

## A EFICÁCIA DO ANTIVENENO BOTRÓPICO-CROTÁLICO NA NEUTRALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*.

Maria Cristina DOS-SANTOS(1), Luís Roberto de Camargo GONÇALVES(2), Consuelo L. FORTES-DIAS(3), Yara CURY(2), José Maria GUTIÉRREZ(4) & Maria de Fátima D. FURTADO(5)

### RESUMO

A mionecrose é um dos efeitos causados pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. Uma miotoxina com homologia estrutural à fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), mas sem atividade enzimática, foi isolada desse veneno. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta também atividade miotóxica, que vem sendo atribuída à crotoxina e à PLA<sub>2</sub> (crotoxina B), o componente básico do complexo crotoxina. O veneno de *Bothrops jararacussu* apresenta três proteínas, que têm identidade imunológica com a PLA<sub>2</sub> da crotoxina. O presente trabalho comparou a eficiência dos antivenenos polivalentes comerciais produzidos pelo Instituto Butantan - o antiveneno botrópico (AB) e o antiveneno botrópico-crotálico (AB/C) - na neutralização das atividades letal, hemorrágica, coagulante e miotóxica do veneno de *B. jararacussu*. Os dois antivenenos neutralizaram de maneira semelhante a atividade hemorrágica, mas o AB/C foi três vezes mais potente que o AB em neutralizar a ação miotóxica e duas vezes mais potente na neutralização da letalidade e na ação coagulante do veneno de *B. jararacussu*. Os dados sugerem que a utilização do AB/C pode ser vantajosa no tratamento de pacientes picados por serpentes dessa espécie.

**Unitermos:** *Bothrops jararacussu*; Soroterapia.

### INTRODUÇÃO

Nos acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops*, são frequentes fenômenos como dor local, edema, hemorragias locais e sistêmicas, distúrbios de coagulação sangüínea<sup>3,24</sup>, choque cardiovascular<sup>30</sup> e necrose cortical renal<sup>1</sup>.

As mionecroses são frequentes também nos envenenamentos botrópicos<sup>13</sup>. Lesões musculares induzidas por venenos ofídicos ou por frações isoladas com atividade miotóxica apresentam correlação com o aumento de creatina-quinase sérica (CK)<sup>19,21</sup>.

Recentemente foi demonstrado que o veneno de *Bothrops jararacussu* é miotóxico, causando

necrose de fibras musculares estriadas e retardando sua regeneração<sup>22</sup>. Esse veneno, quando injetado pela via intramuscular em ratos, induz a uma maior liberação da enzima creatina-quinase, quando comparado a outros venenos botrópicos<sup>17</sup>.

Proteínas com atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)<sup>29,14</sup> foram isoladas do veneno de *B. jararacussu*, dentre as quais uma apresentou atividade miotóxica<sup>14</sup>. Desse veneno, foi isolada ainda uma proteína com homologia estrutural à PLA<sub>2</sub>, sem atividade enzimática, mas com potente atividade miotóxica, denominada bothroptoxin<sup>14</sup>.

O veneno da cascavel sul-americana (*Crotalus*

(1) Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

(2) Seção de Fisiopatologia Experimental, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

(3) Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, Brasil.

(4) Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

(5) Seção de Venenos, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Maria de Fátima D. Furtado, Seção de Venenos, Instituto Butantan Av. Vital Brazil, 1.500. Caixa Postal 65 CEP 05504, São Paulo, SP, Brasil.

*durissus terrificus*) apresenta também potente atividade miotóxica, que é atribuída ao complexo crotóxina<sup>12,15</sup>, presente em altas concentrações nesse veneno (68% do peso seco)<sup>6</sup>. O complexo crotóxina é formado por duas proteínas: a crotapotina (crotaxina A) e a fosfolipase A<sub>2</sub> (crotóxina B). Camundongos imunizados com PLA<sub>2</sub> do complexo crotóxina tornam-se protegidos, tanto da ação letal<sup>8</sup> como da ação miolítica causadas pela administração de doses letais de veneno de *Crotalus durissus terrificus*<sup>9</sup>.

Estudos recentes, com antivenenos monovalentes produzidos em equínos contra vários venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, mostram que o veneno de *B. jararacussu* comporta-se como um imunógeno fraco. A atividade letal desse veneno não é eficientemente neutralizada pelo anti-soro específico, como também por anti-soros produzidos contra outros venenos botrópicos<sup>7</sup>. Camundongos imunizados contra o veneno de *B. jararacussu* apresentam títulos baixos de anticorpos, em comparação aos de animais imunizados contra venenos de outras espécies do gênero *Bothrops*<sup>18</sup>.

BRAZIL, em 1909, demonstrou que o veneno de *B. jararacussu* é, dentre alguns venenos botrópicos, o melhor neutralizado quanto à sua ação letal pelo antiveneno crotálico<sup>2</sup>. O mesmo autor sugeriu que o antiveneno botrópico-crotálico, chamado de soro antiofídico até 1987, deveria ser usado nos acidentes causados por serpentes dessa espécie<sup>3</sup>.

Baseados nessas informações, nos propuzemos a comparar os dois soros comerciais produzidos pelo Instituto Butantan, o antiveneno botrópico (AB) e o antiveneno botrópico-crotálico (AB/C), quanto ao poder de neutralização das atividades hemorrágica, miotóxica, coagulante e letal causadas pela ação do veneno de *B. jararacussu*.

## MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS- Camundongos machos não isogênicos, pesando entre 18 e 22 gramas, provenientes do Biotério do Instituto Butantan, foram utilizados em todos os experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, sob temperatura ambiente controlada para 20-25°C.

VENENO- Uma mistura de veneno foi obtida da extração de 20 serpentes adultas do gênero *Bothrops jararacussu*, procedentes da Seção de Venenos do Instituto Butantan. A mistura de vene-

no foi liofilizada, estocada e mantida a -20°C até o momento do uso.

ANTIVENENOS- Nos testes de soroneutralização, foram utilizados os antivenenos botrópico (AB), lote 8904100 (potência frente ao veneno de *B. jararaca* = 5mg/ml), botrópico-crotálico (AB/C), lote 8908209 (potência frente ao veneno de *B. jararaca* = 5mg/ml e frente ao veneno de *C. d. terrificus* = 1,5mg/ml) e o antiveneno crotálico lote 8910264 (potência frente ao veneno de *C. d. terrificus* = 1,5mg/ml), produzidos no Instituto Butantan. Os antivenenos foram obtidos a partir de plasma sangüíneo de cavalos hiperimunes.

FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>- A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) foi purificada do complexo crotóxina, de acordo com o método de RÜBSAMEN et al.<sup>26</sup>. A homogeneidade da PLA<sub>2</sub> foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS (Dodecil-Sulfato de Sódio). A atividade fosfolipásica foi detectada por meio da técnica de coagulação da gema de ovo<sup>29</sup>.

DOT-ELISA- A técnica Dot-ELISA<sup>28</sup> foi utilizada para avaliar o título de anticorpos anti-*B. jararacussu* presente nos antivenenos AB, AB/C e AC, e o título de anticorpos anti-PLA<sub>2</sub> crotálica presente nos antivenenos AB e AB/C. Dois microlitros de veneno de *B. jararacussu* (1mg/ml) ou 2µl de PLA<sub>2</sub> crotálica (1mg/ml) foram aplicados por ponto, em uma membrana de nitrocelulose. Após a secagem a 35°C por 15 minutos, a superfície da membrana não ocupada pelos antígenos foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado (Glória, Fábrica de Laticínios, Itaperuna, Rio de Janeiro, Brasil), diluído em Tampão tris salina (TBS). Esse bloqueio foi realizado durante 2 horas, sob agitação, a temperatura ambiente. A membrana foi retirada da solução bloqueadora e incubada na presença dos antivenenos em diferentes diluições (1:800 a 1:405.600), por 1 hora, sob agitação e a temperatura ambiente. Após lavagens com TBS, a reação antígeno-anticorpo foi revelada pela adição do conjugado antiimunoglobulinas de cavalo marcado com peroxidase (Sigma), diluído em TBS (1:500), incubado por 1 hora sob agitação e a temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada e a peroxidase do conjugado revelada com 3'3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma, USA), utilizando-se 250µl da solução (20mg/ml) em 30ml de TBS, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (20µl).

TESTES DE SORONEUTRALIZAÇÃO- Do-

ses fixas de veneno de *Bothrops jararacussu* foram incubadas com diferentes concentrações dos antivenenos (AB ou AB/C), durante 30 minutos, a 37°C. Após a incubação, as misturas foram injetadas por diferentes vias obtendo-se, para as diferentes atividades avaliadas, a Dose Efetiva 50% (DE<sub>50</sub>). A DE<sub>50</sub> é definida como a quantidade de antiveneno que é capaz de reduzir em 50% a atividade da dose desafio utilizada (µl antiveneno/dose desafio).

**DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA HEMORRÁGICA (DMH)**- Para a determinação da DMH foi utilizado o método de OWNBY et al.<sup>20</sup>. Considerou-se a DMH como a quantidade de veneno (µg) capaz de liberar 20mg de hemoglobina/grama de tecido. Para esse teste, 6 camundongos por grupo foram injetados pela via intramuscular, com 0,1ml de veneno *B. jararacussu* nas doses de 6,3µg, 12,5µg, 25µg e 50µg. Após 4 horas, foi efetuada uma biópsia do tecido muscular da região injetada. Após pesagem do tecido retirado, avaliou-se a quantidade de hemoglobina presente, pela técnica da cianometahemoglobina.

**NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA**- A neutralização da atividade hemorrágica foi também avaliada pelo método de OWNBY et al.<sup>20</sup>. A dose de veneno utilizada correspondeu a 6 DMH (50µg). Para este experimento foram usados 6 camundongos por grupo. Trinta e um, 63, 125 e 250µl de antiveneno AB ou AB/C por mg de veneno foram utilizados para a avaliação da neutralização.

**ATIVIDADE MIOTÓXICA**- O grau de lesão muscular causada pela ação do veneno de *B. jararacussu* foi averiguado por meio da determinação da quantidade de enzima creatina-quinase (CK), liberada na circulação sanguínea dos camundongos, utilizando-se o "kit" CK na-ativado (Merck S/A, Rio de Janeiro, Brasil). Para a determinação do pico de liberação desta enzima, 6 camundongos foram injetados com 0,1ml de veneno (250µg/ml), pela via intramuscular. Amostras de sangue foram coletadas do plexo venoso oftálmico imediatamente antes e 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas após a injeção do veneno.

**NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE MIOTÓXICA**- Para avaliação da soroneutralização, foram utilizados 4 grupos contendo 6 camundongos cada. Vinte e cinco microgramas do veneno previamente incubado com antiveneno AB, AB/

C ou antiveneno crotálico (AC) (63, 125, 250 e 500µl/mg de veneno) foram injetados (0,1ml), pela via i.m., em cada camundongo. Os valores de CK foram determinados nas terceira e sexta horas após a inoculação das misturas.

**LETALIDADE**- Para a determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>), grupos de 8 camundongos foram injetados, pela via intraperitoneal, com 0,5ml de cada solução de veneno diluído em NaCl 0,15M. O número de animais mortos para cada dose de veneno foi registrado num período de 48 horas. A DL<sub>50</sub> foi calculada pela análise do proibito<sup>10</sup>, usando o número total de camundongos mortos por dose de veneno.

**NEUTRALIZAÇÃO DA LETALIDADE**- O método utilizado neste experimento é o proposto pela Organização Mundial da Saúde (1981)<sup>31</sup>. Aproximadamente 5 DL<sub>50</sub> (300µg) de veneno foram incubadas com quantidades diferentes de antiveneno (20 a 120µl), durante 30min a 37°C. Seis grupos de 6 camundongos cada foram inoculados pela via i.p. com 0,5ml da mistura. As mortes foram registradas 48 horas após.

**ATIVIDADE COAGULANTE**- Foi avaliada pelo método de THEAKSTON & REID<sup>27</sup>, por meio da determinação da dose mínima coagulante em plasma humano. A dose mínima coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de veneno que induz a formação de coágulo no plasma, em 60 segundos, a 37°C.

**NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE** - Para a avaliação da neutralização da atividade coagulante, utilizou-se o método de GENÉ et al.<sup>11</sup>, modificado. Quantidades constantes de veneno foram incubadas com várias diluições de antiveneno, durante 30min, a 37°C. Cem microlitros da mistura foram adicionados a 400µl de plasma humano citratado e o tempo de coagulação registrado. A concentração final de veneno correspondeu a duas vezes a DMC. A neutralização foi expressa como Dose Efetiva (DE), a qual é definida como a relação antiveneno/veneno, onde o tempo de coagulação aumenta em três vezes quando comparado ao tempo de coagulação do plasma incubado somente com o veneno. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

## RESULTADOS

**DOT-ELISA**- Na técnica de Dot-ELISA, os tí-

tulos de anticorpos para cada antiveneno, frente ao veneno de *B. jararacussu* e PLA<sub>2</sub> crotálica, foram os seguintes: para o antiveneno botrópico, 16.000 e 800; para o antiveneno botrópico-crotálico, 32.000 e 1.600, respectivamente. O antiveneno crotálico apresentou um título de 8.000 contra o veneno de *B. jararacussu*.

**LETALIDADE-** A DL<sub>50</sub> foi de 58,8µg/20g (2,9mg/kg) (Tabela 1). A dose usada na soroneutralização foi de 300,0µg/animal, correspondente a 5,1 DL<sub>50</sub>.

A Dose Efetiva 50% foi de 104,5µl de antiveneno/300µg de veneno para o AB, e de 69µl de antiveneno/300µg de veneno para o AB/C. Estes valores correspondem a uma potência de 2,3mg de veneno neutralizado por mililitro de antiveneno no caso do AB e 3,5mg/ml para o AB/C (Tabela 2).

**ATIVIDADE HEMORRÁGICA-** A Dose Mí-

Tabela 1

Quantificação das ações letal, hemorrágica e coagulante do lote de veneno de *Bothrops jararacussu* utilizado.

Ações	Atividade (µg)
Letal	DL <sub>50</sub> <sup>(1)</sup> 58.8 (52.3-67.7)*
Hemorrágica	DMH <sup>(2)</sup> 8.25
Coagulante	DMC <sup>(3)</sup> 130.0

(1) Dose letal 50%

(\*) Limite fiducial com 95%

(2) Dose mínima hemorrágica

(3) Dose mínima coagulante

Tabela 2

Efeito neutralizante do AB e do AB/C sobre as atividades letal, hemorrágica, coagulante e miotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu*.

Atividades	Dose Desafio	Dose Efetiva		
		AB	AB/C	AC
Letal	300µg	104.5 <sup>(1,2)</sup>	69.0 <sup>(1,2)</sup>	nt <sup>(4)</sup>
Hemorrágica	50µg	1.43 <sup>(1)</sup>	1.35 <sup>(1)</sup>	nt
Coagulante	260µg	330.0 <sup>(3)</sup>	176.0 <sup>(3)</sup>	nt
Miotóxica	25µg	25.75 <sup>(1)</sup>	8.0 <sup>(1)</sup>	22.5 <sup>(1)</sup>

(1) DE<sub>50</sub> = µl de soro/dose desafio de veneno

(2) Os valores de DE<sub>50</sub> para atividade letal correspondem a uma potência de 2,3mg/ml para SAB e 3,5mg/ml para o SAB/C

(3) Dose Efetiva

(4) Não testado

nima Hemorrágica (DMH) obtida foi de 8.25µg de veneno (Tabela 1). Na soroneutralização, a dose usada correspondeu a 6 DMH (50µg). A Dose Efetiva 50% foi de 1.43µl de antiveneno/50µg de veneno, para o antiveneno botrópico e de 1.35µl de antiveneno/50µg, para o antiveneno botrópico-crotálico (Tabela 2).

**ATIVIDADE MIOTÓXICA-** Como podemos observar na figura 1, a liberação da enzima creatina-quinase atingiu valores máximos na terceira hora após a injeção do veneno de *B. jararacussu*. Esses valores mantiveram-se constantes até a sexta hora, voltando ao nível basal 12 horas após a inoculação do veneno.

Baseado na cinética da liberação de CK, a soroneutralização foi avaliada 3 e 6 horas após a injeção das misturas veneno/antiveneno, tempo em que foram observados os níveis mais altos da enzima no soro dos animais. O AB apresentou uma DE<sub>50</sub> de 25,75µl de antiveneno/25µg de veneno, o AB/C, uma DE<sub>50</sub> de 8µl de antiveneno/25µg e o AC uma DE<sub>50</sub> de 22.5µl de antiveneno/25µg de veneno. O AB/C mostrou ser mais eficiente que o AB na neutralização desta atividade (Tabela 2). Por sua vez, o AC apresentou uma eficiência semelhante ao AB.

**ATIVIDADE COAGULANTE-** A Dose Mínima Coagulante (DMC), sobre plasma humano, foi de 130µg de veneno (Tabela 1). Para soroneutralização utilizaram-se duas DMC. A Dose Efetiva foi de 330µl de antiveneno/260µg de veneno, para o antiveneno botrópico, e de 176µl de antiveneno/260µg de veneno, para o antiveneno botrópico-crotálico (Tabela 2).

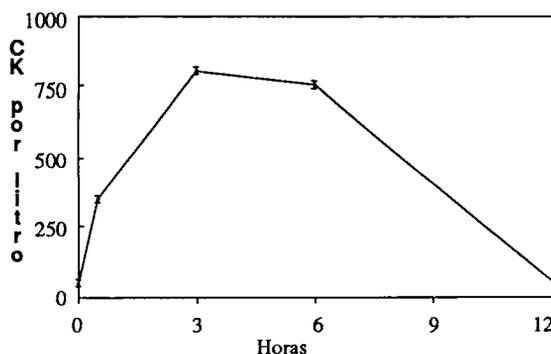


Figura 1. Cinética da liberação da enzima creatina-quinase na circulação sanguínea de camundongos (n=6), após a inoculação do veneno de *Bothrops jararacussu*.



**Figura 2.** Distribuição geográfica da espécie *Bothrops jararacussu* segundo CAMPBELL & LAMAR, 1989<sup>5</sup>.

## DISCUSSÃO

Os venenos botrópicos caracterizam-se pelas intensas reações locais que induzem, tais como edema, hemorragias e necroses, o que não ocorre com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, predominantemente neurotóxico<sup>3,24</sup>. Apesar dessas diferenças marcantes, os venenos botrópicos e o veneno de *Crotalus durissus terrificus* possuem atividades biológicas em comum, como as ações coagulante<sup>4</sup> e miotóxica<sup>17</sup>.

O antiveneno botrópico (AB) é produzido a partir de uma mistura de sete espécies de venenos do gênero *Bothrops*: *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*. O antiveneno botrópico-crotálico (AB/C) é produzido utilizando-se a mistura dos venenos das sete espécies acima citadas, acrescido do veneno de *Crotalus durissus terrificus*<sup>23</sup>.

Os dois antivenenos, o AB e o AB/C, conteriam, teoricamente, quantidades de anticorpos iguais contra o veneno de *B. jararacussu*, pois este veneno está presente, na mesma concentração, nas doses de antígenos usadas na imunização. Entretanto, os dados obtidos pelo método de Dot-ELISA demonstram que o AB/C contém títulos maiores contra o veneno de *B. jararacussu*, em relação aos antivenenos botrópico e crotálico (32.000; 16.000 e

8.000, respectivamente). O AB/C possui, ainda, títulos maiores em relação ao AB contra a PLA<sub>2</sub> isolada do complexo crotóxina. Esses dados não representam uma particularidade destes lotes de antivenenos, uma vez que foram utilizados três lotes diferentes de cada antiveneno e todos apresentaram, entre si, títulos de anticorpos iguais (dados não mostrados).

O veneno de *B. jararacussu* confirmou-se um imunógeno fraco<sup>7,18</sup>, apresentando títulos baixos, mesmo contra o AB/C, que foi o antiveneno que apresentou maiores títulos dentre os três antivenenos testados.

Comparando-se os dois antivenenos (AB e AB/C), o poder neutralizante das ações letal, coagulante e miotóxica foi maior por parte do AB/C (Tabela 2). Quanto a ação letal, é importante ressaltar que os dois antivenenos possuem a mesma potência contra o veneno de *B. jararaca* (5mg/ml), porém, no caso do veneno de *B. jararacussu*, essa potência foi menor, variando de 2.3mg/ml para o AB e 3.5mg/ml para o AB/C.

A ação miotóxica induzida pelos venenos botrópicos pode ser devida a: 1) a presença de miotoxinas que afetam diretamente o tecido muscular; 2) a uma ação indireta, devido a uma isquemia promovida pelo comprometimento da microcirculação do tecido muscular por ação de hemorraginas presentes nesses venenos e 3) uma combinação dos dois itens anteriores<sup>13</sup>.

O veneno de *B. jararacussu* possui componentes miotóxicos<sup>14</sup> e é hemorrágico<sup>22</sup>. A maior proteção dada pelo antiveneno AB/C pode ser atribuída a uma melhor neutralização dos dois componentes capazes de induzir uma lesão muscular; o hemorrágico, que é bem neutralizado pelos dois antivenenos (AB e AB/C), e o miotóxico, que pode estar sendo reconhecido imunologicamente pelos anticorpos anti-PLA<sub>2</sub> presentes no AB/C provenientes do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Alguns dados contribuem para esta hipótese: (1) os venenos de *B. jararacussu* e de *B. pirajai* apresentaram três bandas com pesos moleculares aproximadamente 14.000, 18.000 e 25.000 daltons, quando revelados com o antiveneno antifosfolipase A<sub>2</sub> crotálica, pela técnica de Western Blot (dados não publicados); (2) o AB/C, quando comparado ao AB, possui títulos maiores de anticorpos, tanto contra PLA<sub>2</sub> isolada do complexo crotóxina quanto contra o veneno de *B. jararacussu* e (3) o

antiveneno crotálico (AC) neutralizou a ação miotóxica do veneno de *B. jararacussu*, com uma  $DE_{50}$  semelhante ao AB (22.5 e 25.75  $\mu$ l/25  $\mu$ g de veneno, respectivamente).

Quanto à ação coagulante do veneno de *B. jararacussu*, o AB/C foi mais potente que o AB em neutralizar esse efeito. Esse resultado vai de acordo com os dados de ROSENFELD & KELEN (1966)<sup>25</sup>, que obtiveram efeito semelhante e demonstraram que o veneno de *B. jararacussu* é um dos venenos botrópicos que têm a sua ação coagulante melhor neutralizada pelo antiveneno crotálico monovalente.

A medida do tempo de coagulação sanguínea (TC) é utilizada na clínica como um parâmetro de monitoramento dos pacientes picados por serpentes, tanto para a soroterapia como para o teste de neutralização do veneno circulante<sup>16</sup>.

Os dois antivenenos tiveram a mesma eficiência em neutralizar a atividade hemorrágica do veneno de *B. jararacussu*. Cabe ressaltar que, dentre todas as atividades avaliadas, a hemorrágica é a única que está presente apenas nos venenos botrópicos.

Os resultados apresentados nesse trabalho reforçam as observações feitas por BRAZIL<sup>3</sup> e sugerem que a utilização do antiveneno botrópico-crotálico no tratamento de pacientes picados por *B. jararacussu* (distribuição geográfica fig. 2<sup>5</sup>) pode ser vantajosa, uma vez que as ações mais importantes desse veneno, como a letal, coagulante e miotóxica, foram melhor neutralizadas por esse antiveneno.

## SUMMARY

### The efficacy of the Bothropic/Crotalic antivenom on the neutralization of the main *Bothrops jararacussu* venom activities.

Myonecrosis is one of the effects of *Bothrops jararacussu* venom, from which a myotoxin was isolated showing structural homology to phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), but without enzymatic activity. Such myotoxic activity is also present in the *Crotalus durissus terrificus* venom, and is attributed to crotoxin and to PLA<sub>2</sub> (crotoxin B), the basic component of the crotoxin complex. The *Bothrops jararacussu* venom showed three proteins with immunologic identity to PLA<sub>2</sub> from crotoxin. The bothropic (AB) and the bothropic/crotalic (AB/C)

antivenoms, two commercial polyvalent antivenoms produced at Instituto Butantan, were compared in order to assess their capacity for neutralization of the lethal, hemorrhagic, coagulant and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. Both antivenoms showed the same level of hemorrhagic activity neutralization. However, AB/C was about three times more efficient than AB in neutralizing the myotoxic activity, and two times more potent for neutralization of lethality and coagulant activity of *Bothrops jararacussu* venom. These data suggest that the use of AB/C could be of value in the treatment of patients bitten by snakes of this species.

## AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Srta. Silvana Arná Massoni e Cristine Colella pela elaboração das tabelas e gráficos como também pelo apoio na área de informática e Dra. E. M. Kelen, pelas sugestões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, C.F.S.; DA SILVA, O.A.; GODOY, P. & MIRANDA, D. - Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon*, 23: 877-885, 1985.
2. BRAZIL, V. - Serumtherapia antiophidica. *Rev. Med. S. Paulo*, 12: 293-307, 1909.
3. BRAZIL, V. - *La Défense contre L'Ofidisme*. 2 ed. São Paulo, Pocaí-Weiss & Co., 1914.
4. BRAZIL, V. & PESTANA, B.R. - Nova contribuição ao estudo do envenenamento ofídico. VI. Ação coagulante. *Rev. Med. S. Paulo*, 12: 349-442, 1909.
5. CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. - *The venomous reptiles of Latin America*. Comstock Publishing Associates, 1989.
6. DA SILVA, M.H. & BIER, O.G. - Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Toxicon*, 20: 563-569, 1982.
7. DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATTI, C.P.; MORAIS, I.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R. & SANTOS, M.J. - Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan*, 51: 153-168, 1989.
8. DOS SANTOS, M.C.; DINIZ, C.R.; WHITAKER-PACHECO, M.A. & DIAS DA SILVA, W. - Phospholipase A<sub>2</sub> injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 26: 207-213, 1988.

9. DOS SANTOS, M.C. - Fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* induz proteção contra os efeitos letal (camundongos e eqüídeos) e miolítico (camundongos) causados pela ação do veneno total. Belo Horizonte, 1989. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais).
10. FINNEY, D.J. - *Probit analysis*. 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1971.
11. GENÉ, J.A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. & CERDAS, L. - Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27: 841-848, 1989.
12. GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J. & ELDER, H.Y. - Cellular mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon*, 22: 85-98, 1984.
13. GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. - Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*, 51: 211-223, 1989.
14. HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & GIGLIO, J.R. - Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, 26: 615-627, 1988.
15. KOUYOUMDJIAN, J.A.; HARRIS, J.B. & JOHNSON, M.A. - Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. *Toxicon*, 24: 575-581, 1986.
16. MANUAL DO MINISTÉRIO DA SAÚDE - Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1987.
17. MEBS, D.; EHRENFELD, M. & SAMEJIMA, Y. - Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine-kinase. *Toxicon*, 21: 393-404, 1983.
18. MOURA DA SILVA, A.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; NISHIKAWA, A.K.; BRODSKYN, C.I.; DOS SANTOS, M.C.; FURTADO, M.F.D.; DIAS DA SILVA, W. & MOTA, I. - Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. *Toxicon*, 28: 181-188, 1990.
19. NAKADA, N.; NAKADA, F.; ITO, E. & INOUE, F. - Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatin-phosphokinase activity in mice sera. *Toxicon*, 22: 921-930, 1984.
20. OWNBY, C.L.; COLBERG, T.R. & ODELL, G.V. - A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon*, 22: 227-233, 1984.
21. OWNBY, C.L.; GUTIÉRREZ, J.M.; COLBERG, T.R. & ODELL, G.V. - Quantification of myonecrosis induced by myotoxin alpha from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon*, 20: 877-890, 1982.
22. QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L. & PRADO-FRANCESCHI, J. - Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venoms. *Toxicon*, 22: 339-346, 1984.
23. ROLIM-ROSA, R.; VIEIRA, E.G.J.; SILES-VILLAROEL, M.; SIRACUSA, Y.Q. & IIZUKA, H. - Análise comparativa entre os diferentes esquemas de imunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957-1979). *Mem. Inst. Butantan*, 44/45: 259-270, 1980/81.
24. ROSENFELD, G. - Symptomatology, Pathology and Treatment of snake bites in South America. *In*: BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E., ed. *Venomous Animals and their Venoms*. New York, Academic Press, 1971. V. 2, cap. 34. p.345-384.
25. ROSENFELD, G. & KELEN, E.M.A. - Cross neutralization of the coagulant activity of some snake venoms by antivenoms. *Toxicon*, 4: 7-15, 1966.
26. RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H. & HABERMANN, E. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 270: 274-288, 1971.
27. THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. - Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 61: 949-956, 1983.
28. TOWBIN, H. & GORDON, J. - Immunoblotting and dot-immunobinding: current status and outlook. *J. Immunol. Meth.*, 72: 313-320, 1984.
29. VIDAL, J.C. & STOPPANI, A.O.M. - Isolation and purification of two phospholipase A from *Bothrops* venoms. *Arch. Biochem. Biophys.*, 145: 543-556, 1971.
30. VITAL-BRAZIL, O. - Peçonhas, *In*: CORBETT, C.E., ed. *Farmacodinâmica*. Rio de Janeiro, 1982. p. 1044-1074.
31. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Off-Set Publication, 51, 1981.

Recebido para publicação em 10/10/1990  
Aceito para publicação em 20/03/1992