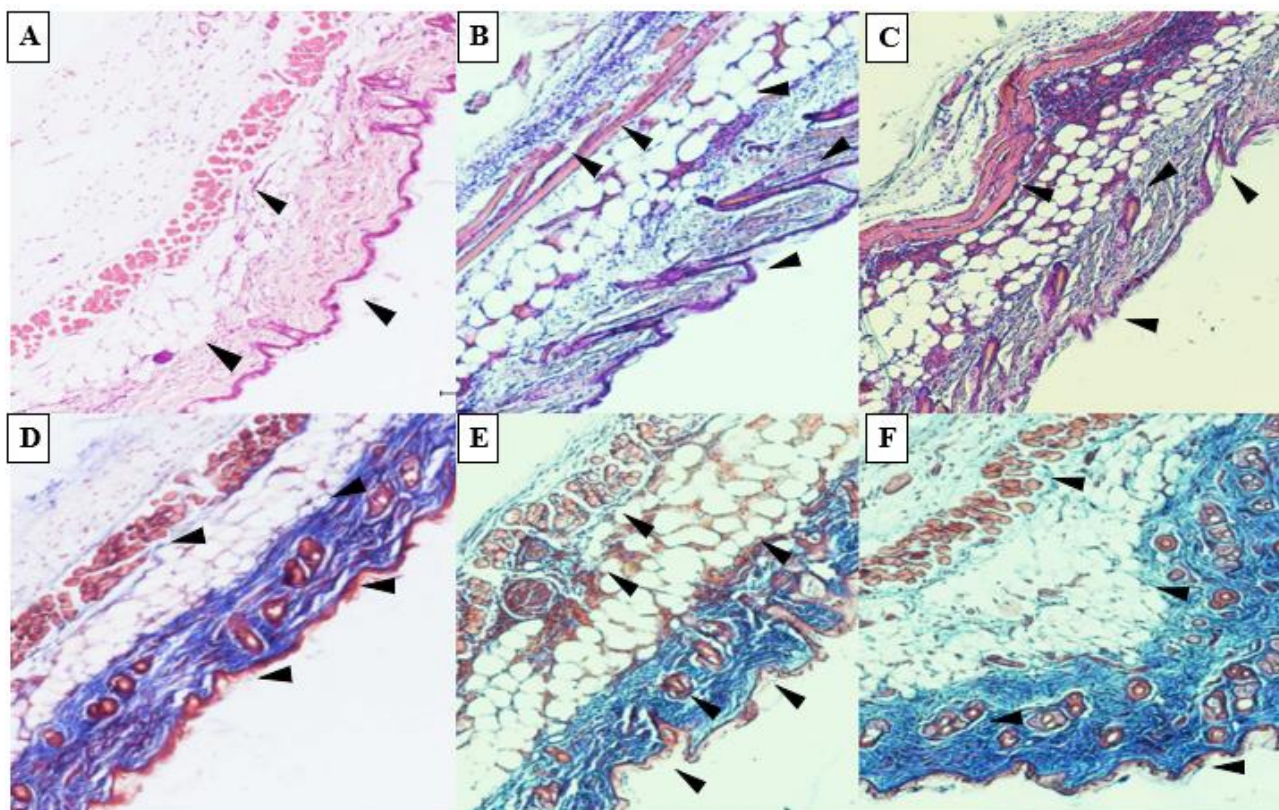


Figura 2. Ação do veneno de *Bothrops jararaca* na pele do camundongo e sua neutralização as setas indicam as alterações. **A e D.** Visão microscópica da pele do camundongo 120 minutos após a injeção i.d. de salina. Não foi observada hemorragia nas amostras controle, nem outras alterações. **B e E.** Visão microscópica da pele do camundongo 120 minutos após a injeção i.d. de veneno de *Bothrops jararaca*. O veneno induziu sangramento na hipoderme, alteração no arranjo espacial da matriz extracelular devido a degradação de colágeno e hiperqueratinação. **C e F.** Visão microscópica da pele do camundongo 120 minutos após a injeção i.d. de veneno e coinjeção de antiveneno. Mesmo com o tratamento, o veneno foi capaz de induzir hemorragia hipodérmica ascendente, alteração no arranjo espacial da matriz extracelular devido a degradação de colágeno e hiperqueratinação.

A deflagração da hemorragia na hipoderme e o afrouxamento do tecido decorrente da ação do veneno de *B. jararaca* nas fibras colágenas já foram investigados anteriormente. Baldo e colaboradores (2010) constataram que a toxina jararagina, uma metaloprotease (SVMP) de classe III, induz um quadro hemorrágico na hipoderme de camundongos, na qual a toxina é responsável por causar afrouxamento dos feixes colágenos. Assim, os efeitos histopatológicos encontrados neste estudo, provavelmente,

podem resultar da ação da jararagina sobre os componentes da matriz extracelular e, em maior predominância, sobre o colágeno.

Assim, pode-se inferir que, o mecanismo hemorrágico do veneno de *B. jararaca* é devido a combinação de efeitos sobre a parede capilar em sinergismo com a hidrólise de componentes da matriz extracelular, o que causa o enfraquecimento mecânico dos vasos. Sabe-se que o fracionamento e a caracterização de toxinas hemorrágicas para o veneno de *B. erythromelas* ainda são desconhecidos. Segundo investigações, as SVMPs da classe P-III são as principais toxinas envolvidas na gênese hemorrágica (Fox; Gutiérrez, 2018; Gutiérrez et al., 2016). Porém, a SVMP da classe P-III chamada Berytractivase, apresenta-se destituída de tal atividade sendo um potente ativador de protrombina (Silva et al., 2003).

Já a análise da neutralização do efeito hemorrágico do veneno de *B. jararaca* utilizando o antiveneno botrópico pentavalente comercial no grupo envenenado e tratado pode-se observar uma redução da lesão hemorrágica, o que foi perceptível pela região centralizada em torno do sítio de injeção (Figura 3 B). Verificou-se uma menor variação entre os dados da área da lesão em relação aos animais envenenados e não tratados (grupo envenenado). A área hemorrágica nos animais tratados com antiveneno variou entre 140 mm² e 494 mm² (Figura 3 C) nos diferentes tempos observados.

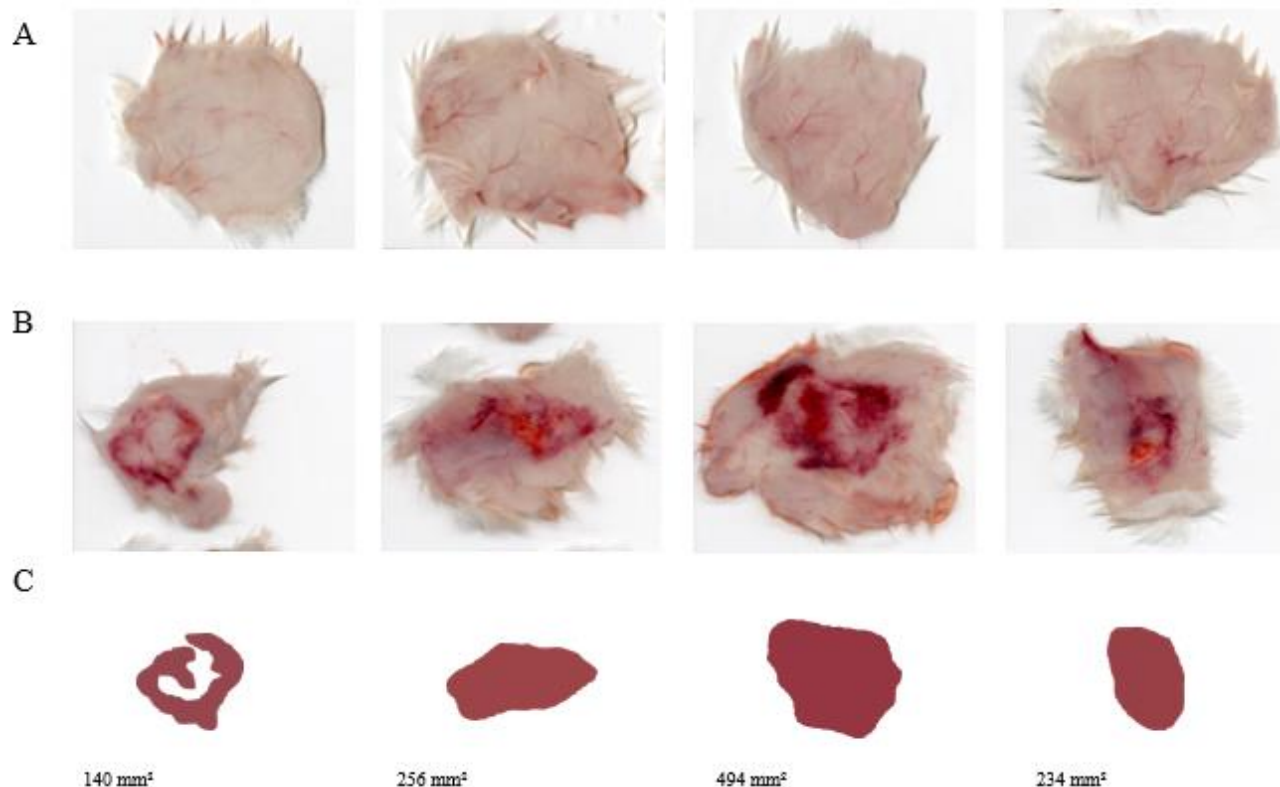


Figura 3. **A.** Fotografias de lesões hemorrágicas de tamanhos comparáveis induzidas pela injeção de solução salina. **B.** Fotografias de lesões hemorrágicas no dorso de camundongos tratados com antiveneno de tamanhos comparáveis, mas intensidades variadas, induzidas por 25µg de veneno de *Bothrops jararaca*. **C.** Determinação da gravidade da hemorragia por medida da área no dorso de camundongos tratados com soro antibotrópico.

Nos dias atuais, o envenenamento da vítima é avaliado através de parâmetros hematológicos utilizados para o acompanhamento do quadro clínico, diagnóstico e evolução do caso. Assim, com base nas análises dos hemogramas de camundongos envenenados, percebe-se que o veneno de *B. jararaca* e suas toxinas não têm como alvo os eritrócitos. Todos os valores da série vermelha, número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, permaneceram dentro dos valores normais quando comparados ao grupo controle (Figura 4).

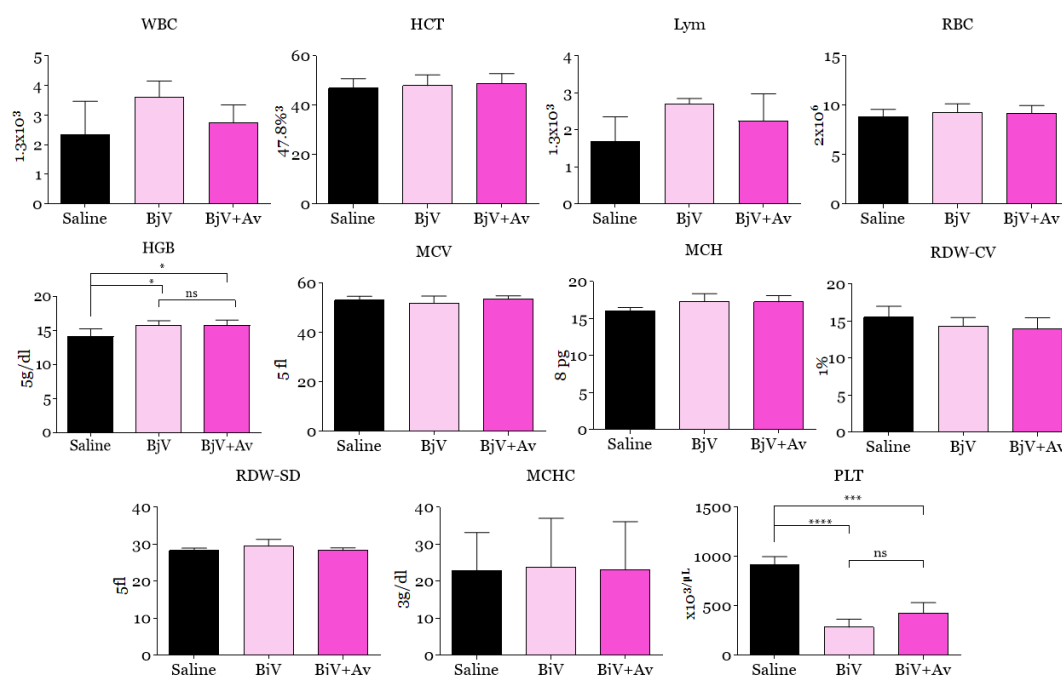


Figura 4. Contagem de leucócitos totais (WBC), linfócitos (Lym), Glóbulos Vermelhos (RBC), Hematócrito (HCT), Hemoglobina (HGB), Volume Corpuscular Médio (MCV), Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina (MCHC) e plaquetas (PLT) circulantes no sangue de camundongos injetados com veneno de *B. jararaca* e tratados com antiveneno. As células em amostras de sangue foram contadas em um analisador hematológico automatizado. As colunas representam a média $\pm$ DP ($n = 6/\text{grupo}$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$ e **** $p < 0,0005$ para as comparações indicadas (ANOVA one-way).

Contrapondo os dados obtidos no presente trabalho, Senise e colaboradores (2015)

identificaram a presença de hemólise intravascular, que durou 6 horas após a administração do veneno de *B. jararaca* na pata dos animais. Os autores relatam que a cor das amostras do plasma e da urina de camundongos envenenados era avermelhada, sugerindo hemoglobinemia. Consequentemente, foi observado que os níveis de hemoglobina no plasma estavam notavelmente elevados, especialmente às 3 e 6 horas, com retorno a normalidade às 24 horas.

No presente estudo, após a injeção do veneno de *B. jararaca*, os camundongos não apresentaram um quadro de trombocitopenia até 60 minutos da aplicação. Santoro e Sano-Martins (2004) constataram que o veneno de *B. jararaca* induzia uma diminuição

acentuada das plaquetas em 1 hora após o envenenamento e que esse quadro de trombocitopenia permanecia até 96 horas. Cavalcante e colaboradores (2016) ao estudar os dados plaquetimétricos de pacientes envenenados por *B. erythromelas*, constataram que 3 horas após envenenamentos, ocorria um quadro trombocitopênico. Assim, a presente investigação fornece dados que alertam para a importância do rápido atendimento ao paciente. ocorra em um período entre 1 e 3 horas após a exposição do indivíduo. Provavelmente, essa manifestação sistêmica já relatada, poderia ser parcialmente ou totalmente inibida com a introdução precoce da soroterapia.

Já os parâmetros hematológicos obtidos neste estudo, foram analisados após a injeção do veneno de *B. jararaca* no dorso dos animais e tratados com antivenenos. Yamashita et al. (2011) obtiveram resultados contraditórios aos aqui apresentados ao constatarem uma redução de cerca de 25% do edema modulado pelo veneno de *B. jararaca* em ratos trombocitopênicos, sugerindo assim, uma interface plaquetas-edema no modelo de envenenamento. Além disso, Yamashita (2013) identificou um quadro de leucocitose induzida pelo veneno de *B. jararaca* após 3 e 6 horas decorridas do envenenamento. De forma similar, Santoro e colaboradores (2008) identificaram um quadro de leucocitose em pacientes picados por *B. jararaca*. Entretanto, corroborando com o presente estudo, Oliveira e colaboradores (2017) identificaram um quadro de leucopenia induzido de forma dose-resposta pelo veneno de *Philodryas olfersi* em camundongos.

Os venenos animais são considerados uma inovação predatória no reino animal (Casewell et al., 2013). Assim, em contrapartida, a defesa fisiológica da presa/vítima contra a ação do envenenamento é tentar capturar as toxinas perto do local da picada, com a mobilização de leucócitos para gerar uma armadilha extracelular (Katkar et al., 2016). É importante mencionar que o processo de migração celular, como uma estratégia de

defesa para captura de toxinas presentes no tecido local consiste também em um mecanismo de ativação do sistema de reparo tecidual (Gutiérrez et al., 2018). Uma vez que o sistema de entrega do veneno, em associação a toxinas citotóxicas danifica o local (Jackson; Fry, 2016), há como resultado a presença de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio lesado (Rucavado et al., 2016).

A migração de leucócitos está relacionada a uma resposta inflamatória, assim como o extravasamento de líquidos e a vasodilatação arteriolar. Stock e Hoffman (2000) mostram que a leucopenia é uma queda global do número de células relacionadas à resposta imunológica do organismo. Frequentemente, essa manifestação é desencadeada pela redução no número circulante de neutrófilo, seguido da redução de leucócitos. Neutrófilos e monócitos desempenham um importante papel na defesa do organismo através da fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios. Entretanto, o neutrófilo é o tipo celular predominante durante a fase aguda do processo inflamatório, sendo depois substituído pelos monócitos (Abbas; Kumar; Fausto, 2005).

Wanderley e colaboradores (2014) identificaram um quadro de neutropenia induzido pelo veneno de *B. jararacussu* via intraplantar. Isso deve-se ao fato de que os neutrófilos são uma das primeiras células a deixar a vasculatura e migrar para o tecido durante o processo inflamatório. Essas células são atraídas por quimiocinas e mediadores inflamatórios, como IL-8 e INF- γ liberados pelas células endoteliais ativadas, macrófagos e mastócitos, e pelos produtos C3a e C5a do complemento ativado por veneno (Delafontaine et al., 2017, 2018; Owen et al., 2013). A migração é orientada pelo gradiente de concentração de mediadores (mecanismo denominado quimiotaxia) que são reconhecidos por receptores de superfície dos neutrófilos. Esta interação favorece o deslocamento dos neutrófilos pela matriz extracelular e sua rápida chegada ao sítio inflamatório (Mesquita et al., 2008).

No que se refere à população linfocitária neste estudo, foi identificado um quadro de linfopenia induzido pelo veneno de *B. jararaca* em ambos os tempos de análise. Quando investigada a diferenciação das populações linfocitárias, foi revelado que o quadro de linfopenia deu-se devido a queda do número de linfócitos atípicos. Um quadro de linfopenia também foi verificado em camundongos envenenados por *P. olfersi* por Oliveira e colaboradores (2017). Entretanto, os autores não realizaram a diferenciação linfocitária. Já Luna (2010), através da identificação de marcadores da superfície de células do sangue periférico, observou uma queda em relação ao percentual de linfócitos T 12 horas após o tratamento soroterápico. Subsequentemente, ocorreu a manutenção de níveis semelhantes nos pacientes leves e um ligeiro aumento seguido de leve diminuição ou manutenção de níveis semelhantes antes do tratamento em pacientes graves ou moderados (Luna, 2010).

O quadro de linfopenia sugere que, a queda do número de linfócitos indicaria a migração dessas células para os tecidos e sistemas afetados, contribuindo e/ou regulando os quadros inflamatórios observados; com isso, sua diminuição no sangue periférico, mas aqui não foi identificadas alterações no número de linfócitos. No entanto, com o fim do tratamento e a remissão dos sintomas e o equilíbrio percentual desses linfócitos seria estabelecido.

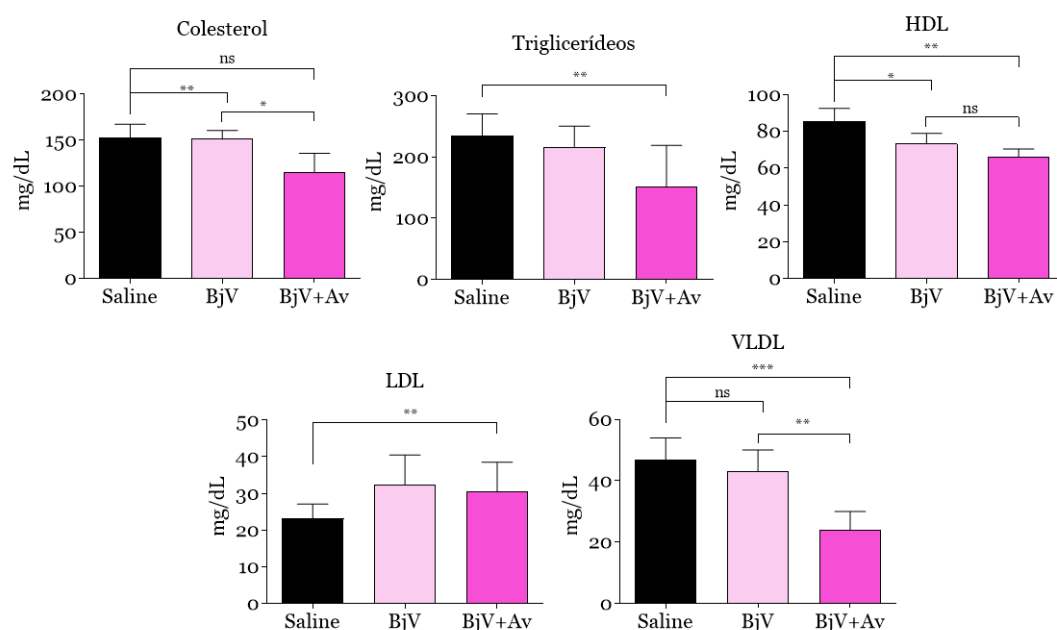


Figura 5. Perfil lipídico do soro de camundongos injetados com 25ug de veneno de *B. jararaca*, Veneno de *B. jararaca* (BjV), Veneno de *B. jararaca* + o tratamento com antiveneno antibotrópico (BjV+Av) tratados com 40uL de antiveneno botrópico, Colesterol total (CT), Triglicerídeos (TG), Lipoproteína de alta densidade (HDL), Lipoproteína de baixa densidade (LDL), Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). As amostras de soro foram processadas em um analisador automatizado. As colunas representam a média $\pm$ DP (n = 6/grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,005 e ****p < 0,0005 para as comparações indicadas (ANOVA one-way).

A avaliação do quadro clínico, diagnóstico e evolução de vítimas envenenadas por serpentes é realizada a partir da observação de alterações locais e parâmetros

A partir exames de hematológicos e complementares, os quais, são os meios efetivos de diagnósticos atuais. A partir disso, é importante a utilização de novos métodos de diagnóstico para se avaliar as alterações sofridas durante o envenenamento por serpentes. Assim, a análises do perfil lipídico de pacientes envenenados pode ser uma dessas ferramentas de diagnóstico.

De acordo com análises realizadas em camundongos envenenados e camundongos envenenados e tratados com soro antibotrópico, percebe-se que o veneno de *B. jararaca* e suas toxinas causa pequenas alterações no perfil lipídico. Onde os valores de HDL,

VLDL, LDL, colesterol e triglicerídeos, sofreram algumas pequenas alterações de animais envenenados e tratados com base no controle (Figura 5).

Segundo Rogerio et al (2015) alguns mediadores lipídicos são fortes estimuladores da resposta imune, a partir disso, colesterol, LDL e HDL podem estar relacionados à gravidade do envenenamento. Entretanto, existe uma divergência entre métodos utilizados o que pode estar relacionada com a sensibilidade destes. A espectrometria detecta e infere proteínas em uma amostra de forma mais sensível, enquanto ensaios bioquímicos analisam as concentrações de marcadores lipídico (Cavalcante, 2022).

É sabido que o veneno bruto de *Bothrops jararaca* em de diferentes concentrações pode oxidar a hemoglobina e desencadear a formação de metemoglobina. Para a análise utilizou-se 25ug de veneno de *B. jararaca*, esta concentração apresentou oxidação significativa e efeito sobre a hemoglobina de murinos.

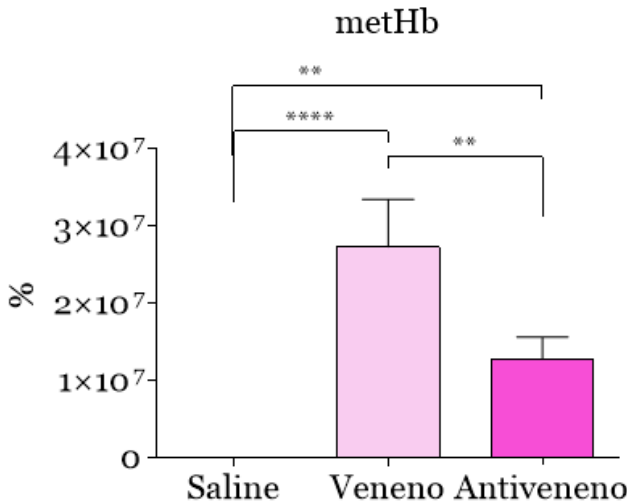


Figura 5. Atividade oxidante de 25ug do veneno de *B. jararaca* sobre a hemoglobina de murinos exibidos na porcentagem de formação de metemoglobina, a partir da hemoglobina livre e oxidada. Os resultados foram expressos como nas colunas representam a média $\pm$ DP (n = 6/grupo). *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,005 e ****p < 0,0005 para as comparações indicadas (ANOVA one-way).

Alguns estudos tentam compreender o efeito oxidativo causado pelos venenos ainda é mal descrito e interações entre veneno ofídico e hemoglobinas não são totalmente compreendidas (Sunitha, 2015; Williams, 2018). Segundo Melendez-Martinez (2017) o efeito oxidante causado por venenos ofídico pode estar relacionados à ação do L-aminoácido oxidases (svLAAOs) e/ou o peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais ocorrem os processos fisiopatológicos decorrentes da ação do veneno de *B. jararaca* e como a terapêutica atua para neutralização do veneno botrópico. No entanto, necessita-se da elucidação dos mecanismos de ação do veneno de *B. jararaca*, assim como, os processos de neutralização dos antivenenos brasileiros atuais.

Pode-se salientar que a investigação das moléculas envolvidas nesses mecanismos que resultam nas alterações fisiopatológicas e de distúrbios de hemostasia, ainda não esclarecidos para o envenenamento botrópico, é de grande valia para o desenvolvimento de uma terapêutica mais eficiente. Assim como o entendimento sobre a eficácia dos antivenenos.

A partir disso, será possível o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos para a evolução dos quadros clínicos de pacientes que sofreram acidentes ofídicos, como melhoramento e/ou desenvolvimento de um produto mais eficazes. Isto viabilizará um tratamento mais eficiente e seguro para pacientes acometidos.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran-Patologia. Elsevier Brasil, 2005.
- Baldo, Cristiani, et al. "Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis." *PLoS neglected tropical diseases* 4.6 (2010): e727.
- Cardoso, Fernanda Caldas, et al. "Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis." *Frontiers in Ecology and Evolution* 7 (2019): 218.
- CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in ecology & evolution*, v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013.
- Chippaux, J. P. (2015). Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 21, 1-17.
- DELAFONTAINE, M.; VILLAS-BOAS, I.; MATHIEU, L.; JOSSET, P.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. Enzymatic and pro-inflammatory activities of *Bothrops lanceolatus* venom: Relevance for envenomation. *Toxins*, v. 9, n. 8, p. 244, 2017.
- DELAFONTAINE, M.; VILLAS-BOAS, I. M.; PIDDE, G.; VAN DEN BERG, C. W.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Venom from *Bothrops lanceolatus*, a Snake Species Native to Martinique, Potently Activates the Complement System. *Journal of immunology research*, v. 2018, 2018.
- FÉLIX-SILVA, J.; GOMES, J.A.; XAVIER-SANTOS, J.B.; PASSOS, J.G.; SILVAJUNIOR, A.A.; TAMBOURGI, D.V.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. *Toxicon*, v.125, p. 74-83, 2017.
- França, F. O. S.; Fan, H. W. Acidente botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. cap 13, p. 149-160.
- Fox, J.; Gutiérrez, J. M. (Ed.). *Snake venom metalloproteinases*. MDPI, 2018.
- Gutiérrez J.M, Rucavado A. Snake Venom Metalloproteinases: Their Role in the Pathogenesis of Local Tissue Damage. *Biochimie* (2000) 82:841–50.
- Gutiérrez, José, et al. "Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding." *Toxins* 8.4 (2016): 93.
- Gutiérrez, José María, et al. "Snakebite envenoming." *Nature Reviews Disease Primers* 3 (2017):17063.

- Jackson, T.; Fry, B. A tricky trait: Applying the fruits of the “function debate” in the philosophy of biology to the “venom debate” in the science of toxinology. *Toxins*, v. 8, n. 9, p. 263, 2016.
- Jorge, Roberta Jeane B., et al. "Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil." *Journal of proteomics* 114 (2015): 93-114.
- Katkar, G. D et al. NETosis and lack of DNase activity are key factors in *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction. *Nature communications*, v. 7, p. 11361, 2016.
- Kouyoumdjian, J. A.; Kouyoumdjian, N. C.V. Acidentes Ofídicos "estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto", *A revista do Clínico Geral*, p. 55-93, set. 1986.
- LUNA, K.P.O.; XAVIER, E.M.; PASCOAL, V.P.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, V.R.A. Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 6, p. 731-732, 2010.
- Markland F. S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998; 36(12): 1749-800. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00126-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00126-3) PMID: 9839663.
- Melendez-Martinez D, Munoz JM, Barraza-Garza G, et al. Rattlesnake *Crotalus molossus nigrescens* venom induces oxidative stress on human erythrocytes. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2017; 23: 24-30.
- Mesquita J. R, et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 10, p. 66-81, 2008.
- OLIVEIRA, J. S.; SANT'ANNA, L. B.; JUNIOR, M. C. O.; SOUZA, P. R.; SOUZA, A. S. A.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C. Local and hematological alterations induced by *Philodryas olfersii* snake venom in mice. *Toxicon*, v. 132, p. 9-17, 2017.
- Owen, J. A. *Kuby immunology*. New York: WH Freeman, 2013.
- Puerto, G. acidentes por cobras. In: SCHVARTSMAN, S. (Coord.). *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo: Sarvier, 1992. cap. 13, p. 143-149.
- Rogério, A.D.P.; Sorgi, C.A.; Sadikot, R.; Carlo, T. The role of lipids mediators in inflammation and resolution. *BioMed Res. Int.* 2015. 605959.
- Roodt, A. R. de; Dolab, J. A.; Hajos, S. E.; fernandez, T.; Segre, L. Capacidad neutralizante de los sueros antiofidicos frente al veneno de *Bothrops moojeni* (Caisaca, Lanzadera). *Medicina (Buenos Aires)*, v. 57, n. 6, p. 667-676, 1997.
- Rucavado, Alexandra, et al. "Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway." *Toxins* 8.12 (2016): 349.

- Sánchez L.V., Pla D., Herrera M., Chippaux J.P., Calvete J.J., Gutiérrez J.M. Evaluation of the preclinical efficacy of four antivenoms, distributed in sub-Saharan Africa, to neutralize the venom of the carpet viper, *Echis ocellatus*, from Mali, Cameroon, and Nigeria. *Toxicon*. 2015;106:97–107.
- Santoro, M. L.; Sano-Martins, I. S. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thrombosis and haemostasis*, v. 92, n. 08, p. 369-383, 2004.
- Santoro, M. L.; Sano-Martins, I. S.; Fan, H. W.; Cardoso, J. L.; Theakston, R. D. G.; Warrell, D. A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon*, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.
- Senise, L. V.; Yamashita, K. M.; Santoro, M. L. *Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis. *Experimental Biology and Medicine*, v. 240, n. 11, p. 1528-1536, 2015.
- SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C. A.; POZNER, R. G.; VENTURA, J. S.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochemical Journal*, v. 369, n. 1, p. 129-139, 2003.
- STOCK, W.; HOFFMAN, R. White blood cells 1: non-malignant disorders. *The Lancet*, v. 355, n. 9212, p. 1351-1357, 2000.
- Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, *et al*. Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. *Toxicon* 2015; 98: 89-97.
- Wanderley, C. W. S.; Silva, C. M. S.; Wong, D. V. T.; Ximenes, R. M.; Morelo, D. F. C.; Cosker, F.; Brito, G. A. C. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid-and neutrophil-dependent manner. *Toxicon*, v. 90, p. 134-147, 2014.
- Williams H.F, Hayter P, Ravishankar D, *et al*. Impact of *Naja nigricollis* venom on the production of methaemoglobin. *Toxins (Basel)* 2018; 10(12): 539-51.
- Yamashita, K. M.; *et al*. “Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and *Bothrops jararaca* snake venom.” *Journal of thrombosis and haemostasis*, v. 9, n. 10, p. 2057-2066, 2011.
- Yamashita, K. M. Patogênese dos distúrbios hemostáticos sistêmicos induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo