

INEFICÁCIA DO ANTIVENENO BOTRÓPICO NA NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DO VENENO DE *LACHESIS MUTA MUTA*. RELATO DE CASO E COMPROVAÇÃO EXPERIMENTAL

Raunza BARD (1), José Carlos R. de LIMA (1), Raymundo Pereira de SA NETO (2), Silas Guedes de OLIVEIRA (3,4) & Maria Cristina dos SANTOS (4).

RESUMO

No Estado do Amazonas, nas regiões circunvizinhas à cidade de Manaus, as principais espécies de serpentes causadoras de acidentes são *Bothrops atrox* e *Lachesis muta muta* com um percentual de ocorrência, dos acidentes confirmados, de 76% e 17%, respectivamente. Rotineiramente, na ausência dos soros antilaquético e antibotrópico-laquético o Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM), utiliza-se do soro antibotrópico no tratamento do acidente laquético. Neste trabalho relatamos um caso de acidente por *L. m. muta*, onde o paciente foi tratado com 20 ampolas do soro antibotrópico e permaneceu com o sangue incoagulável até o 13º dia após o acidente. Experimentos foram realizados para obtenção das potências do soro antibotrópico para as atividades coagulante e hemorrágica dos venenos de *L. m. muta* e de *B. atrox*. Os resultados mostram que as potências do soro para a atividade hemorrágica dos venenos de *L. m. muta* e de *B. atrox* foram similares enquanto que a potência, para a atividade coagulante do veneno de *L. m. muta*, foi 9,2 vezes menor. Os títulos de anticorpos de três diferentes lotes de soro antibotrópico variaram para o veneno de *L. m. muta* e foram constantes para o veneno de *B. atrox*. Devido a ineficácia do soro antibotrópico em neutralizar, principalmente, a atividade coagulante do veneno de *L. m. muta*, sugerimos a não utilização do antibotrópico no tratamento dos acidentes por *L. m. muta*.

UNITERMOS: *Lachesis muta muta*; Soroterapia; Acidente ofídico humano.

INTRODUÇÃO

Os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Lachesis*, apresentam pronunciado efeito local como: dor, edema, equimose, flictenas hemorrágicas e necrose tissular ocasionando, frequentemente, seqüelas como perda de tecidos ou amputação da extremidade afetada^{12,13}, além de alteração da coagulação sanguínea devida, principalmente, a desfibri-

nogenação^{2,8}. Nos acidentes laquéticos podem ainda ocorrer sintomas como: náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais¹⁰.

No estado do Amazonas, nas regiões circunvizinhas à cidade de Manaus, as principais espécies de serpentes causadoras de acidentes são *Bothrops atrox* (jararaca,

(1) Convênio Conselho Nacional de Pesquisa, Universidade do Amazonas e Instituto de Medicina Tropical de Manaus/AM, Brasil.

(2) Convênio Universidade do Amazonas, Fundação Oswaldo Cruz (RJ) e Instituto de Medicina Tropical de Manaus/AM, Brasil.

(3) Instituto de Medicina Tropical de Manaus/AM, Brasil.

(4) Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade do Amazonas/AM, Brasil.

Endereço para correspondência: Profª Dra. Maria Cristina dos Santos. Universidade do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas. Av. do Contorno, 3000 - Campus Universitário. CEP 69070-000 Manaus, AM, Brasil.

jararaca de rabo branco ou surucucurana) e *Lachesis muta muta* (surucucu ou surucucu pico-de-jaca), com percentual de ocorrência, dos acidentes confirmados, de 76% e 17%, respectivamente ³.

Com relação ao veneno de *Lachesis muta muta*, algumas proteínas já foram isoladas e caracterizadas, dentre as quais podemos destacar: a "trombina-simile" ^{18, 21}; dois fatores hemorrágicos - LIIF-I e LHF-II ^{14, 16}; a gioxina ¹⁷ e a cininogenina ⁴.

Os centros produtores de soros antiofídicos, Fundação Ezequiel Dias e Instituto Butantan, produzem antivenenos específicos para os acidentes causados por *Lachesis muta muta*. Rotineiramente, no Instituto de Medicina Tropical de Manaus - IMTM (AM), utiliza-se o soro antibotrópico no tratamento desses pacientes na ausência dos soros antilaquético ou antibotrópico-laquético. O soro antibotrópico é produzido a partir da hiperimunização de eqüídeos com misturas de venenos de espécies do gênero *Bothrops*.

No presente trabalho, relatamos um caso de acidente por serpente *Lachesis muta muta*, onde foi utilizado para o tratamento, o soro antibotrópico. A partir da evolução clínica desse paciente verificamos, experimentalmente, a potência deste soro em neutralizar as atividades coagulante e hemorrágica do veneno de *Lachesis muta muta*, como também, o título de anticorpos de três lotes diferentes de soro antibotrópico frente a este veneno. O veneno de *Bothrops atrox* foi utilizado em todos os experimentos como controle.

Relato do caso: F. G. M., 44 anos, sexo masculino, solteiro, pardo, agricultor, procedente da Penitenciária Anísio Jobim, estrada Manaus - Boa Vista km 8, foi picado por uma serpente peçonhenta, *Lachesis muta muta* (Surucucu pico-de-jaca) - identificada pela Bióloga Maria Ermelinda de Oliveira, do Núcleo de Animais Peçonhentos do IMTM - às 09:30h do dia 20.03.1993, quando trabalhava em mata fechada. A picada ocorreu no tomozelo direito (maléolo lateral), quando passou perto do animal e, após cerca de 20 minutos, começou a apresentar dor intensa, edema e hemorragia de pequeno volume no local, visão turva, lipotímia e perda de consciência. Deu entrada no IMTM 1 hora e 30 minutos após o acidente, com incisão em cruz no local da picada e garroteamento na região da panturrilha. **Exame Físico:** apresentava-se torporoso, pulso fino; frequência respiratória: 32 irpm; ritmo cardíaco irregular com hipofonese de bulhas e frequência cardíaca: 64bpm. O estado de

choque (PA 70X0 mmHg) foi revertido com Dopamina e. v. e Adrenalina s. c.. Após 4 horas houve restabelecimento do nível de consciência e da PA (100X70 mmHg), sem outras alterações. O sangue apresentava-se incoagulável, após 30 minutos (TC>30 min). Por não estar disponível, naquele momento, o soro antilaquético e/ou antibotrópico-laquético, foram administradas 10 ampolas do soro antibotrópico, endovenoso, 30 gts/min, sem diluição. Ao término deste, o paciente apresentou vários episódios de vômitos alimentares e dor retroesternal, que regrediram com medicação sintomática (Plasil, 2ml c. v.). **Evolução:** Após 12 horas da administração da soroterapia, o sangue permanecia incoagulável. No segundo dia de internação novo TC foi realizado, constatando que ainda permanecia a incoagulabilidade sanguínea. Mantido o quadro no terceiro dia, foram administradas mais 10 ampolas do soro antibotrópico e. v., 30 gts/min sem diluição, não apresentando qualquer efeito colateral. Além da incoagulabilidade sanguínea, do edema e do eritema local, persistiu a hemorragia local, de pequeno volume, que cessou no terceiro dia de internação após sutura. A incoagulabilidade sanguínea manteve-se até o 13º dia a partir da internação hospitalar, normalizando-se em torno do 15º dia (8' 24") e 16º dia (10' 30"). As dosagens de uréia e creatinina mostraram-se normais ao 11º dia (29,8 mg% e 0,8 mg%, respectivamente).

A alta hospitalar ocorreu no 16º dia de internação. Neste período, não se verificou manifestação clínica sistêmica importante, complicações locais ou hipersensibilidade tardia à soroterapia.

METODOLOGIA

Venenos - Os venenos de *Lachesis muta muta* e *Bothrops atrox* foram extraídos de serpentes adultas, previamente imobilizadas com gás carbônico, mantidas no Núcleo de Animais Peçonhentos do IMTM. Os venenos foram filtrados em filtro de 0,45µm (MILLIPORE), liofilizados e estocados a -20°C.

Animais - Camundongos não isogênicos, pesando entre 18 e 22 gramas, procedentes do Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente, em gaiolas de plástico, recebendo ração e água ad libitum.

Plasma humano normal - Amostras de sangue humano normal foram coletadas de três voluntários do sexo masculino, na presença de anticoagulante, citrato

de sódio a 5.2%. As amostras de plasma foram misturadas e estocadas a -20°C até o momento do uso.

Determinação da Dose Mínima Coagulante (DMC) -

Para a determinação da DMC foi utilizado o método de THEAKSTON & REID (1983)²⁰. A DMC corresponde a dose de veneno capaz de coagular o plasma em 60" a 37°C.

Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

Para a determinação da DMH foi utilizado o método de GUTIÉRREZ et al. (1985)⁹. Utilizaram-se cinco camundongos para cada dose dos venenos, a injeção foi feita pela via intradérmica no ventre do animal e o período de observação foi de duas horas.

Soro antibotrópico - Os soros antibotrópicos utilizados foram os produzidos pelo Instituto Butantan a partir da hiperimunização de cavalos com venenos de sete espécies do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*), lotes 8911290, 9207171, 9203049.

Determinações dos títulos de anticorpos para os soros antibotrópico do Instituto Butantan - Os títulos de anticorpos foram obtidos frente aos venenos de *B. atrox* e *L. m. muta* para os três lotes de soros antibotrópico. Os títulos foram determinados pelo método de ELISA segundo THEAKSTON et al. (1977)¹⁹ modificado por DOS SANTOS et al. (1988)⁵.

Teste de Soroneutralização - Doses fixas dos venenos foram incubadas com diferentes concentrações do antiveneno, mantendo sempre o mesmo volume final, durante 30 minutos, a 37°C.

Soroneutralização da atividade coagulante - Para avaliação da neutralização da atividade coagulante utilizou-se o método de GENÉ et al. (1989)⁷. A dose de veneno usada correspondeu a duas DMC. A neutralização foi expressa como Dose Efetiva 50% (DE₅₀), 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.

Soroneutralização da atividade hemorrágica - Para avaliação da neutralização da atividade hemorrágica utilizou-se o método de GUTIÉRREZ et al., (1985)⁹. As doses dos venenos utilizadas corresponderam a 5 DMH. A mistura de veneno/antiveneno foi injetada por via intradérmica no

ventre do animal. A dose efetiva 50% (DE₅₀), corresponde a dose de soro que neutraliza 50% da ação hemorrágica do veneno em relação aos animais controle.

Obtenção das potências do soro antibotrópico - As potências do soro, para as duas atividades testadas, foram obtidas a partir da Dose Efetiva 50%. Potência = a quantidade de veneno (mg) neutralizada por ampola de soro (10 mililitros).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas determinações das doses mínimas coagulantes sobre o plasma e das mínimas hemorrágicas para os venenos de *Lachesis muta muta* e de *Bothrops atrox*, estão expressos na Tabela 1. O veneno de *Lachesis muta muta* apresentou atividade coagulante maior do que o veneno de *Bothrops atrox* e estes resultados confirmam os obtidos por SANCHEZ et al. (1992)¹⁵. O veneno de *Lachesis muta muta*, de todos os venenos estudados, é o que apresenta maior atividade coagulante¹⁵.

Tabela 1

Dose Mínima Coagulante sobre Plasma Humano (DMC-P) e Dose Mínima Hemorrágica (DMH) dos venenos de *Lachesis muta muta* e *Bothrops atrox*.

| Doses | <i>Lachesis muta muta</i> | <i>Bothrops atrox</i> |
|-------|---------------------------|-----------------------|
| DMC-P | 12,5µg/l | 43,8µg/l |
| DMH | 16,25µg* | 7,7µg* |

µg/l quantidade de veneno (µg) necessário para coagular um litro de plasma humano.

* - quantidade de veneno (µg) que induz lesão hemorrágica, em camundongo, de 10mm de diâmetro (n=5).

A atividade hemorrágica foi mais potente no veneno de *B. atrox*. Resultados semelhantes, também foram encontrados por SANCHEZ et al. (1992)¹⁵ através do método de KONDO et al. (1960)¹¹.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos no teste de ELISA para a determinação dos títulos de anticorpos para os diferentes lotes de soro antibotrópico, produzidos pelo Instituto Butantan.

Quanto aos títulos de anticorpos verificamos que os lotes de soro antibotrópico apresentaram títulos variáveis para o veneno de *L. m. muta*. Esses soros são testados frente a atividade letal do veneno referência

Tabela 2

Títulos de anticorpos, determinados pelo método de ELISA, para os lotes do antiveneno botrópico frente aos venenos de *Lachesis muta muta* e *Bothrops atrox*.

| Lotes | <i>Lachesis muta muta</i> | <i>Bothrops atrox</i> |
|----------|---------------------------|-----------------------|
| 8911290 | 64.000 | > 256.000 |
| 9207171 | 128.000 | > 256.000 |
| 9203049* | > 256.000 | > 256.000 |

Os antivenenos foram produzidos no Instituto Butantan e eram, naquele momento, os lotes disponíveis para o atendimento dos acidentes ofídicos.

* lote utilizado nos experimentos de soroneutralização

nacional de *Bothrops jararaca*, antes de serem lançados no mercado, garantindo assim a sua eficácia apenas para os venenos dessa espécie.

De todos os lotes testados, o lote 9203049, foi o único que apresentou títulos similares para os venenos de *L. m. muta* e de *B. atrox* por este motivo, foi utilizado nos experimentos de neutralização das atividades coagulantes e hemorrágica.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram as potências do soro antibotrópico (lote 9203049) frente as atividades hemorrágica e coagulante dos venenos de *L. m. muta* e *B. atrox*.

O antibotrópico apresentou maior poder neutralizante para a atividade hemorrágica dos venenos de *B. atrox* e de *L. m. muta*, sendo mais eficaz para o veneno de *B. atrox*. Os fatores hemorrágicos ou as hemorraginas são geralmente bons imunógenos, resultando em antivenenos com títulos elevados de anticorpos frente a essa atividade ^{6,9}.

Quanto a soroneutralização da atividade coagulante verificamos que o soro antibotrópico foi mais eficaz em neutralizar o veneno de *B. atrox*. Para obter a neutralização da atividade coagulante do veneno de *Lachesis muta muta* seria necessário utilizar cerca de 9,2

Tabela 3

Potências* do antiveneno botrópico (lote 9203049) frente as atividades coagulante e hemorrágica dos venenos de *Lachesis muta muta* e *Bothrops atrox*.

| Atividade | <i>Lachesis muta muta</i> | <i>Bothrops atrox</i> |
|-------------|---------------------------|-----------------------|
| Coagulante | 0,8mg | 7,3mg |
| Hemorrágica | 17,9mg | 29,6mg |

* Potência = quantidade de veneno (mg) neutralizada por ampola de antiveneno (10ml).

vezes mais soro antibotrópico do que a dose (10 ampolas) rotineiramente utilizada para o acidente com serpentes do gênero *Bothrops*. No caso relatado neste trabalho, foram utilizadas vinte ampolas de soro antibotrópico e a atividade coagulante não foi neutralizada. O sangue só voltou a ser coagulável no 15º dia após o acidente (TC = 8'24").

Segundo AMARAL et al. (1986) ¹, uma das hipóteses para a insuficiência renal aguda, nos acidentes botrópicos, seria a coagulação intravascular disseminada provocada pelo veneno não neutralizado. Devido a ineficácia do soro antibotrópico em neutralizar, principalmente, a ação coagulante do veneno de *L. m. muta*, sugerimos a não utilização do antibotrópico nos acidentes causados por serpentes do gênero *Lachesis*.

SUMMARY

Inefficacy of bothropic antivenom on the neutralization of the coagulant activity of *Lachesis muta muta* venom. Case report and experimental evidence.

In the State of Amazonas and in areas nearby Manaus, the snakes responsible for the majority of accidents are *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta*, with a percentage of confirmed species of 76% and 17%, respectively. Frequently, in the absence of the laquetic and bothropic-laquetic antivenoms, the Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM) has been using bothropic antivenom in the treatment of laquetic accident. In this paper is related a case of accident caused by *L. muta muta*; the patient was treated with bothropic antivenom, and after received twenty ampoules of this antivenom, maintained blood incoagulability until the 13th day after the accident. Experiments to obtain the potency of the bothropic antivenom for the coagulant and hemorrhagic activities has been done, using *Bothrops atrox* venom as control. The results showed that the potency of the antivenom for the hemorrhagic activity was similar, and the potency for the coagulant activity for the *L. m. muta* venom was 9.2 times minor than that for *B. atrox*. The antibodies titles from three different lots of bothropic antivenom varied for the *L. m. muta* venom, and were constant for the *B. atrox* venom. Due to the inefficiency of the bothropic antivenom on the neutralization of the coagulant activity for the *L. m. muta* venom, the use of bothropic antivenom is not recommended in the treatment of *Lachesis muta muta* accidents.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sérgio Cardoso, Secretário da Fazenda do Estado do Amazonas, pelos recursos financeiros cedidos para a elaboração deste trabalho; Dra Maria Zeina M. Sampaio do Instituto de Medicina Tropical de Manaus, por ceder a notificação do caso clínico; Prof. Maria Ermelinda de Oliveira pela identificação da serpente; Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira e a aluna Ana Cláudia S. Barros pela revisão e pelas críticas ao texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, C. F. S.; RESENDE, N. A.; SILVA, O. A. et al. - Insuficiência renal aguda secundária à acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 28: 220-227, 1986.
2. AMARAL, C. F. S.; DOURADO, H. V.; KOUYOUMDJIAN, J. A. et al. - *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*. Brasília, Ministério da Saúde, 1991.
3. CASTRO, S. S.; DOS SANTOS, M. C.; ARAKIAN, K. L.; MUNIZ, E. G. & BURHNHEIM, P. F. - Estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus - Amazonas, de 1986 à 1991. In: I SIMPOSIO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS, 1, Manaus, 1992. *Anais*. p. 37.
4. DINIZ, M. R. V. & OLIVEIRA, E. B. - Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (Bushmaster). *Toxicon*, 30: 247-258, 1992.
5. DOS SANTOS, M. C.; DINIZ, C. R.; WHITAKER-PACHICO, M. A. & DIAS DA SILVA, W. - Phospholipase A2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 26: 207-213, 1988.
6. DOS SANTOS, M. C.; GONÇALVES, L. R. C.; FORTES-DIAS, C. L. et al. - A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 34: 77-83, 1992.
7. GENÉ, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. & CERDAS, L. - Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinolytic activities of Costa Rica crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27: 841-848, 1989.
8. GUTIÉRREZ, J. M. & CHAVES, F. - Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon*, 18: 315-321, 1980.
9. GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G. & CERDAS, L. - Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23: 887-893, 1985.
10. JORGE, M. T.; SANO-MARTINS, I. S.; FERRARI, R. S. et al. - Envenomation by *Lachesis muta muta* in Brazil: a case report. In: *Toxins as Scientific Tools*. (Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Campinas, Brasil, 1992). *Anais*. p. 76.
11. KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, K. & MURATA, R. - Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 13: 43-51, 1960.
12. PICADO, C. - *Serpientes venenosas de Costa Rica. Sus venenos. Seroterapia antiofídica*. San José, Costa Rica, Imprenta Alsina, 1931.
13. ROSENFELD, G. - Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: BUCHERL, W. & BUCKLEY, E., ed. - *Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates*. New York, Academic Press, 1971. v. 2, p. 345.
14. SANCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A. & DINIZ, C. R. - Purification of a hemorrhagic factor (LHIF-I) from the venom of the bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon*, 25: 611-616, 1987.
15. SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L. et al. - Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, 30: 95-103, 1992.
16. SANCHEZ, E. F.; PRADO, E. S. & DINIZ, C. R. - Characterization of two hemorrhagic factors from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). In: *Toxins as Scientific Tools*. Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Campinas, Brasil, 1992. *Anais*. p. 21.
17. SILVA, N. J.; AIRD, S. D.; SEEBART, C. & KAISER, I. I. - A gyroxin analog from the venom of the Bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon*, 27: 763-767, 1989.
18. SILVEIRA, A. M. V.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. & OLIVEIRA, E. B. - Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *Int. J. Biochem.*, 21: 863-871, 1989.
19. THEAKSTON, R. D. G.; LLOYD-JONES, M. J. & REID, H. A. - Micro ELISA for detecting and assaying snakes venom and venom-antibody. *Lancet*, 2: 639-641, 1977.
20. THEAKSTON, R. D. G. & REID, H. A. - Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 61: 949-956, 1983.
21. YARLEQUE, A.; CAMPOS, S.; ESCOBAR, E. et al. - Isolation and characterization of a fibrinogenclotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian Bushmaster). *Toxicon*, 27: 1189-1196, 1989.

Recebido para publicação em 31/05/1993.
Aceito para publicação em 26/11/1993.